

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA  
ARBUSCULAR, RIZOBACTÉRIAS, FÓSFORO E SILÍCIO  
NA MANIFESTAÇÃO DA TOXIDAZ DE  
MANGANÊS EM SOJA**

MARCO ANTONIO NOGUEIRA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Novembro – 2001

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA  
ARBUSCULAR, RIZOBACTÉRIAS, FÓSFORO E SILÍCIO  
NA MANIFESTAÇÃO DA TOXIDEZ DE  
MANGANÊS EM SOJA**

**MARCO ANTONIO NOGUEIRA**  
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Novembro – 2001

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Nogueira, Marco Antonio  
Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja  
/ Marco Antonio Nogueira. - - Piracicaba, 2001.  
195 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.  
Bibliografia.

1. Fertilidade do solo 2. Manganês 3. Micorriza 4. Microbiologia do solo 5. Química do solo 6. Soja 7. Toxicidade I.  
Título

CDD 633.34

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

## **AGRADECIMENTOS**

Durante o desenvolvimento dessa tese pude perceber o verdadeiro sentido da amizade e colaboração demonstrada por várias pessoas com as quais tive o privilégio de conviver. Na ESALQ e particularmente no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, encontrei mais que funcionários e colegas de laboratório; encontrei verdadeiros amigos solidários. Não foram poucas as vezes em que pude contar com o auxílio de várias pessoas durante a instalação, colheita e análise de experimentos. Não apenas para o trabalho ou para um assunto técnico, mas também para uma conversa no final da tarde ou nos intervalos entre as atividades, sempre pude contar com um amigo. Como ocorre naturalmente entre qualquer círculo de amizade, existem aquelas mais intensas, outras mais formais, mas o carinho e o respeito sempre foram os mesmos. O meu muito obrigado a todas essas pessoas, meus amigos, alunos de graduação, pós-graduação e funcionários da ESALQ, que fizeram parte do meu dia-a-dia durante esses anos. Estou certo de que nossa amizade não ficará limitada ao final dessa etapa.

Não poderia deixar de expressar, de modo particular, minha gratidão à Denise de Lourdes Colombo Mescolotti e ao Luís Fernando Baldesin, duas pessoas que são unanimidade entre os que passam pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ, pela sua presteza, boa vontade, caráter e, sobretudo, amizade que muito nos honra.

Quero também agradecer aos Professores Rüdiger Hampp, Uwe Nehls e Carl Poralla da Universidade de Tübingen - Alemanha, com os quais pude conviver durante o programa de bolsa “sanduíche” junto àquela Universidade.

Tenho especial gratidão pela Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, por quem tive a honra de ser orientado. Mais que orientadora profissional, também foi orientadora da vida diária e, sobretudo, amiga.

Finalmente quero agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela bolsa de estudos e à CAPES/DAAD/PROBRAL, que possibilitaram a execução do programa “sanduíche” na Alemanha.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Manganês no solo .....	4
2.2 Manganês na planta .....	6
2.3 Tolerância das plantas ao $Mn^{2+}$ e o envolvimento dos FMA .....	9
2.4 Tolerância das plantas ao $Mn^{2+}$ e o envolvimento do silício .....	13
3 EFICIÊNCIA MICORRÍZICA E TOXIDEZ DE MANGANÊS EM SOJA EM FUNÇÃO DO TIPO DE SOLO E DA ESPÉCIE DO ENDÓFITO .....	17
Resumo .....	17
Summary .....	18
3.1 Introdução .....	18
3.2 Material e Métodos .....	20
3.3 Resultados .....	25
3.4 Discussão .....	40
3.5 Conclusões .....	43
4 TOXIDEZ DE MANGANÊS E DEPOSIÇÃO DE CALOSE ( $\beta$ -1,3- GLUCANA) NAS FOLHAS SÃO ATENUADOS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS .....	44
Resumo .....	44
Summary .....	45
4.1 Introdução .....	45

4.2 Material e Métodos .....	47
4.3 Resultados .....	52
4.4 Discussão .....	65
4.5 Conclusões .....	72
5 INTERAÇÕES MICROBIANAS AFETAM A DISPONIBILIDADE DE MANGANÊS E SUA ABSORÇÃO POR SOJA .....	73
Resumo .....	73
Summary .....	74
5.1 Introdução .....	75
5.2 Material e Métodos .....	77
5.3 Resultados .....	80
5.4 Discussão .....	88
5.5 Conclusões .....	93
6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS OXIDANTES E REDUTORAS DE MANGANÊS COM BASE EM SEQUÊNCIAS DO rDNA 16S .....	95
Resumo .....	95
Summary .....	96
6.1 Introdução .....	96
6.2 Material e Métodos .....	98
6.3 Resultados .....	104
6.4 Discussão .....	111
6.5 Conclusões .....	115
7. ATENUAÇÃO DA TOXIDEZ DE MANGANÊS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS EM COMPARAÇÃO COM PLANTAS NÃO MICORRIZADAS QUE RECEBERAM FÓSFORO SOLÚVEL .....	116
Resumo .....	116
Summary .....	117
7.1 Introdução .....	118
7.2 Material e Métodos .....	121

7.3 Resultados .....	125
7.4 Discussão .....	140
7.5 Conclusões .....	145
8 ATENUAÇÃO DA TOXIDEZ DE MANGANÊS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS, EM SOLO COM ALTA DISPONIBILIDADE DE MANGANÊS .....	147
Resumo .....	147
Summary .....	148
8.1 Introdução .....	149
8.2 Material e Métodos .....	152
8.3 Resultados .....	155
8.4 Discussão .....	170
8.5 Conclusões .....	175
9 CONCLUSÕES .....	176
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	178

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA ARBUSCULAR, RIZOBACTÉRIAS,  
FÓSFORO E SILÍCIO NA MANIFESTAÇÃO DA  
TOXIDEZ DE MANGANÊS EM SOJA**

Autor: MARCO ANTONIO NOGUEIRA

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

**RESUMO**

A atenuação da toxidez de Mn é relativamente freqüente em plantas micorrizadas. Nesse trabalho, testaram-se três hipóteses para avaliar os efeitos da micorrização sobre a manifestação da toxidez de Mn: 1) A micorrização altera a comunidade microbiana oxidante e redutora de Mn no solo, o que reflete na sua disponibilidade; 2) A micorrização propicia maior absorção de Si pela planta, o qual atenua a toxidez de Mn; 3) O maior desenvolvimento das plantas micorrizadas atenua a toxidez de Mn pelo efeito diluição. Conduziram-se cinco experimentos, empregando-se a cultivar de soja IAC-8 e, como substrato, solos classificados como NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico ou NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico, autoclavados para eliminar a comunidade microbiana nativa. Num experimento preliminar foi selecionada a espécie de fungo micorrízico arbuscular (FMA) *G. etunicatum*, eficiente em promover o crescimento da soja nos dois solos, com efeitos mais evidentes entre 9 e 12 semanas. Nesse experimento, a espécie *G. macrocarpum* no substrato argiloso agravou os sintomas de toxidez de Mn e foi utilizada nos experimentos posteriores para se investigar esse comportamento. No segundo experimento, *G. etunicatum* atenuou a

toxidez de Mn em plantas que receberam doses crescentes de Mn no substrato, simultaneamente com a diminuição da deposição de calose ( $\beta$ -1,3-glucana) nas folhas mais novas. Houve aumento dos teores de Si nas raízes das plantas micorrizadas. No terceiro experimento, a micorrização, sem ou com o restabelecimento da comunidade microbiana nativa, aumentou o crescimento das plantas e diminuiu a toxidez de Mn, mais intensamente nos tratamentos com o restabelecimento da comunidade microbiana. Isso coincidiu com menores concentrações de Mn nas raízes e parte aérea e menor disponibilidade no substrato; comportamento semelhante foi observado para Fe na parte aérea. Bactérias redutoras e oxidantes de Mn foram isoladas e identificadas por meio de seqüenciamento da região 16S do rDNA. Dentre as redutoras, a maioria pertenceu ao gênero *Streptomyces* e uma ao gênero *Variovorax*. As oxidantes agruparam-se em três *clusters* dos gêneros *Arthrobacter*, *Variovorax* e *Ralstonia*. No quarto experimento, plantas de soja micorrizadas foram comparadas com plantas não micorrizadas que receberam dose extra de P, com a finalidade de obter plantas micorrizadas e não micorrizadas com biomassas semelhantes, eliminando-se o efeito diluição. As plantas micorrizadas apresentaram maior atenuação da toxidez de Mn em relação àquelas que receberam dose extra de P, mesmo com biomassas semelhantes. Nesse caso, as plantas micorrizadas apresentaram menores concentrações de Mn na parte aérea e raízes. No último experimento, novamente as plantas micorrizadas apresentaram atenuação da toxidez de Mn e diminuição da sua concentração na parte aérea quando cultivadas no substrato argiloso com alta disponibilidade natural de Mn. A colonização radicular pelos FMA correlacionou-se negativamente com os teores de Mn na parte aérea e raízes. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias oxidantes de Mn correlacionou-se negativamente com a disponibilidade de Fe e Mn no substrato, já o número UFC de bactérias redutoras de Mn correlacionou-se positivamente. Essas observações indicam que as disponibilidades do Fe e Mn nesse substrato estão sob influência da atividade biológica.

**INTERACTIONS AMONG ARBUSCULAR MYCORRHIZA,  
RHIZOBACTERIA, PHOSPHORUS AND SILICON ON  
MANGANESE TOXICITY DISPLAY IN SOYBEAN**

Author: MARCO ANTONIO NOGUEIRA

Adviser: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

**SUMMARY**

The attenuation of Mn toxicity is relatively frequent in mycorrhizal plants. In this work, three hypotheses were tested to evaluate the effects of mycorrhiza on the manifestation of Mn toxicity: 1) Mycorrhiza alters the Mn oxidizing and reducing microbial community in the soil, modifying its availability; 2) Mycorrhiza propitiates larger absorption of Si by the plant, which lessens the Mn toxicity; 3) The growth increase of mycorrhizal plants results in lower Mn toxicity due to the dilution effect. Five experiments were carried out, in which the soybean cultivar IAC-8 was used as test plant. As substratum we used soils classified as Typic Rhodudalf or Typic Quartzipsamment, autoclaved to eliminate the native microbial community. In a preliminary experiment the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *G. etunicatum* was selected as effective in plant growth promotion in the two soils, with greater effects between 9 and 12 weeks after sowing. In this experiment, the species *G. macrocarpum* increased the Mn toxicity symptoms in the clay soil. Therefore this AMF was used in the subsequent experiments to investigate the causes of this behavior. In the second experiment *G. etunicatum* lessened the Mn toxicity in plants cultivated in substratum

that received increasing doses of Mn, that also showed a decrease of callose ( $\beta$ -1,3-glucan) deposition in the youngest leaves. There was also an increase of Si concentrations in the roots of the mycorrhizal plants. In the third experiment, mycorrhiza, in combination or not with the reestablishment of the native microbial community, increased plant growth and reduced Mn toxicity more intensively in the treatments in which the microbial community was reestablished. That coincided with smaller concentrations of Mn in the roots and shoots of the plants and lower availability in the substratum; a similar behavior was observed for Fe in the shoots. Manganese reducing and oxidizing bacteria were isolated and identified by sequencing the 16S rDNA. Among the Mn reducers, most belonged to the genus *Streptomyces* and one to the genus *Variovorax*. The oxidizers were grouped in three clusters of the genera *Arthrobacter*, *Variovorax* and *Ralstonia*. In the fourth experiment, mycorrhizal soybean plants were compared with non-mycorrhizal ones that received an extra dose of P, with the purpose of obtaining mycorrhizal and non-mycorrhizal plants with a similar biomass, eliminating the dilution effect. Mycorrhizal plants presented greater Mn toxicity attenuation in relation to those that received extra P, even with similar biomasses. In that case, the mycorrhizal plants presented smaller Mn concentrations in the shoots and roots. In the last experiment, mycorrhizal plants once more presented attenuation of Mn toxicity and decrease of Mn concentration in the shoots when cultivated in the clay substratum with high Mn availability. Mycorrhizal root colonization correlated negatively root and shoot Mn concentrations. The number of colony forming units (CFU) of Mn oxidizing bacteria correlated negatively with the availability of Fe and Mn in the substratum, while the number of CFU of Mn reducing bacteria correlated positively. Those observations indicate that the availability of Fe and Mn in that substratum is under influence of biological activity.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill), uma das principais geradoras de divisas para o Brasil, vem se expandindo para as novas fronteiras agrícolas do país, principalmente a região dos cerrados, onde são freqüentes as limitações no que se refere à fertilidade do solo. Entre essas limitações, estão os baixos teores de fósforo disponível e o baixo pH, favorecendo a disponibilidade de alumínio e manganês a níveis tóxicos às plantas.

A calagem e o uso de variedades resistentes são práticas agrícolas amplamente difundidas entre os agricultores, visando superar os problemas relacionados à disponibilidade de Al e Mn, com inquestionável eficiência. Com relação aos baixos teores de P, seu fornecimento às plantas é feito através de fertilizantes fosfáticos solúveis. Entretanto, possíveis alternativas ou complemento a essas práticas merecem ser mais bem estudadas, especialmente quando apresentam um grande potencial de uso, como é o caso das micorrizas arbusculares (MAs), o que vem de encontro ao propósito atual de sustentabilidade dos agroecossistemas.

Embora a associação simbiótica entre as plantas e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) seja regra na natureza, com cerca de 97% das espécies formando associações com FMA, esta raramente é considerada nos programas que visam o fornecimento de P e a resistência das plantas aos estresses iônicos.

O relato do aumento da eficiência das plantas micorrizadas em absorver P é comum na literatura. Entretanto, em menor freqüência, observa-se que essas plantas são capazes de melhor suportar as condições de estresses iônicos, como os causados pelo excesso de  $Mn^{2+}$ . Sob disponibilidade de  $Mn^{2+}$  a níveis tóxicos no substrato de cultivo, as plantas micorrizadas freqüentemente apresentam menos sintomas de toxidez, menores

concentrações do elemento na parte aérea e menor quantidade absorvida, o que reflete em maior crescimento (Cardoso, 1996). Contudo, os mecanismos pelos quais ocorre a atenuação dos sintomas de toxidez de  $Mn^{2+}$  e, em outros casos, sua menor absorção por plantas micorrizadas, não são conhecidos (Bethlenfalvay & Franson, 1989).

Sabe-se que a presença dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), em associação com as raízes das plantas, afeta qualitativa e quantitativamente os exsudatos radiculares, o que conseqüentemente altera a microbiota associada à micorrizosfera, de forma diferente daquela onde só as raízes estão presentes (Lindermann, 1988). A formação de micorriza, com conseqüente alteração do padrão da exsudação radicular (Graham et al, 1981), pode alterar o balanço entre as comunidades microbianas oxidantes e as redutoras de Mn na micorrizosfera, o que poderia influenciar na disponibilidade do Mn e sua conseqüente absorção pela planta (Kothari et al., 1991).

O isolamento em meio artificial de microrganismos do solo com capacidade de oxidação e redução de Mn e sua quantificação podem ser úteis para auxiliar na interpretação dos resultados referentes à manifestação dos sintomas de toxidez de Mn em plantas micorrizadas. Com o advento das técnicas do DNA recombinante, a identificação de microrganismos pelo seqüenciamento de parte de seu DNA genômico tornou-se mais fácil. O conhecimento e a quantificação dos microrganismos do solo com capacidade de oxidação e redução de Mn pode ser importante para auxiliar previsão do potencial de cada grupo no solo, bem como a influência das associações micorrízicas sobre cada um, de modo a favorecer ou inibir. Entretanto, há que se salientar que nem todos os grupos de microrganismos do solo são passíveis de serem cultivados em meio artificial, estimando-se que a grande maioria não se desenvolve, e, portanto, não pode ser estimada, nem sequer identificada. No caso particular dos oxidantes e redutores de Mn, o fato de essa característica poder ser observada em meio artificial, em que as condições propiciam o pleno desenvolvimento microbiano, não necessariamente reflete o que ocorre no solo. A competição por alimentos a que os diferentes grupos microbianos estão submetidos nas condições naturais é muito acirrada, sendo que muitos deles podem ter seu desenvolvimento limitado pela ação de outros mais adaptados àquela situação e assim não conseguem expressar todo o seu potencial observado

quando cultivado em meio artificial.

O silício (Si) é conhecido como elemento útil e está envolvido na atenuação da toxidez causada pelo excesso de  $Mn^{2+}$  (Horst & Marschner, 1978). Por ter semelhança química com a forma de ocorrência do P, o Si também pode ter sua absorção incrementada pelos FMA (Yost & Fox, 1982) e esta pode ser mais uma das razões da atenuação da toxidez de  $Mn^{2+}$  na sua presença. Outro fator que pode contribuir para a atenuação da toxidez de Mn em plantas micorrizadas é a sua concentração de P notoriamente maior, o que, além do melhorar o estado nutricional das plantas, conferindo-lhes melhores condições de suportar estresses, também pode levar à formação de complexos insolúveis entre íons fosfato e íons Mn no interior da planta (Foy, 1984). A formação desses complexos levaria à diminuição da atividade excessiva de íons Mn nas células, com redução dos seus efeitos tóxicos.

É claro que apenas um mecanismo isolado é insuficiente para explicar totalmente como a presença dos FMA pode levar à atenuação da toxidez de  $Mn^{2+}$ . Outros mecanismos inerentes à planta, como a oxidação do  $Mn^{2+}$  nas raízes, aumento da tolerância interna e a sua compartimentalização nos vacúolos são discutidos na literatura. O resultado final certamente é resultante da interação entre os mais diversos mecanismos, envolvendo a planta, o solo e o endófito.

As hipóteses principais do trabalho foram: 1) A micorrização altera a composição da comunidade de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na rizosfera, o que reflete na sua disponibilidade às plantas; 2) As plantas micorrizadas apresentam maior absorção de Si, o que resulta na atenuação da toxidez de Mn; 3) A atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas é decorrente do efeito diluição causado pela sua maior produção de biomassa. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi o de avaliar o envolvimento dos FMA na expressão de sintomas de toxidez de Mn em soja. Dois tipos de solo foram utilizados, sendo um muito argiloso, com alta disponibilidade natural de  $Mn^{2+}$ , e um arenoso, com baixa disponibilidade natural de  $Mn^{2+}$ , ao qual se adicionaram doses crescentes de  $Mn^{2+}$ , visando simular situações que variaram de baixa a alta disponibilidade deste elemento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Manganês no solo

Nos sistemas biológicos, o manganês pode ser encontrado em três níveis de oxidação:  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{4+}$  (formas estáveis) e  $Mn^{3+}$  (forma instável) (Marschner, 1995). Nos solos brasileiros, seu teor total varia de 10 a 4000  $mg\ kg^{-1}$ , enquanto seu teor solúvel varia de 0,1 a 100  $mg\ kg^{-1}$  (Malavolta, 1980). O manganês divalente ou reduzido ( $Mn^{2+}$ ) geralmente é a forma predominante na solução do solo, dependendo das condições de aeração, umidade e pH e esta é a forma absorvida pelas raízes das plantas (Marschner, 1995). Em solos encharcados predominam processos redutores e, havendo teores suficientes de Mn total, pode ocorrer toxidez de  $Mn^{2+}$  (Horst, 1988). Em muitos solos ácidos, em que há disponibilidade de  $Mn^{2+}$  em excesso, pode ocorrer limitação ao crescimento das plantas, sem, no entanto, acarretar sintomas de toxidez (Pacovsky et al., 1985). Menten et al. (1981) observaram que a toxidez de Mn em condições de campo ocorria em reboleiras, mas não conseguiram identificar os fatores que levaram ao aumento de sua disponibilidade naqueles locais.

A toxidez de  $Mn^{2+}$  é, provavelmente, depois da toxidez de  $Al^{3+}$ , o segundo mais importante fator limitante ao crescimento das plantas em solos ácidos, sendo que em valores de pH menores que 5,5 ocorre em combinação com a toxidez de  $Al^{3+}$ . Em pH superior a este, o  $Al^{3+}$  já não mais prejudica o desenvolvimento das plantas devido à sua precipitação quase total, ao passo que a toxidez de  $Mn^{2+}$  ainda poderá ocorrer, desde que o solo apresente teores suficientes de Mn potencialmente tóxicos. Quaggio et al. (1982) observaram que a quantidade de calcário necessária para reduzir a toxidez de Mn foi maior que aquela necessária para eliminar a toxidez de Al. Dentre os fatores que

determinam a disponibilidade do  $Mn^{2+}$  estão o pH, CTC, o teor de matéria orgânica, a aeração e a atividade microbiana (Foy, 1984; Tisdale et al., 1985).

Trindade et al. (1996) observaram que a aplicação de composto de lixo urbano diminuiu a absorção de  $Mn^{2+}$  por plantas de milho, mesmo com o fornecimento de  $Mn^{2+}$  contido no composto. Plantas que cresceram em solo fumigado apresentaram maior concentração de Mn, o que foi atribuído à diminuição do potencial de oxidação do  $Mn^{2+}$  por microrganismos. Conforme Godo & Reisenauer (1980), a disponibilidade do  $Mn^{2+}$  às plantas é determinada, entre outros fatores, pela atuação conjunta dos processos oxidantes e redutores de Mn envolvendo microrganismos. Habte & Soedarjo (1996) observaram menor disponibilidade de  $Mn^{2+}$  quando maiores doses de P foram adicionadas ao substrato. Tal fato foi explicado em parte pela liberação de OH quando o  $H_2PO_4^-$  é absorvido pela planta, o que causa elevação do pH na rizosfera e conseqüente precipitação do  $Mn^{2+}$  como  $Mn(OH)_2$ . No entanto, a maior parte da diminuição da concentração do  $Mn^{2+}$  disponível foi explicada pela sua precipitação como  $Mn_3(PO_4)_2$  na presença de ânions fosfato livres, dada a grande afinidade entre esses íons.

A ocorrência de toxidez de  $Mn^{2+}$  é menor em solos com elevada CTC, pois este cátion passa a ocupar os sítios de troca, ficando menos disponível na solução do solo para ser absorvido pelas raízes (Foy, 1984). Assim, solos arenosos, mais intemperizados, os quais geralmente apresentam menores teores de matéria orgânica e baixa CTC, seriam mais propícios à ocorrência de sintomas de toxidez de  $Mn^{2+}$  em plantas neles cultivadas. Por outro lado, nos solos argilosos, geralmente com maiores teores de matéria orgânica e maior CTC, os sintomas de toxidez ainda não seriam notados, para um mesmo teor de  $Mn^{2+}$  trocável. A ação complexante da matéria orgânica reduz a quantidade de  $Mn^{2+}$  disponível na solução do solo e sua mineralização pode liberar quantidades suficientes para prejudicar o desenvolvimento das plantas (Arines et al., 1989). Dessa forma, a toxidez de  $Mn^{2+}$  pode ser potencializada no sistema de cultivo convencional, o qual favorece a oxidação da matéria orgânica.

Embora o pH seja o principal fator que governa a disponibilidade de  $Mn^{2+}$  no solo, esta influência é significativamente complementada por um efeito rizosférico (Godo & Reisenauer, 1980). A reação de oxidação do  $Mn^{2+}$  é de natureza biológica,

enquanto a redução pode ser de natureza química ou biológica, potencializando sua disponibilidade no solo (Marschner et al., 1991; Rengel, 1997).

O equilíbrio químico entre as formas oxidadas e reduzidas de Mn no solo depende, em sua maior parte, dos processos microbianos (Sparrow & Uren, 1987). Assim, a atividade microbiana na rizosfera pode aumentar ou diminuir a disponibilidade de  $Mn^{2+}$ , dependendo do predomínio de comunidades oxidantes ou redutoras de Mn (Kothari et al., 1991; Rengel, 1997). Em solos calcáreos, a concentração de  $Mn^{2+}$  na rizosfera de milho diminuiu na mesma ordem que também foi diminuída a comunidade de microrganismos redutores de Fe e Mn, indicando seu envolvimento na redução do Mn (Kothari et al., 1991).

Segundo Bromfield (1978), a capacidade dos microrganismos oxidarem o  $Mn^{2+}$  é limitada a valores de pH menores que 5,5, o que contribui para seu acúmulo a níveis tóxicos a valores de pH menores que este. Contudo, para Sparrow & Uren (1987), mesmo em solos ácidos, os microrganismos são capazes de atuarem na diminuição das altas concentrações de  $Mn^{2+}$  pelo processo de oxidação. Se processos biológicos de oxidação e redução do Mn podem ocorrer em solos ácidos, qualquer mudança na disponibilidade do  $Mn^{2+}$  será o resultado líquido de mudanças na taxa de ambas reações, em combinação com a redução química do Mn em condições de acidez.

## 2.2 Manganês na planta

A concentração crítica de Mn no tecido vegetal necessária para produzir sintomas de toxidez varia com a espécie da planta e mesmo entre os seus cultivares (Foy, 1984; Marschner, 1995). Mentem et al. (1981) observaram que em plantas de feijoeiro injuriadas pela toxidez de Mn os teores nas folhas eram de  $4.200 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto que em plantas adjacentes sem sintomas os teores eram de  $550 \text{ mg kg}^{-1}$ . Em algumas variedades de soja são observados sintomas de toxidez quando os teores na folha recém madura são superiores a  $160 \text{ mg kg}^{-1}$  (Foy et al., 1978). Contudo, Marschner (1995) cita como nível crítico superior para a soja o valor de  $600 \text{ mg kg}^{-1}$ . Bethlenfalvay & Franson (1989) observaram sintomas de toxidez de  $Mn^{2+}$  em soja quando o teor foliar foi de  $314$

mg kg<sup>-1</sup>.

Os sintomas associados à toxidez de Mn<sup>2+</sup> incluem injúrias às paredes celulares, causando encarquilhamento das folhas, bem como necrose do caule e folhas, diminuição da capacidade fotossintética da planta, crescimento retardado, queima das pontas das folhas e flores (Foy, 1984). Em casos severos de toxidez as raízes tornam-se marrons, geralmente após a parte aérea ter sido severamente injuriada (Bromfield, 1978; Foy et al., 1978), sendo esta coloração produzida pela deposição de Mn oxidado (Horiguchi, 1987).

Embora várias enzimas sejam ativadas pelo Mn, conhecem-se apenas duas que o contém. Uma faz parte do fotossistema II e a outra é a dismutase de superóxido. A segunda, presente em organismos aeróbios, desempenha papel essencial na sua sobrevivência, protegendo os tecidos contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que são formados em várias reações enzimáticas, nas quais um elétron é transferido ao O<sub>2</sub>. A conversão do O<sub>2</sub><sup>-</sup> é catalisada pela dismutase de superóxido e a subsequente dismutação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> é catalisada pelas peroxidases e catalases (Marschner, 1995).

Várias enzimas podem ser alteradas pelo excesso de Mn<sup>2+</sup> na planta. Têm sido observados aumentos na atividade da oxidase do ácido indol acético - AIA - (diminuindo o nível de auxinas), peroxidase e oxidase de polifenol. Por outro lado, ocorre a diminuição da atividade de catalase, oxidase de ácido ascórbico, oxidase de glutathione, oxidase do citocromo C, além do nível de ATP da planta (Foy, 1984). Horiguchi (1988) observou aumento da atividade de peroxidases na parte aérea e raízes de arroz com o aumento da concentração de Mn<sup>2+</sup> na solução de cultivo. Como o aumento da atividade das peroxidases precedeu o surgimento das lesões decorrentes da toxidez, o autor sugeriu a possibilidade do aumento da atividade enzimática estar associado ao mecanismo de necrosamento. Com o aumento da atividade da oxidase de AIA, alguns pesquisadores concluíram que a paralisação do crescimento das paredes celulares foi devido a concentrações sub-ótimas de AIA no citoplasma (Fry, 1988). O transporte acrópeto de Ca até as folhas em expansão é mediado por um contratransporte basípeto de AIA. Em altas concentrações de Mn<sup>2+</sup> pode ocorrer deficiência induzida de Ca

decorrente da degradação do AIA pelo aumento da atividade da oxidase de AIA (Marschner, 1995). A toxidez de  $Mn^{2+}$  em soja também esteve associada à diminuição da atividade da redutase de nitrato (Heenan & Campbell, 1981).

O  $Mn^{2+}$ , depois de acumulado pela planta, é relativamente imóvel e, em consequência, sua concentração poderá variar entre as folhas de uma mesma planta. Maiores concentrações e sintomas de toxidez de  $Mn^{2+}$  têm sido observados nas folhas mais velhas. Para evitar interpretações errôneas decorrentes dessa variação, sugere-se a folha recém madura para o diagnóstico da concentração de Mn (Kluthcouski & Nelson, 1979). É importante notar que a forma de ocorrência do Mn no xilema pode ser diferente daquela localizada nas lesões características de sua toxidez (Foy, 1984).

Em plantas de caupi, os sintomas típicos de toxidez de  $Mn^{2+}$  são lesões marrons nas folhas maduras. O exame destas lesões sob microscópio após tratamentos histoquímicos revelou ser deposição de Mn oxidado na parede celular. Tratando-se estas lesões com redutores, houve apenas uma descoloração parcial, visto que os remanescentes deste tratamento eram compostos fenólicos oxidados. A oxidação de fenólicos ocorre em tecidos contendo excesso de Mn, porém o papel da oxidação do  $Mn^{2+}$  e o seu acúmulo nas lesões decorrentes da toxidez não é bem claro (Wissemeier & Horst, 1992). Horiguchi (1987) também observou acúmulo de substâncias fenólicas oxidadas nas lesões, o que indica a alta atividade de peroxidases e a oxidação de Mn nesses locais. É possível que o papel da oxidação do  $Mn^{2+}$  seja diminuir sua atividade pela formação de óxidos precipitados, diminuindo a atividade dos íons tóxicos nos tecidos da planta.

O excesso de Mn no tecido das plantas induz a formação de calose ( $\beta$ -1,3-glucana). A formação de calose é uma típica reação da planta na tentativa de restringir o estabelecimento de um patógeno, pela formação de uma barreira física ou em resposta a qualquer outro tipo de estresse que venha a causar lesões nas células (Kauss, 1989). Em pesquisa realizada por Wissemeier et al. (1992), a concentração de calose extraível das folhas esteve altamente correlacionada com a densidade de lesões formadas em consequência da toxidez de  $Mn^{2+}$ . Dessa forma, a determinação dos teores de calose nas folhas pode ser uma técnica sensível para indicar as respostas da planta ao excesso de

Mn, mesmo antes da manifestação dos sintomas visíveis.

### **2.3 Tolerância das plantas ao $Mn^{2+}$ e o envolvimento dos FMA**

A tolerância de algumas espécies vegetais a altas concentrações de  $Mn^{2+}$  no solo é atribuída à diminuição de sua absorção devido ao poder oxidante das raízes (ou microrganismos a elas associados), menor translocação para a parte aérea e/ou maior tolerância interna do elemento nos tecidos (Foy et al., 1978). A compartimentalização do Mn nos vacúolos ou parede celular e sua ligação a fenólicos atuam como mecanismos protetores por manter o Mn longe dos centros metabólicos (Foy, 1984; Wissemeier & Horst, 1992). Em algumas variedades de trigo, a maior tolerância ao excesso de  $Mn^{2+}$  foi decorrente da maior tolerância interna e não da sua menor absorção (Foy et al., 1973). A tolerância ao  $Mn^{2+}$  na fase vegetativa não implica o mesmo na fase reprodutiva. Pelo menos em leguminosas como a soja, a toxidez de  $Mn^{2+}$  pode reduzir a produção de grãos numa proporção maior que a redução do crescimento vegetativo (Marschner, 1995).

Aumento dos níveis de Ca nos meios de cultivo freqüentemente diminui a absorção de  $Mn^{2+}$  e conseqüentemente sua toxidez (Foy et al., 1978). Alguns autores sugerem que o P também pode diminuir a toxidez de  $Mn^{2+}$  por inativar seu excesso no interior da planta. Heintze (1968) concluiu que o P diminui a toxidez de  $Mn^{2+}$  pela sua precipitação no interior das raízes. Arines et al. (1989) observaram correlação negativa entre a absorção de P e  $Mn^{2+}$ .

Além dos mecanismos de resistência à toxidez de  $Mn^{2+}$  inerentes à planta, existem vários relatos na literatura de que as associações micorrízicas freqüentemente resultam em menores níveis de Mn nos tecidos. A absorção de  $Mn^{2+}$  e suas concentrações na planta nem sempre são afetadas pelos FMA, mas freqüentemente são menores nas plantas micorrizadas (Marschner & Dell, 1994). Cardoso (1996) observou que houve correlação positiva entre teores de P e Mn na parte aérea de plantas não micorrizadas. Entretanto, na presença de micorriza, houve apenas aumento dos teores de P, mas não dos de Mn, os quais permaneceram constantes. A formação da micorriza altera a resposta da planta ao  $Mn^{2+}$ , contudo as bases fisiológicas dessa alteração não são

conhecidas (McGee, 1987; Bethlenfalvay & Franson, 1989; Kothari et al., 1990; Medeiros et al., 1995; Nogueira, 1996). Diferenças genotípicas de algumas variedades de sorgo quanto à capacidade de adaptação a solos ácidos podem estar relacionadas à sua capacidade de formar micorrizas (Marschner, 1995).

Embora a maioria das plantas seja micotrófica, os relatos sobre tolerância de plantas a metais são baseados em experimentos com solução nutritiva, normalmente sem FMA e, quando são feitos a campo, não consideram o endófito como um fator de contribuição (Bethlenfalvay & Franson, 1989). Programas de melhoramento genético visando a obtenção de plantas com maior capacidade de formação de micorriza poderia ser um fator de contribuição, dentre outros benefícios, para o aumento da tolerância a metais, caso típico de programas que visam a obtenção de plantas com maior tolerância ao excesso Al e Mn (Camargo, 1983).

Cardoso (1985) observou que a presença de FMA diminuiu significativamente a concentração de  $Mn^{2+}$  na parte aérea de plantas de soja e sugeriu um papel dos FMA na proteção das plantas contra níveis tóxicos de  $Mn^{2+}$ . Posteriormente McGee (1987) e Bethlenfalvay & Franson (1989) demonstraram a diminuição da toxidez de  $Mn^{2+}$  em plantas micorrizadas. Arines & Vilariño (1989) observaram que baixas doses de P propiciaram aumento da colonização radicular de trevo pelos FMA, o que coincidiu com a menor absorção de  $Mn^{2+}$ . Comportamento semelhante foi observado por Colozzi-Filho & Siqueira (1986) em cafeeiro e por Nogueira & Cardoso (2000) em plantas de soja. Navarro (1989) concluiu que a maior ou a menor concentração de Mn em plantas de soja micorrizadas depende da espécie fúngica a elas associadas, fato também observado por Medeiros et al. (1995) em plantas de sorgo.

Decréscimos na concentração de alguns nutrientes, como o Mn, em plantas micorrizadas são discutidos principalmente em termos do efeito diluição causado pelo maior acúmulo de matéria seca pelas plantas micorrizadas em relação às não micorrizadas (Mamo & Killham, 1987; Mohammad et al., 1995). Porém, em muitos casos, embora a concentração diminua, os resultados não podem ser completamente explicados pelo efeito diluição (Kothari et al., 1990).

É provável que, entre os fatores responsáveis pela menor absorção de  $Mn^{2+}$  pelas

plantas micorrizadas, estejam as mudanças de pH na micorrizosfera, o que altera o estado de oxidação e conseqüentemente a solubilidade do Mn (Pacovsky, 1986). Este mesmo autor sugere que a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  no interior da hifa do FMA deve ser baixa para que não haja precipitação do fosfato mineral ou a complexação e inativação dos fosfatos orgânicos com esses cátions. Portanto, parece ser pouco provável a complexação do  $\text{Mn}^{2+}$  pelo fosfato no interior da hifa.

Bethlenfalvay & Franson (1989) concluíram que, apesar de as plantas micorrizadas não terem apresentado sintomas de toxidez de  $\text{Mn}^{2+}$ , não foi o efeito direto dos FMA que suprimiu os sintomas, uma vez que os teores de Mn na planta aumentaram com o aumento da colonização. Os autores sugeriram que a maior produção de exsudatos radiculares de baixo peso molecular pelas plantas não micorrizadas estaria envolvida na redução do  $\text{MnO}_2$  a  $\text{Mn}^{2+}$  disponível, além de que a quelação do  $\text{Mn}^{2+}$  por estes exsudatos poderia aumentar sua absorção pelas plantas. De fato, maiores teores de  $\text{Mn}^{2+}$  disponível foram encontrados no substrato cultivado com plantas não micorrizadas. Os FMA e microrganismos rizosféricos podem influenciar seu mútuo desenvolvimento e exercer efeitos combinados sobre o crescimento das plantas (Meyer & Linderman, 1986a,b). Segundo Kothari et al. (1990), os FMA alteram a liberação desses compostos orgânicos pelas raízes das plantas e em conseqüência alteram a atividade microbiana da rizosfera, a qual estaria relacionada à disponibilidade do Mn. Resultados de Godo & Reisenauer (1980) esclareceram que os exsudatos radiculares de plantas de trigo crescendo em condições estéreis aumentaram a solubilidade do  $\text{MnO}_2$ . Diferentes espécies de plantas, bem como genótipos dentro da mesma espécie influenciam qualitativa e quantitativamente a comunidade microbiana da rizosfera através de alterações qualitativas e quantitativas dos exsudatos radiculares (Rengel, 1997). Esses resultados demonstram que a disponibilidade do  $\text{Mn}^{2+}$  na rizosfera também foi influenciada pela interação planta-microrganismos, o que afetou tanto os exsudatos radiculares, quanto as comunidades microbianas associadas.

Kothari et al. (1991) observaram que a colonização de plantas de milho pelos FMA diminuiu o potencial de redução do  $\text{Mn}^{4+}$  e a quantidade de  $\text{Mn}^{2+}$  na rizosfera. Embora a comunidade microbiana total tenha sido similar nas plantas micorrizadas e não

micorrizadas, o número de microrganismos redutores de Mn foi trinta vezes menor nas plantas micorrizadas, indicando alterações substanciais na comunidade microbiana da rizosfera quando os FMA estão presentes. Mudanças qualitativas na comunidade microbiana da rizosfera induzida pelos FMA podem ocorrer através de efeitos indiretos na fisiologia do hospedeiro e mudanças na exsudação das raízes (Graham et al., 1981; Meyer & Linderman, 1986b; Arines et al., 1989; Nogueira, 1996) ou exsudatos fúngicos (Paulitz & Linderman, 1989). Bromfield (1978), avaliando a absorção de  $Mn^{2+}$  por plantas de aveia cultivadas em solução nutritiva na presença de bactérias oxidantes de Mn, observou que, em condições de pH maior que 6, as bactérias preveniram a absorção excessiva de  $Mn^{2+}$  pelas plantas, enquanto que a valores de pH igual a 5,0 não houve efeitos da presença das bactérias oxidantes. Resta salientar que este experimento foi conduzido em solução nutritiva, sem a presença de FMA, com as limitações apresentadas por Bethlenfalvay & Franson (1989), quando esses endófitos não são considerados em experimentos de nutrição de plantas. Sparrow & Uren (1987) observaram que a oxidação microbiana do  $Mn^{2+}$  foi inibida pelo aumento do pH, concluindo-se que os microrganismos responsáveis pela oxidação nos solos estudados estavam adaptados ao ambiente ácido.

A hifa extramatricial dos FMA tem grande efeito na microbiota do solo, sendo sugerido o termo “efeito micosférico” para descrever o aumento das comunidades microbianas de certos microrganismos próximos às estruturas fúngicas no solo. Tem-se observado que, enquanto alguns grupos de microrganismos são favorecidos pelos exsudatos dos fungos, outros são inibidos (Linderman, 1988). Kothari et al. (1990; 1991) observaram aumento na comunidade microbiana além da região rizosférica, fato esse atribuído à sua extensão além dos 5 mm da superfície radicular, pelo crescimento da hifa fúngica, o que pode ter propiciado substrato adicional (exsudatos e lisados de hifas) para o crescimento de microrganismos específicos.

Pelo fato de que a menor absorção de  $Mn^{2+}$  por plantas colonizadas por uma mesma espécie de FMA somente ocorreu em um tipo de solo, Arines et al. (1989) sugeriram que os FMA podem apresentar um efeito indireto na absorção do  $Mn^{2+}$ , porém este efeito é dependente das características químicas e microbiológicas do solo.

Heggo et al. (1990) observaram que quando o solo de cultivo tinha baixas concentrações de  $Mn^{2+}$ , a presença do FMA aumentou sua absorção pela soja. Contrariamente, quando sua concentração no solo era alta, a presença do FMA suprimiu a absorção, indicando que o efeito do endófito na absorção do  $Mn^{2+}$  depende de sua concentração inicial no solo.

#### **2.4 Tolerância das plantas ao $Mn^{2+}$ e o envolvimento do silício**

O Si é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre. Na solução do solo prevalece a forma  $Si(OH)_4$ , um ácido fraco em solução aquosa (Marschner, 1995), cujo  $pK_1$  é 9,6. Em algumas espécies, sua concentração chega a ser maior que a de macronutrientes como o N e o K. No caso das dicotiledôneas, sua concentração se mantém a menos de 0,1% (Epstein, 1994). Em particular, no caso da soja, sua ausência causa sintomas característicos como a malformação de folhas novas e a redução da fertilidade do grão de pólen (Miyake & Takahashi, 1985). Esses autores classificaram a soja como intermediária quanto à absorção de Si, a qual apresenta quantidade considerável do elemento, quando a sua concentração no meio é alta, além de translocá-lo prontamente das raízes para a parte aérea. Por outro lado, Grothge-Lima (1998) observou que o transporte de Si para a parte aérea da soja ocorreu até um certo limite de adição ao substrato de cultivo, a partir do qual, houve aumento apenas nas raízes, não sendo o mesmo observado para a parte aérea.

Embora não tenha sido demonstrada a sua essencialidade (Marschner, 1995), entre os seus vários efeitos benéficos, o Si influencia a absorção e translocação de vários macro e micronutrientes e frequentemente diminui ou elimina os efeitos adversos do excesso de metais no meio sobre as plantas, especialmente do  $Mn^{2+}$  (Epstein, 1994). Este autor questiona a não inclusão do Si nos experimentos em solução nutritiva, pelo seu papel indireto na nutrição e desenvolvimento das plantas.

Interações diretas entre o Si e o Mn durante a absorção são pouco prováveis, pois o Mn é absorvido como cátion divalente enquanto o ácido silícico ( $Si(OH)_4$ ) é a forma na qual o Si é absorvido e translocado (Horst & Marschner, 1978). Contudo, o

aumento da tolerância das plantas ao  $Mn^{2+}$  pode estar relacionado à maior absorção e distribuição do Si (Foy et al., 1978).

Em seu trabalho clássico, Williams & Vlamis (1957) não observaram sintomas de toxidez de  $Mn^{2+}$  em plantas de cevada que foram cultivadas em solução nutritiva contendo Si, ao passo que as plantas cultivadas na ausência de Si foram severamente injuriadas, embora a concentração de Mn nos tecidos da planta tivesse sido a mesma em ambos tratamentos. Utilizando Mn marcado, esses autores observaram que, na presença do Si, o Mn apresentou distribuição uniforme na lâmina foliar, não formando pontos localizados com alta concentração, o que resultaria nas lesões típicas da toxidez. Posteriormente, Horst & Marschner (1978) observaram a mesma forma de distribuição do Mn na presença e ausência de Si em folhas do feijoeiro. Nesse caso, o nível crítico superior de Mn nas folhas foi de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  sem adição de Si, enquanto que na presença de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de Si o limite foi aumentado para mais de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Kluthcousky & Nelson (1979) observaram que a presença de Si diminuiu a concentração de Mn em folhas novas de soja. Os efeitos tanto do excesso quanto da falta de  $Mn^{2+}$  foram atenuados na presença do Si. Bethlenfalvay & Franson (1989) sugeriram o possível envolvimento do Si na atenuação da toxidez de  $Mn^{2+}$  em plantas de soja micorrizadas. Contudo, na grande maioria dos trabalhos em que se observou a redução da absorção do  $Mn^{2+}$  por plantas micorrizadas, não foram feitas as determinações de Si e a suas possíveis relações com a absorção de  $Mn^{2+}$  e o surgimento de sintomas de toxidez não puderam ser feitas.

Os possíveis mecanismos de aumento da tolerância das plantas ao  $Mn^{2+}$  pelo Si são contraditórios. Enquanto alguns pesquisadores observaram que o Si aumentou a tolerância ao  $Mn^{2+}$  por diminuir sua absorção (Miyake & Takahashi, 1985; Ma & Takahashi, 1990 a, 1990 b), outros demonstraram que, pelo menos em gramíneas, a absorção de  $Mn^{2+}$  não foi diminuída pelo Si, mas houve aumento da tolerância interna (Horiguchi, 1988), resultado da distribuição homogênea do Mn nas folhas, o que preveniu a formação de acúmulos localizados (Horst & Marschner, 1978).

O Si foi benéfico a plantas de melão quando a disponibilidade de P foi alta, reduzindo sua absorção excessiva, o que levaria a distúrbios metabólicos (Marschner et

al., 1990). Em baixa disponibilidade de P no substrato, o Si diminuiu a absorção de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , o que promoveu maior disponibilidade de P no interior de plantas de arroz, uma vez que existe alta afinidade entre P e esses cátions metálicos (Ma & Takahashi, 1990a). Miyake & Takahashi (1985) também observaram que a quantidade de P nas folhas de soja aumentou proporcionalmente ao decréscimo da concentração de Si na solução de cultivo. A presença de Si diminuiu a taxa de transpiração de plantas de arroz inundado, o que foi relacionada com a menor absorção de Ca, visto que existem relatos de que este elemento tem sua absorção e translocação influenciados pela taxa de transpiração. O Si também é depositado nos espaços livres da raiz, o que pode diminuir a absorção de Ca pela diminuição do fluxo apoplástico em consequência de sua precipitação conjunta (Ma & Takahashi, 1993).

O Si fornecido ao solo como ácido silícico não alterou a disponibilidade de P, mas aumentou a produção de matéria seca por plantas de arroz, pela melhor utilização do P, atribuída à menor absorção de  $\text{Mn}^{2+}$ . Conseqüentemente, observou-se um aumento da relação P/Mn na planta, a qual pode indicar melhor o estado nutricional por P, do que a simples avaliação da sua concentração nos tecidos (Ma & Takahashi, 1990b). Horiguchi (1988) também observou que o fornecimento de Si aumentou o conteúdo de Mn nas raízes de arroz e o diminuiu na parte aérea, sugerindo um mecanismo de retenção do excesso de Mn no sistema radicular. Sistani et al. (1997) observaram que o fornecimento de cinzas provenientes da combustão da casca de arroz (27% de  $\text{SiO}_2$ ) causou aumento do teor de Si e diminuição dos teores de Al e Mn em plantas de arroz, sugerindo que estas cinzas poderiam ser utilizadas em solos ácidos para diminuir as possibilidades de toxidez de  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Entretanto, a diminuição dos teores de Al e Mn nas plantas pode não ter sido necessariamente decorrente do aumento da absorção do Si, mas do aumento do pH do solo devido à adição das cinzas, o que diminui a disponibilidade de Al e Mn.

O aumento substancial da absorção de Si por plantas de soja micorrizadas foi observado por Yost & Fox (1982). Com o aumento das doses de P, observou-se que a absorção de Si diminuiu, o que foi atribuído à menor colonização radicular causada pela maior disponibilidade de P e a um efeito antagônico do P sobre o Si durante a absorção

pelas raízes. Entretanto, os autores não correlacionaram nas plantas a colonização radicular, a absorção de Si e o conteúdo ou concentração de Mn, o qual não foi determinado.

Além do envolvimento do Si como atenuador de estresses abióticos, vários trabalhos têm relatado seu papel como atenuador de estresses bióticos, principalmente os causados por fungos fitopatogênicos (Chérif et al., 1994b). Em alguns casos, o aumento da resistência a patógenos das plantas que receberam Si foi atribuído ao acúmulo e deposição de Si nas células epidérmicas das plantas, o que pode resultar na formação de uma barreira física à penetração da hifa do patógeno (Samuels et al., 1991). Entretanto, existem observações de que o Si pode induzir a resistência de plantas às doenças de forma sistêmica, por meio de estímulo da planta à produção de fitoalexinas, as quais são mecanismos bioquímicos de proteção da planta contra patógenos (Chérif et al., 1994a). Seja qual for o mecanismo de aumento de resistência das plantas à penetração do patógeno, surge a especulação sobre até que ponto poderia haver efeito negativo do Si sobre a simbiose micorrízica pela restrição da penetração da hifa do fungo nas raízes do hospedeiro, já que não existem trabalhos na literatura que relatam esta questão até o momento.

### **3 EFICIÊNCIA MICORRÍZICA E TOXIDEZ DE MANGANÊS EM SOJA EM FUNÇÃO DO TIPO DE SOLO E DA ESPÉCIE DO ENDÓFITO**

#### **Resumo**

Avaliou-se a eficiência de três espécies de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus macrocarpum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*, e um controle sem FMA), em 4 épocas de coleta (3, 6, 9 e 12 semanas após a emergência das plântulas) e em dois tipos de solo (NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico e NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico). O objetivo específico deste estudo foi gerar informações para nortear a instalação dos demais experimentos, como, por exemplo, a espécie mais eficiente em promover o crescimento das plantas e atenuar os sintomas de toxidez de Mn. No substrato arenoso, a micorrização das plantas com cada espécie de FMA resultou em aumento da produção de biomassa em relação ao controle, com destaque para *G. intraradices* e *G. etunicatum*. Observou-se menor concentração de Mn na parte aérea nas plantas micorrizadas, mas não houve sintomas de toxidez, mesmo no controle. No substrato argiloso, nos tratamentos com *G. intraradices* e *G. etunicatum*, houve aumento da produção de biomassa das plantas. A inoculação das plantas com FMA resultou em aumento da concentração de Mn nos tecidos da planta e do Mn disponível no substrato de cultivo em relação ao controle, com mais intensidade no tratamento com *G. macrocarpum*. Nesse caso, houve sintomas de toxidez de Mn e redução da produção de biomassa das plantas, em relação ao tratamento controle. Essas observações foram mais expressivas entre 9 e 12 semanas.

### **Summary: MYCORRHIZAL EFFECTIVITY AND MANGANESE TOXICITY IN SOYBEAN IN RESPONSE TO SOIL TYPE AND SPECIES**

The effectivity of three arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) species (*Glomus macrocarpum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*, and a control without AMF) was evaluated in two soil types (Typic Rhodudalf and Quartzipsamment), in a time-course experiment (3, 6, 9 and 12 weeks after the seedling emergence). The objective was to select the most effective AMF species in promoting plant growth and in lessening Mn toxicity symptoms. In the sandy substrate, the inoculation of the three AMF species resulted in an increased plant biomass production in relation to the control, with better results for *G. intraradices* and *G. etunicatum*. Lower Mn concentrations were observed in the shoots of mycorrhizal plants, but there were no Mn toxicity symptoms, even in the control plants. In the clay substrate, there was also an increase of plant biomass production, but only plants with *G. intraradices* and *G. etunicatum*. AMF inoculated plants presented higher Mn concentrations in shoots and roots and there was an increase of available Mn in the substrate, in relation to the control, especially in the substrate that received *G. macrocarpum*. In this case, there were very severe symptoms of Mn toxicity in plants and reduced biomass production when comparing to the control plants. Mn toxicity symptoms were most intensive between 9 and 12 weeks.

### **3.1 Introdução**

Micorrizas arbusculares são simbioses mutualísticas que ocorrem entre fungos da ordem *Glomales* e as raízes de mais de 90% das plantas vasculares, constituindo uma regra na natureza, resultado de milhões de anos de co-evolução. São vários os benefícios auferidos pelas plantas em decorrência das associações micorrízicas, sendo que o micélio externo dos FMA funciona como uma extensão do sistema radicular, aumentando sua capacidade de explorar o solo para além da zona rizosférica (Li et al., 1991) e por isso tornando a planta mais eficiente em obter do solo os nutrientes

de baixa mobilidade, como o P e o Zn. Além do aspecto nutricional, outros aspectos importantes também são relevantes nas associações micorrízicas, como o aumento da tolerância das plantas a patógenos (Sylvia & Williams, 1992), estresses iônicos (Cardoso, 1996; Nogueira & Cardoso, 2000) e hídricos (Hardie, 1985). Entretanto, dependendo da interação solo-fungo-hospedeiro, os efeitos poderão ser diferenciados ou mesmo negativos (Nogueira & Cardoso, 2000).

Embora não haja especificidade para a penetração do fungo micorrízico nos tecidos do hospedeiro, a colonização e a resposta de crescimento da planta dependem da interação do sistema simbiote com as mais variadas condições, tais como: luz (Hayman, 1974; Bethlenfalvay et al., 1982b), temperatura (Hayman, 1974), tipo de solo (Cardoso, 1986; Lambais & Cardoso, 1988), espécie ou isolado do fungo (Lambais & Cardoso, 1990; Paula et al., 1990; Nogueira & Cardoso, 2000), pH (Lambais & Cardoso, 1988), planta hospedeira (Abbott & Robson, 1981; Fernandes et al., 1987) e sua fase de desenvolvimento (Bethlenfalvay et al. 1982c). Em função das interações governadas pelos fatores anteriormente descritos, decorre a observação de que nem sempre há correlação entre o grau de colonização radicular por fungos micorrízicos e sua eficiência em promover o crescimento do hospedeiro (Graham et al., 1982; Cardoso, 1986; Allen, 2001).

No que se refere ao fungo micorrízico, a falta de relação entre a infectividade e a eficiência do fungo em promover o crescimento do hospedeiro pode estar relacionada com o tempo necessário ao estabelecimento da colonização radicular, sobretudo nas culturas anuais (Abbott & Robson, 1981). Nogueira & Cardoso (2000) observaram que a espécie *Gigaspora margarita*, além de apresentar mais lentidão ao estabelecer simbiose com soja, também produziu menor quantidade de micélio externo total em comparação com *Glomus intraradices*, o que provavelmente limitou a resposta da planta à micorrização por esta espécie, resultando, dependendo da fase do ciclo da cultura, em depressão de crescimento em relação ao controle não micorrizado. Como as respostas de crescimento das plantas podem variar no decorrer do ciclo da cultura, conclusões errôneas poderão surgir em experimentos de curta duração, em que os fungos micorrízicos que se estabelecem mais lentamente não têm tempo hábil para auxiliar no

crescimento de seu hospedeiro.

O crescimento do hospedeiro pode variar também com a proporção entre o micélio fúngico interno e externo (Abbott & Robson, 1981). Dessa forma, respostas negativas do crescimento do hospedeiro ou parasitismo, podem ser resultado de um grande crescimento interno do fungo na ausência de suficiente crescimento externo para explorar o substrato (Bethlenfalvay et al., 1982a).

Uma vez que tanto a infectividade quanto a eficiência simbiótica dos diferentes fungos variam entre as várias combinações fungo-planta-ambiente, surge a necessidade de se selecionar aquelas interações mais eficientes para as condições desejadas (Paula et al., 1988). Esse estudo inicial teve a finalidade de identificar uma espécie de fungo micorrízico mais eficiente em promover o desenvolvimento da soja e suprimir os sintomas de toxidez de Mn em dois tipos de substrato: um arenoso, com baixa disponibilidade de Mn natural e outro argiloso, com alta disponibilidade de Mn natural.

### **3.2 Material e Métodos**

O experimento foi instalado em 21/09/98, em vasos com 4 kg de terra esterilizada por autoclavagem por 2 h a 121 °C. Os tratamentos foram: inoculação com três espécies de FMA (*Glomus macrocarpum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*) e um controle não inoculado; dois tipos de solo: arenoso [camada 0-20 cm de um solo classificado como NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico (Embrapa, 1999), contendo 830, 40 e 130 g kg<sup>-1</sup> de areia, silte e argila, respectivamente - Typic Quartzipsamment (Estados Unidos, 1975)] e muito argiloso [camada 0-20 cm de um solo classificado como NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico (Embrapa, 1999), contendo 250, 150 e 600 g kg<sup>-1</sup> de areia, silte e argila, respectivamente - Typic Rhodudalf (Estados Unidos, 1975)]; quatro épocas de colheita (3, 6, 9, 12 semanas após a emergência das plântulas), em seis repetições (192 vasos). A escolha das três espécies de FMA baseou-se em estudos anteriores nos quais estas se apresentaram eficientes em promover o

desenvolvimento da soja, bem como atenuar os sintomas de toxidez de Mn (Cardoso, 1986; Nogueira & Cardoso, 2000).

A adubação do substrato argiloso (assim será denominada a terra após autoclavagem) foi feita com base nos resultados de sua análise química realizada no Laboratório de Análise de Solos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, após a autoclavagem (Tabela 1). Não houve necessidade de calagem, nem da adição de K ( $312 \text{ mg dm}^{-3}$ ) e S ( $14 \text{ mg dm}^{-3}$  de  $\text{S-SO}_4$ ), teores considerados altos (Raij et al., 1996). O fornecimento de N foi feito via fixação biológica, inoculando-se as plântulas no momento da emergência, com 4 mL de suspensão de células de *Bradyrhizobium elkanii*, deixada a crescer por cinco dias. As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, previamente testadas quanto à sua eficiência em soja, foram fornecidas pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura. A adubação com P foi feita com base em resultados obtidos por Nogueira & Cardoso (2000), visando favorecimento das condições micotróficas, de modo a se tentar atingir um valor de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de P disponível. Para isso, os cálculos foram feitos descontando-se os  $13 \text{ mg kg}^{-1}$  determinados pela análise química, fornecendo-se 51 mg de P por vaso na forma de superfosfato triplo moído ( $<0,75 \text{ mm}$ ). Quanto aos micronutrientes, somente foram adicionados B ( $0,48 \text{ mg/vaso}$  na forma de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) e Mo ( $0,15 \text{ mg/vaso}$  na forma de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), ambos em solução, de modo a elevar o teor inicial para um nível considerado alto (Raij et al., 1996).

A calagem e adubação do substrato arenoso foram calculadas com o intuito de se aproximar ao máximo das condições observadas para o substrato argiloso, no que se refere aos teores de nutrientes disponíveis. A calagem foi feita com base no método da saturação por bases (Raij et al., 1996), visando-se um V% final de 87 (valor observado no substrato argiloso) pela adição de  $3,7 \text{ g/vaso}$  de calcário dolomítico, PRNT 131%. O P foi fornecido da mesma forma que para o substrato argiloso, adicionando-se  $83,25 \text{ mg}$  de P/vaso na forma de superfosfato triplo. O K e o S foram fornecidos, descontando-se os teores encontrados nesse substrato do valor existente no substrato argiloso, o que resultou na adição de  $1,67 \text{ g}$  de KCl/vaso e  $65 \text{ mg/vaso}$  de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Os micronutrientes foram fornecidos para a elevação de seus teores a

valores considerados altos (Raij et al., 1996), fornecendo-se 1,17 mg B/vaso ( $H_3BO_3$ ); 1,5 mg Cu/vaso ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ); 0,9 mg Zn/vaso ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ); 0,15 mg Mo/vaso ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ). Não foram adicionados Fe e Mn nos dois substratos.

Tabela 1. Características químicas dos substratos utilizados no experimento antes (A) e depois (D) da autoclavagem. NQ = NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico; NV<sub>e</sub> = NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico

amostra	pH	M.O. CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	P mg dm <sup>-3</sup>	S-SO <sub>4</sub> mg dm <sup>-3</sup>	----- mmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup> -----				-----			V	m	
					K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	T			-- % --
NQ	A	3,9	14	2	8	0,5	3	1	9	47	4,5	52	9	67
	D	3,8	14	3	10	1,1	5	3	8	38	9,1	47	19	47
NV <sub>e</sub>	A	5,5	28	14	11	5,8	48	19	0	25	73,8	98	74	0
	D	6,2	29	16	14	8,0	82	27	0	18	117	135	87	0

		micronutrientes				
		B	Cu	Fe	Mn	Zn
		----- mg dm <sup>-3</sup> -----				
NQ	A	0,40	0,5	75,6	3,6	1,1
	D	0,21	0,3	124,0	9,8	0,9
NV <sub>e</sub>	A	0,70	7,9	10,8	35,8	3,5
	D	0,44	8,8	8,4	365,0	5,1

A infestação do substrato com cada espécie de fungo micorrízico foi feita com uma suspensão de esporos extraídos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), provenientes de vasos de multiplicação em *Brachiaria decumbens*, seguido de centrifugação em solução de sacarose 70%. O volume de cada suspensão foi ajustado de modo a possibilitar a obtenção de cerca de 240 esporos ao pipetar 5 mL, os quais foram incorporados nos cinco cm superficiais do substrato. Visando o restabelecimento da comunidade microbiana nos substratos, exceto quanto aos FMA, foram adicionados a todos os vasos, 5 mL de um “filtrado” proveniente dos vasos onde foram multiplicados os inóculos de FMA. Para isso, tomaram-se 100 mL de solo de cada vaso de multiplicação, inclusive vaso controle, adicionando-os conjuntamente em um volume de 1 L de água, sob agitação vigorosa. Em seguida, a suspensão foi passada por uma seqüência de peneiras com malhas decrescentes, sendo a última de 44 µm, com a finalidade de reter propágulos de FMA, cuja ausência no efluente foi confirmada sob

microscópio estereoscópio.

A semeadura foi feita com a cultivar IAC-8 após desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio (produto comercial) a 25% por 5 minutos, removendo-se o excesso por vários enxágües. Foram semeadas cinco sementes por vaso, desbastando-se para 1 plântula por vaso, sete dias após a emergência. O uso desse cultivar de soja baseou-se em resultados de estudos anteriores (Navarro, 1989) em que foi observada susceptibilidade moderada da mesma ao excesso de Mn, bem como efeito positivo da micorrização na atenuação dos sintomas de toxidez. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação de setembro a dezembro de 1998 e as plantas receberam irrigações diárias com água destilada, conforme as necessidades.

Em cada época foram colhidos 48 vasos (4 tratamentos com FMA – 3 espécies mais 1 controle; 2 tipos de substrato). As plantas tiveram a parte aérea cortada rente ao substrato, lavada numa seqüência de água destilada, água destilada + HCl 0,01 M e água deionizada e incubada em estufa a 60 °C com circulação forçada de ar para a obtenção da massa do material seco da parte aérea (MSPA). As raízes foram removidas do substrato, lavadas em água de torneira e na mesma seqüência descrita para a parte aérea. Os nódulos foram retirados, contados e submetidos à secagem em estufa a 60 °C para a obtenção da massa do material seco de nódulos (MSN). As raízes foram tratadas de igual maneira para a obtenção da massa do material seco de raízes (MSR). Uma amostra de aproximadamente 0,25 g de raízes secas foi reidratada e submetida aos processos de clarificação e coloração (Phillips & Hayman, 1970) e em seguida determinada a porcentagem de colonização radicular pelos FMA (Giovannetti & Mosse, 1980). O mesmo foi feito com amostras do tratamento controle, para confirmar a ausência de colonização micorrízica.

Após a obtenção da MSPA, MSV, e MSR o material foi moído em moinho com peneira de 60 mesh e preparado segundo Sarruge & Haag (1974) para a determinação dos teores de N, P, K, S, Ca, Mg, K, B, Cu, Fe, Mn e Zn (N por destilação semi-microkjeldahl após digestão sulfúrica e os demais após digestão nítrico-perclórica, sendo o P e B por colorimetria, S por turbidimetria, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica). O Si nos tecidos foi determinado pelo método

de fusão das cinzas do material vegetal com hidróxido de sódio após queima em mufla a 500 °C, seguido de colorimetria do azul de molibdênio (Bataglia et al., 1978). Com 3 semanas não houve material suficiente para a análise de nutrientes nas raízes. Pelo mesmo motivo, N e B também não foram analisados com 6 semanas nas raízes.

O substrato, após a remoção das raízes, foi homogeneizado e duas amostras (cerca de 300 g) foram tomadas. Uma foi armazenada em câmara fria a 5°C para a estimativa do comprimento de micélio externo ativo (MEA) e comprimento de micélio externo total (MET), conforme os métodos descritos por Schubert et al. (1987) e Sylvia (1988), respectivamente, ambos modificados por Melloni & Cardoso (1999). As determinações de MEA e MET foram feitas com amostras em duplicata, utilizando-se a média das duas réplicas. Para garantir a máxima recuperação de micélio externo dos substratos foi feito um prévio teste quanto ao tratamento das amostras com pirofosfato de sódio, um agente dispersante, em concentrações crescentes e tempos de incubação. Foi escolhida a concentração de 20 g L<sup>-1</sup> e um tempo de incubação de 40 minutos, os quais propiciaram a máxima recuperação de MET do substrato argiloso. Quando a diferença entre as duas réplicas foi superior a 10% para a contagem de MET, a determinação foi repetida para aquela amostra. Outra amostra do substrato foi seca ao ar, passada por peneira de 2 mm e submetida à determinação de Fe e Mn disponível no substrato, utilizando-se a solução extratora Mehlich-I (HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 25:2,5, agitados por 15 minutos e filtrados em papel de filtro Whatman número 42), com leitura do extrato em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer modelo 560 equipado com lâmpada adequada para cada elemento. O pH foi determinado conforme Raij & Quaggio (1983) em solução centimolar de CaCl<sub>2</sub>.

Os resultados foram analisados estatisticamente para cada época de colheita como um fatorial 4 x 2 (4 FMA e 2 substratos) através do programa estatístico SAS<sup>®</sup> (The Statistical Analysis System) (SAS, 1991), empregando-se para a comparação entre médias o teste *t* a *P*<0,05. Para a normalização de algumas variáveis, foi necessária a transformação de dados, sendo utilizado  $(x+0,5)^{1/2}$  para número de nódulos e  $\arcsen(x/100)^{1/2}$  para porcentagem de colonização radicular. Essa variável foi analisada como fatorial 3 x 2, visto que o controle (0% de colonização) não foi considerado na

análise.

O cálculo da eficiência micorrízica foi baseado na soma da produção de massa de material seco de raízes, parte aérea e vagens, considerando-se o controle não inoculado como 100%, conforme a seguinte fórmula:

Eficiência micorrízica (%) = [(Massa das plantas micorrizadas – Massa das plantas não micorrizadas)/ Massa das plantas não micorrizadas]\*100

### 3.3 Resultados

A autoclavagem para a eliminação dos propágulos de FMA nativos provocou grande aumento na disponibilidade do  $Mn^{2+}$  no substrato, tendo sido de cerca de 10 vezes no substrato argiloso (de 36 para 365  $mg\ kg^{-1}$ ) e de quase 3 vezes no substrato arenoso (de 3,6 para 9,8  $mg\ kg^{-1}$ ) (Tabela 1).

A produção de massa de material seco pela parte aérea e raízes das plantas (Figura 1), bem como as demais variáveis, foram influenciadas mais expressivamente pelos tratamentos com FMA com 12 semanas. Não houve diferenças significativas quanto à produção de biomassa pela parte aérea entre os tratamentos com *G. etunicatum* e *G. intraradices* no substrato arenoso, embora o primeiro tenha se destacado no substrato argiloso, situação em que o tratamento com *G. macrocarpum* foi prejudicial ao desenvolvimento das plantas. A produção de biomassa de raízes apresentou comportamento semelhante à da parte aérea. O tratamento com *G. macrocarpum* também resultou em redução significativa em relação ao controle, a partir de 9 semanas, no substrato argiloso. Já o tratamento com *G. etunicatum* se destacou em relação aos demais, com maior crescimento de raízes com 12 semanas. No substrato arenoso, o efeito dos FMA sobre a produção de biomassa de raízes só se manifestou na última época de avaliação, com destaque para os tratamentos com *G. etunicatum* e *G. intraradices*, superiores àquelas observadas com *G. macrocarpum* e no controle.

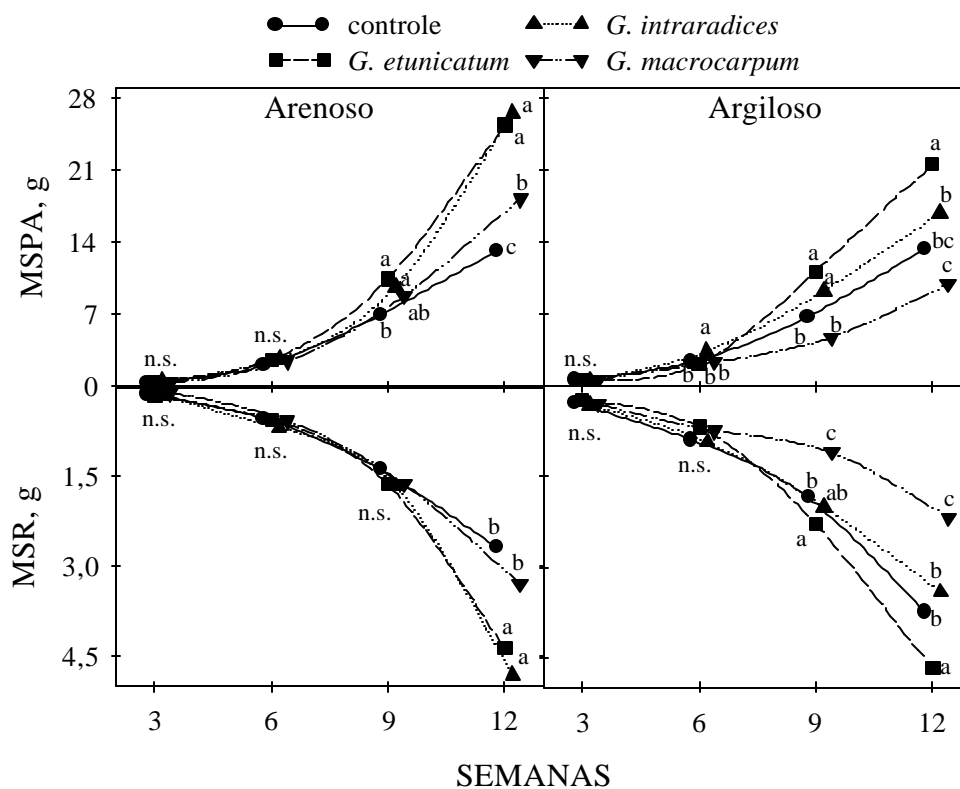


Figura 1 - Massa de material seco produzido pela parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) de plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle), a cada três semanas, em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

No substrato arenoso, com 12 semanas, o tratamento com *G. macrocarpum* propiciou maior crescimento da parte aérea das plantas em relação ao controle, porém menor que os demais tratamentos com os outros dois FMA. No substrato argiloso, embora as plantas tivessem apresentado redução de crescimento, não diferiram estatisticamente do controle, mas apresentaram fortes sintomas de toxidez de Mn. Esses sintomas são caracterizados por folhas encarquilhadas, nervuras e pontos no limbo foliar com coloração pardacenta, além de pouca ramificação lateral, pecíolos curtos, queda de folíolos novos nas brotações laterais, apresentando-se quebradiços na inserção com o pecíolo, além de essas plantas entrarem na fase reprodutiva mais precocemente, possivelmente em consequência do maior grau de estresse sofrido. O aspecto das plantas com 12 semanas é apresentado na Figura 2.



Figura 2 - Aspecto das plantas com 12 semanas, em cada tratamento com FMA em substrato arenoso (A) e argiloso (B). Da esquerda para direita: controle, *G. intraradices*, *G. etunicatum* e *G. macrocarpum*.

Quanto ao número e a massa de nódulos por planta (Figura 3), houve aumentos até a última época, variando, porém, com a espécie de FMA e também com o tipo de solo. No substrato argiloso houve maior amplitude entre essas duas variáveis como resultado dos tratamentos com os FMA. No tratamento com *G. etunicatum* foi observado maior número de nódulos com 12 semanas, enquanto as plantas do tratamento com *G. macrocarpum* apresentaram resultados semelhantes aos do controle. Já no substrato arenoso, o tratamento com *G. macrocarpum* resultou em maior massa de nódulos que o tratamento controle. No momento da desinstalação dos experimentos, alguns nódulos foram cortados com estilete, observando-se em seu interior coloração rósea, resultado da presença da leghemoglobina, indicativo de nódulos ativos em fixar  $N_2$  atmosférico.

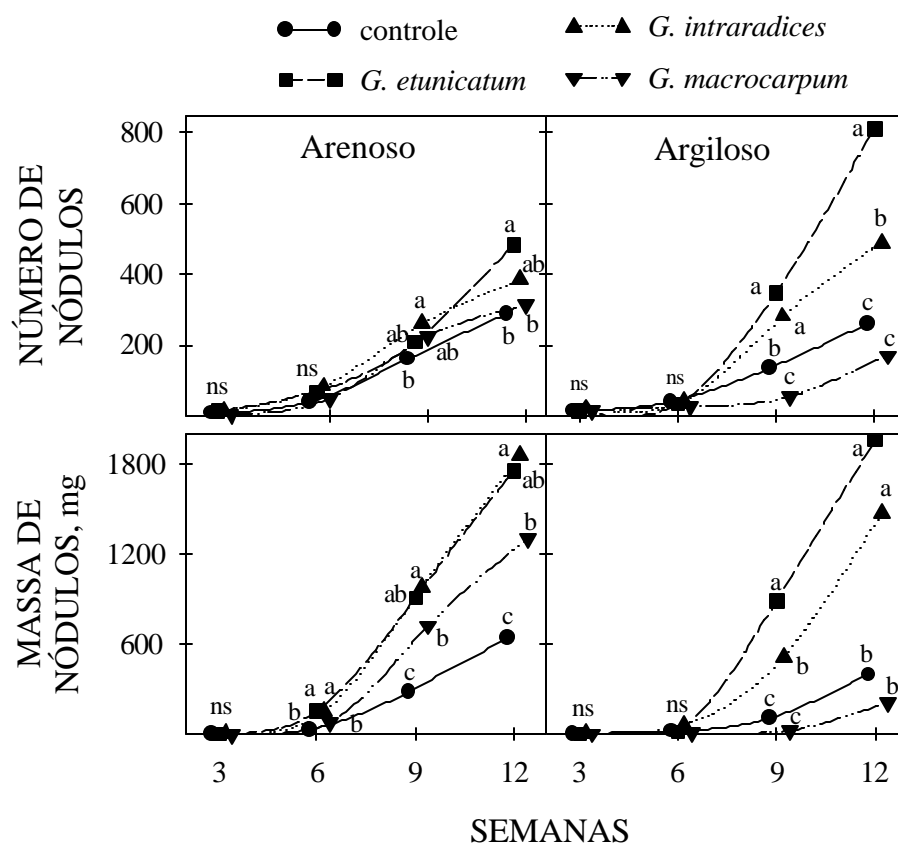


Figura 3 - Número e massa de nódulos obtidos de raízes de plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle), a cada três semanas, em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

Com exceção do P, Cu, Fe e Mn, a concentração dos demais nutrientes não foi influenciada pelos FMA na parte aérea e raízes das plantas com 3 e 6 semanas, havendo apenas efeitos do substrato (Tabelas 2 e 3). Por estarem mais intimamente relacionados com o estudo em questão, o P, o Mn e o Si serão apresentados e discutidos separadamente. Nas semanas 9 e 12, os efeitos dos tratamentos com *G. intraradices* e *G. etunicatum* sobre a concentração de nutrientes foram mais expressivos, em geral com as plantas micorrizadas apresentando maiores concentrações. Entretanto, alguns nutrientes apresentaram menores concentrações, resultado do efeito diluição nas plantas mais desenvolvidas. A concentração de Cu nos tecidos variou durante as épocas de amostragem em relação aos tratamentos com FMA, mas as plantas no substrato argiloso apresentaram maior concentração. O Fe, embora tivesse apresentado tendência de maior teor na parte aérea das plantas cultivadas no substrato arenoso, apresentou comportamento inverso nas raízes. Os teores de Zn, em geral, foram maiores nos tecidos das plantas do substrato argiloso, principalmente no tratamento com *G. macrocarpum*.

Na maioria dos casos, no substrato arenoso, os teores de P foram maiores nos tratamentos com FMA em relação ao controle, tanto na parte aérea quanto nas raízes (Figura 4). Nas plantas do substrato argiloso, o tratamento com *G. macrocarpum* não resultou em aumento nos teores de P dos tecidos, os quais foram semelhantes aos do controle. Por outro lado, nas plantas dos tratamentos com *G. etunicatum* e *G. intraradices*, as concentrações de P foram aumentadas, tanto na parte aérea, quanto nas raízes.

Tabela 2. Concentrações de N, K, S, Ca, Mg, B, Cu, Fe e Zn na parte aérea de plantas de soja micorrizadas (E – *G. etunicatum*; I – *G. intraradices*; M – *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (C - controle), a cada três semanas, em substrato arenoso (A) e argiloso (B)

Nutriente	FMA	3 semanas		6 semanas		9 semanas		12 semanas	
		A	B	A	B	A	B	A	B
N (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	16 b*	22 b	16 b	15 b
	I	.	.	.	.	23 a	15 c	23 a	14 b
	E	.	.	.	.	24 a	17 bc	21 a	24 a
	M	.	.	.	.	21 a	30 a	19 ab	22 a
	μ	39 B**	45 A	23 B	37A	.	.	.	.
K (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	.	.	31 a	10 c
	I	.	.	.	.	.	.	22 b	14 b
	E	.	.	.	.	.	.	23 b	18 a
	M	.	.	.	.	.	.	24 b	11 c
	μ	24 A	14 B	25 A	16 B	20 A	14 B	.	.
S (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	1,4 b	1,5 a	.	.
	I	.	.	.	.	2,0 a	1,6 a	.	.
	E	.	.	.	.	2,1 a	1,6 a	.	.
	M	.	.	.	.	2,0 a	1,5 a	.	.
	μ	2 <sup>NS</sup>	2 <sup>NS</sup>	2 <sup>NS</sup>	2 <sup>NS</sup>	.	.	1,5 B	1,9 A
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	.	.	7 a	7 b
	I	.	.	.	.	.	.	6 a	10 a
	E	.	.	.	.	.	.	6 a	11 a
	M	.	.	.	.	.	.	5 a	11 a
	μ	5 B	9 A	7 B	11 A	6 B	10 A	.	.
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	4,9 a	2,9 b	5,2 a	2,9 a
	I	.	.	.	.	3,4 b	2,7 b	3,8 b	3,0 a
	E	.	.	.	.	4,0 b	2,9 b	3,8 b	3,1 a
	M	.	.	.	.	3,7 b	3,6 a	4,0 b	3,5 a
	μ	5 A	3 B	5 A	4 B	.	.	.	.
B (mg kg <sup>-1</sup> )	C	nd	.	.	.	.	.	34 a	35 b
	I	nd	.	.	.	.	.	32 a	36 b
	E	nd	.	.	.	.	.	34 a	53 a
	M	nd	.	.	.	.	.	35 a	65 a
	μ	.	98	47 B	68 A	37 <sup>NS</sup>	45 <sup>NS</sup>	.	.
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	3 b	6 b	3 b	4 a	3 a	3 c
	I	.	.	5 a	8 ab	5 a	5 a	3 a	5 b
	E	.	.	3 b	9 a	3 b	5 a	3 a	7 a
	M	.	.	4 ab	8 ab	4 ab	5 a	3 a	6 a
	μ	4 B	9 A	.	.	.	.	.	.
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	C	263 ba	117 a	.	.	231 a	74 a	.	.
	I	367 a	101 a	.	.	111 b	72 a	.	.
	E	182 b	92 a	.	.	126 b	72 a	.	.
	M	370 a	65 a	.	.	151 b	76 a	.	.
	μ	.	.	246 <sup>NS</sup>	162 <sup>NS</sup>	.	.	248 A	95 B
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	27 a	36 b	27 a	30 c
	I	.	.	.	.	26 a	39 b	26 a	43 b
	E	.	.	.	.	27 a	41 b	23 a	46 b
	M	.	.	.	.	28 a	55 a	21 a	71 a
	μ	28 B	43 A	31 B	53 A	.	.	.	.

\* Letras minúsculas, no mesmo substrato e época de avaliação, comparam FMA nas interações significativas entre Substrato x FMA.

\*\* Letras maiúsculas comparam médias de FMA (μ) entre Substratos, na mesma época de avaliação, quando a interação Substrato x FMA não foi significativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* ( $P < 0,05$ ); ns = diferença não significativa.

Tabela 3. Concentrações de N, K, S, Ca, Mg, B, Cu, Fe e Zn nas raízes de plantas de soja micorrizadas (E – *G. etunicatum*; I – *G. intraradices*; M – *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (C - controle), a cada três semanas, em substrato arenoso (A) e argiloso (B)

Nutriente	FMA	6 semanas		9 semanas		12 semanas	
		A	B	A	B	A	B
N (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	15 a*	20 b	.	.
	I	.	.	16 a	12 c	.	.
	E	.	.	17 a	17 b	.	.
	M	.	.	16 a	29 a	.	.
	μ	nd	nd	.	.	16 <sup>NS</sup>	16 <sup>NS</sup>
K (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	31 a	26 a
	I	.	.	.	.	22 b	13 b
	E	.	.	.	.	23 b	10 b
	M	.	.	.	.	24 b	27 a
	μ	30 A**	18 B	21 <sup>NS</sup>	20 <sup>NS</sup>	.	.
S (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	2,6 a	3,1 a
	I	.	.	.	.	2,4 ab	2,2 b
	E	.	.	.	.	2,3 ab	2,0 b
	M	.	.	.	.	2,0 b	3,1 a
	μ	3,1 <sup>NS</sup>	3,1 <sup>NS</sup>	2,3 <sup>NS</sup>	2,6 <sup>NS</sup>	.	.
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	μ	1,7 B	2,5 A	1,8 B	2,7 A	1,6 B	2,7 A
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	1,8 a	2,1 a	2,0 a	2,8 a
	I	.	.	1,7 a	1,3 b	1,8 a	1,8 b
	E	.	.	1,6 a	1,9 a	2,0 a	1,2 b
	M	.	.	1,7 a	2,0 a	2,0 a	2,5 a
	μ	1,7 B	1,9 A	.	.	.	.
B (mg kg <sup>-1</sup> )	C	.	.	.	.	35 b	32 b
	I	.	.	.	.	36 b	29 b
	E	.	.	.	.	53 a	29 b
	M	.	.	.	.	65 a	42 a
	μ	nd	nd	31 <sup>NS</sup>	33 <sup>NS</sup>	.	.
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	C	7 a	26 b	.	.	5 a	16 b
	I	9 a	25 b	.	.	5 a	17 b
	E	12 a	42 a	.	.	5 a	23 a
	M	8 a	20 b	.	.	5 a	16 b
	μ	.	.	8 B	18 A	.	.
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	C	1317 ab	4693 a	.	.	.	.
	I	774 b	3325 b	.	.	.	.
	E	1532 a	3445 b	.	.	.	.
	M	1282 ab	3293 b	.	.	.	.
	μ	.	.	1292 B	2802 A	909 B	3197 A
Zn(mg kg <sup>-1</sup> )	μ	21 B	38 A	28 <sup>NS</sup>	39 <sup>NS</sup>	36 <sup>NS</sup>	45 <sup>NS</sup>

\*Letras minúsculas, no mesmo substrato e época de avaliação, comparam FMA nas interações significativas entre Substrato x FMA.

\*\*Letras maiúsculas comparam médias de FMA (μ) entre Substratos, na mesma época de avaliação, quando a interação Substrato x FMA não foi significativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* ( $P < 0,05$ ); ns = diferença não significativa.

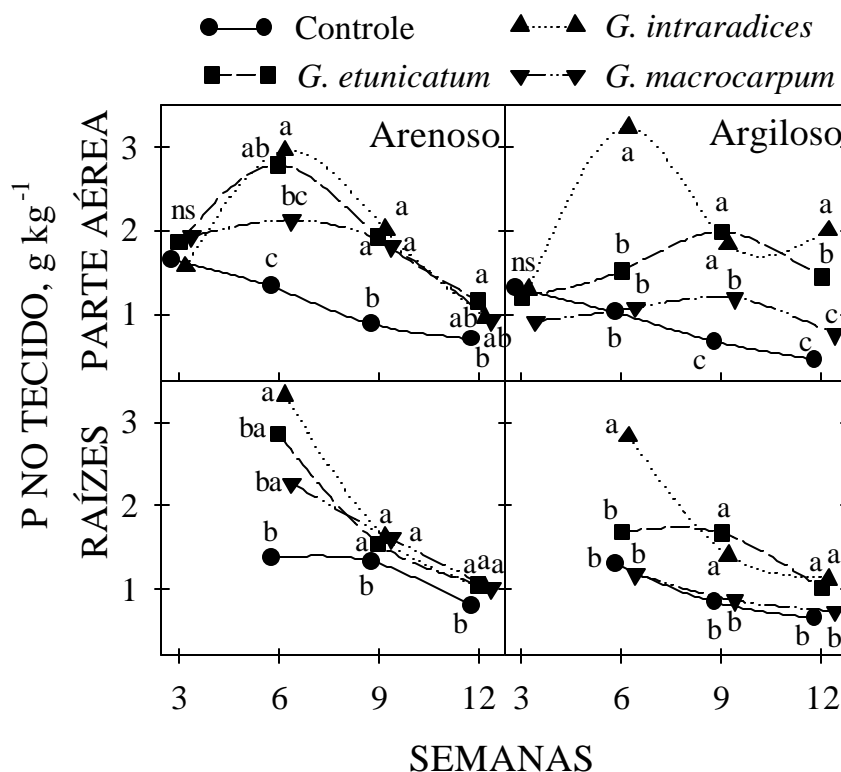


Figura 4 - Concentração de P, a cada três semanas, na parte aérea e raízes de plantas de soja em substrato arenoso e argiloso, micorrizadas e não micorrizadas (controle). Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

A concentração de Mn nas plantas cultivadas no substrato arenoso, tanto na parte aérea, quanto nas raízes (Figura 5), foi maior no tratamento controle. Entretanto, as plantas não apresentaram sintomas de toxidez de Mn, em nenhuma das fases de avaliação. De modo contrário, nas plantas cultivadas no substrato argiloso, os tratamentos com FMA resultaram em maiores concentrações desse nutriente, principalmente no tratamento com *G. macrocarpum*, o que causou sintomas de toxidez nas plantas e provavelmente resultou na redução de seu desenvolvimento (Figuras 1 e 2). Na última época de colheita, os teores de Mn na parte aérea e raízes foram de cerca de 1300 e 3400 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. É interessante ressaltar que, com 6 semanas, era o tratamento com *G. etunicatum* que apresentava os maiores teores de Mn na parte aérea (cerca de 700 mg kg<sup>-1</sup>), época que coincide com o menor desenvolvimento das raízes das plantas desse tratamento (Figura 1) e surgimento de sintomas de toxidez nas folhas.

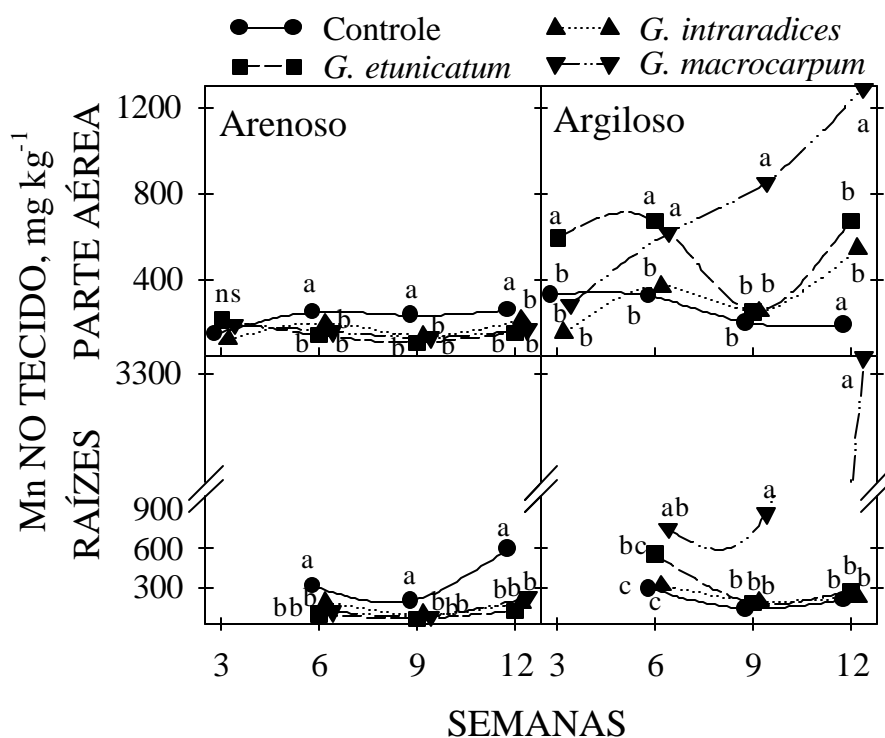


Figura 5 - Concentração de Mn, a cada três semanas, na parte aérea e raízes de plantas de soja em substrato arenoso e argiloso, micorrizadas e não micorrizadas (controle). Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

Os teores de Si na parte aérea e raízes das plantas micorrizadas e não micorrizadas variaram em cada época de amostragem (Figura 6). Não houve efeito da micorrização quanto ao teor de Si na parte aérea das plantas cultivadas no substrato arenoso. Entretanto, esse teor foi muito variável nas raízes, que sempre apresentaram teores superiores aos encontrados na parte aérea; com 12 semanas, o tratamento com *G. macrocarpum* resultou em menores teores de Si nas raízes em relação aos demais tratamentos, inclusive ao controle. Na parte aérea das plantas cultivadas no substrato argiloso, houve alternância dos resultados em cada época, de acordo com o tratamento com os FMA. Com três semanas, não houve diferença significativa entre os tratamentos; com seis semanas o tratamento controle apresentou os maiores teores de Si, ao passo que com doze semanas isso ocorreu nos tratamentos com FMA, com valores significativamente superiores aos do controle. Os efeitos da micorrização na

concentração de Si nas raízes das plantas cultivadas no solo argiloso foram muito sutis e em geral com pouco efeito da presença dos FMA.

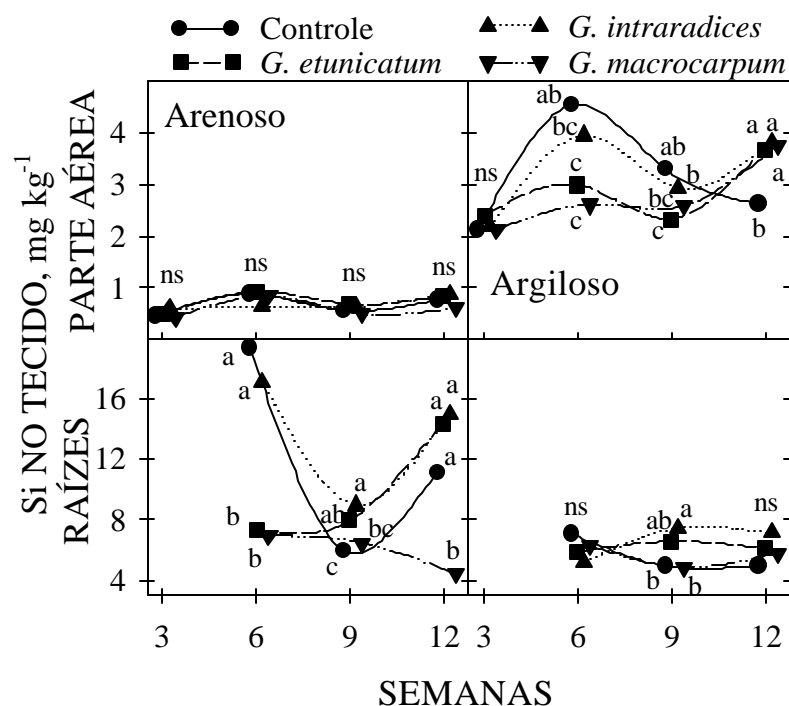


Figura 6 - Concentração de Si, a cada três semanas, na parte aérea e raízes de plantas de soja em substrato arenoso e argiloso, micorrizadas e não micorrizadas (controle). Tratamentos com FMA com letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato. n.s. = diferença não significativa.

Os níveis de colonização radicular atingiram um máximo de 70 % para todos os FMA, com 9 semanas, no substrato arenoso (Figura 7). No substrato argiloso, a colonização radicular também atingiu esse nível nos tratamentos com *G. intraradices* e *G. etunicatum*, mas o tratamento com *G. macrocarpum* resultou em menores níveis de colonização radicular em relação aos demais FMA, a partir de 6 semanas, com valor máximo de 12 % com 9 semanas. Em todos os tratamentos houve um pico de colonização máxima com 9 semanas para em seguida haver uma diminuição dos valores com 12 semanas.

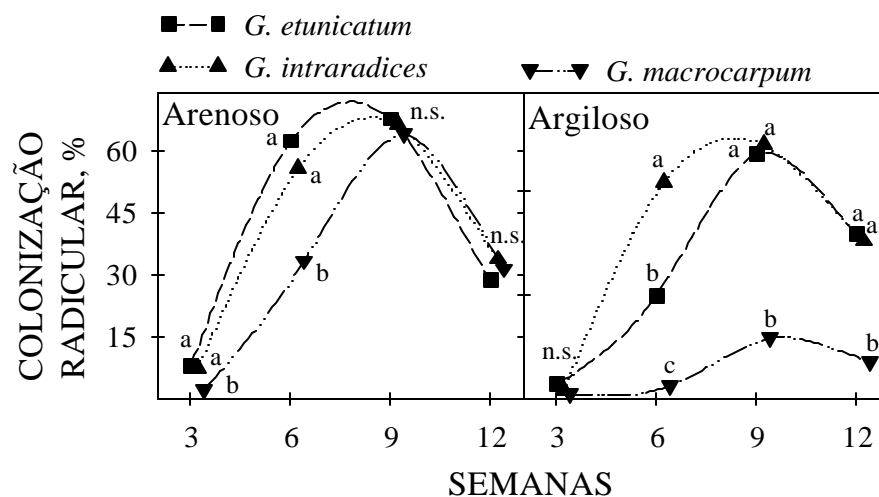


Figura 7 - Porcentagem de raízes de soja colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares, a cada três semanas, em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

A variável MEA, nos tratamentos com FMA no substrato arenoso, apresentou valores semelhantes aos do controle (Figura 8). No substrato argiloso, à exceção do tratamento com *G. macrocarpum*, com 12 semanas, essa variável foi maior nos tratamentos com *G. etunicatum* e *G. intraradices* em relação ao controle. No geral, observa-se que a produção estimada de micélio externo ativo foi maior no substrato argiloso e que houve aumento dos valores com o tempo, principalmente no substrato argiloso.

Nos dois substratos, o MET nos tratamentos com FMA foi maior em relação ao observado no tratamento controle nas duas últimas semanas, com exceção do tratamento com *G. macrocarpum* no substrato argiloso (Figura 9). Os valores estimados nessas duas épocas variaram de 50 a 85  $\text{m g}^{-1}$  de substrato nos tratamentos com *G. etunicatum* e *G. intraradices*. Os valores médios de MET obtidos no substrato argiloso foram maiores que os obtidos no substrato arenoso, mesmo para o tratamento controle.

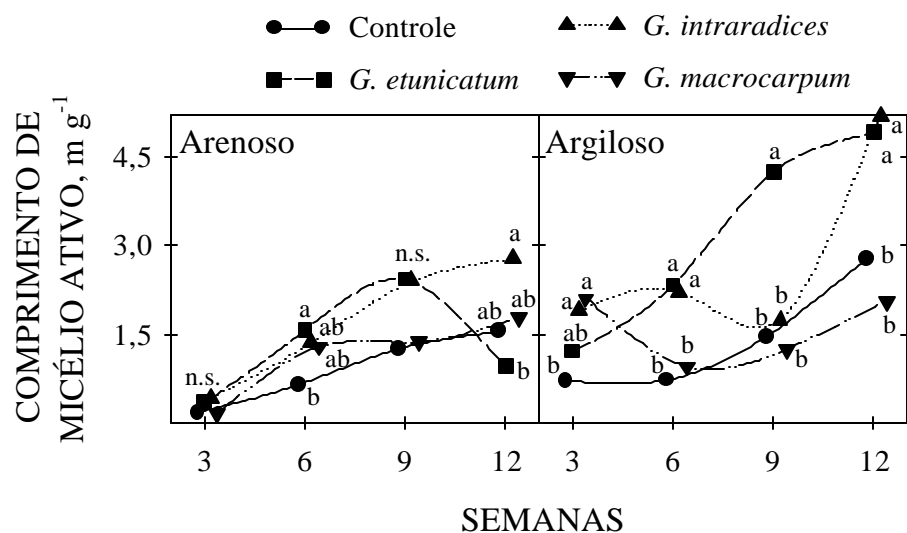


Figura 8 - Comprimento de micélio externo ativo (MEA) obtido a cada três semanas, em substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle) em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

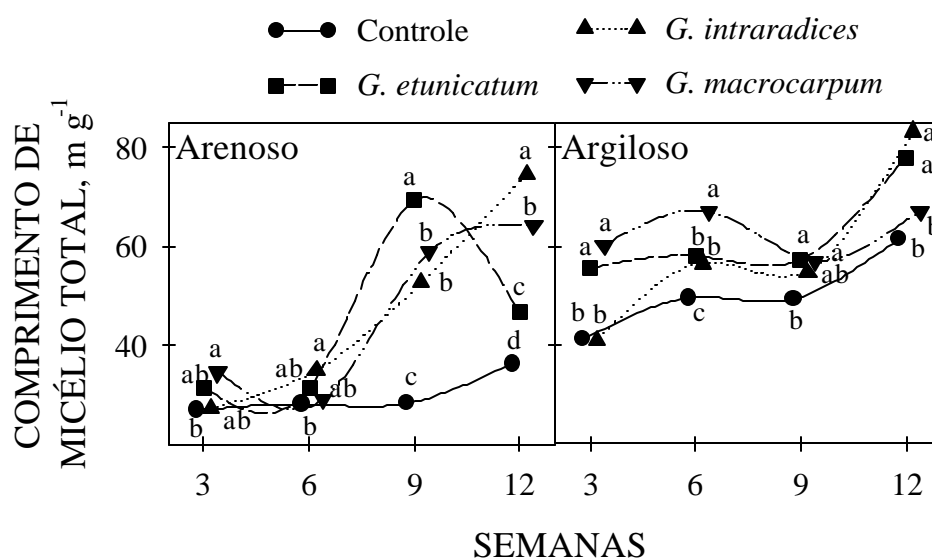


Figura 9 - Comprimento de micélio externo total obtido a cada três semanas, em substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle), em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste  $t$  ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato.

O teor de Fe disponível foi maior no substrato arenoso em relação ao argiloso e sofreu influência dos tratamentos com FMA, com valores variando entre 38 e

46 mg dm<sup>-3</sup> no substrato arenoso e 21 a 25 mg dm<sup>-3</sup> no substrato argiloso, dependendo da época de avaliação e do FMA utilizado (Figura 10). Na maioria dos casos, a micorrização das plantas resultou em aumento da disponibilidade de Fe nos substratos em relação ao controle, mas cada tratamento resultou num padrão diferenciado de aumento da disponibilidade. No substrato arenoso do tratamento com *G. etunicatum* houve a maior disponibilidade de Fe com 6 semanas, o que diminuiu na avaliação com 12 semanas. Já o tratamento com *G. macrocarpum* resultou em comportamento inverso, com uma tendência de nas duas últimas semanas apresentar maiores teores de Fe disponível em ambos substratos, em relação ao controle.

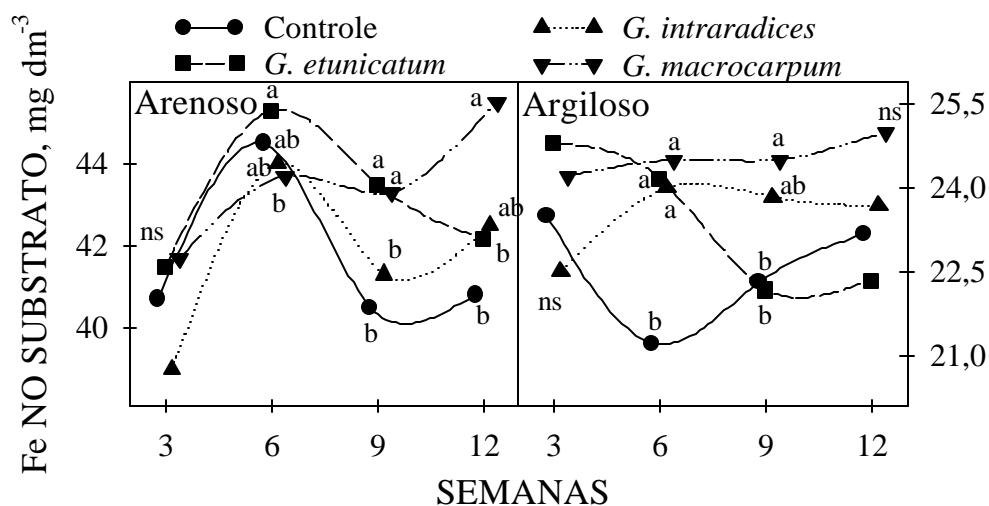


Figura 10 - Ferro disponível, a cada três semanas, em substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle), em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s. = diferença não significativa.

Os teores de manganês disponíveis foram muito altos no substrato argiloso (Figura 11). Enquanto os teores no substrato arenoso variaram de 5 a 8 mg dm<sup>-3</sup>, no substrato argiloso variaram de 84 a 414 mg dm<sup>-3</sup>. No caso do substrato arenoso, não houve efeito da presença dos FMA em relação ao controle sobre a disponibilidade de Mn. Contudo, no substrato argiloso, os efeitos da micorrização foram muito expressivos, especialmente no tratamento com *G. macrocarpum*, o qual resultou em aumento significativo da disponibilidade do Mn em relação ao controle, na maioria das épocas.

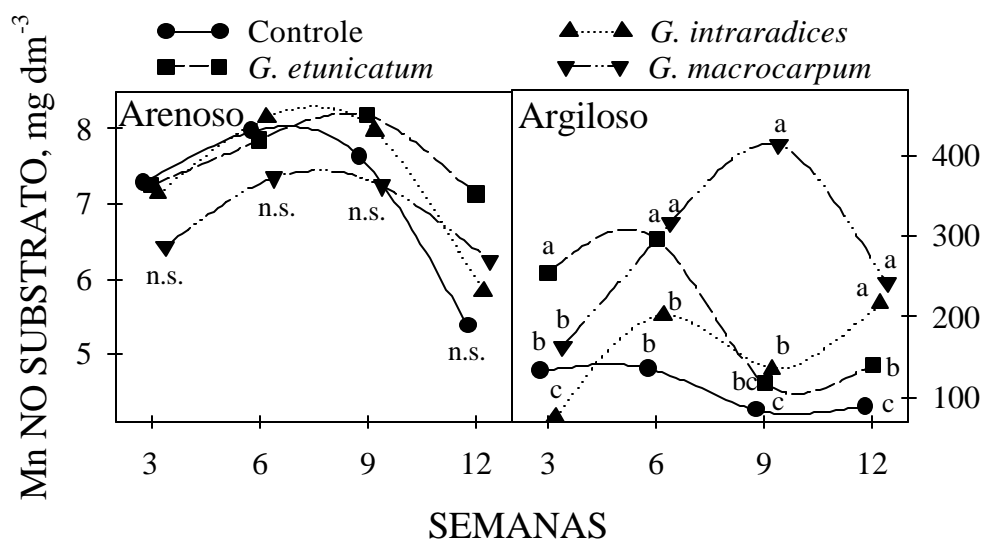


Figura 11 - Manganês disponível, a cada três semanas, em substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle), em substrato arenoso e argiloso. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

Os valores de pH no substrato diminuíram com o tempo de cultivo e de forma geral, foram menores no substrato argiloso (Figura 12). Os valores encontrados no substrato arenoso variaram de 6,3 a 5,6, enquanto que no substrato argiloso variaram de 5,8 a 5,3. Houve efeito da micorrização sobre os valores de pH do substrato, sendo que a diminuição dos valores foi maior nos tratamentos que resultaram no maior desenvolvimento das plantas.

O cálculo da eficiência micorrízica indicou que os tratamentos com as três espécies de FMA no substrato arenoso propiciaram maior desenvolvimento em relação ao controle, exceto na primeira semana quando o tratamento com *G. macrocarpum* resultou em diminuição do crescimento das plantas (Figura 14). A expressão da micorrização sobre o desenvolvimento das plantas foi tanto maior quanto maior a idade da planta. Dependendo do FMA e do substrato, essa eficiência chegou a 200% com 12, semanas, ou seja, as plantas micorrizadas produziram o dobro de biomassa. No substrato argiloso, o tratamento com *G. macrocarpum* foi menos eficiente, resultando, com 12 semanas, em cerca de menos da metade do crescimento observado nas plantas do tratamento controle.

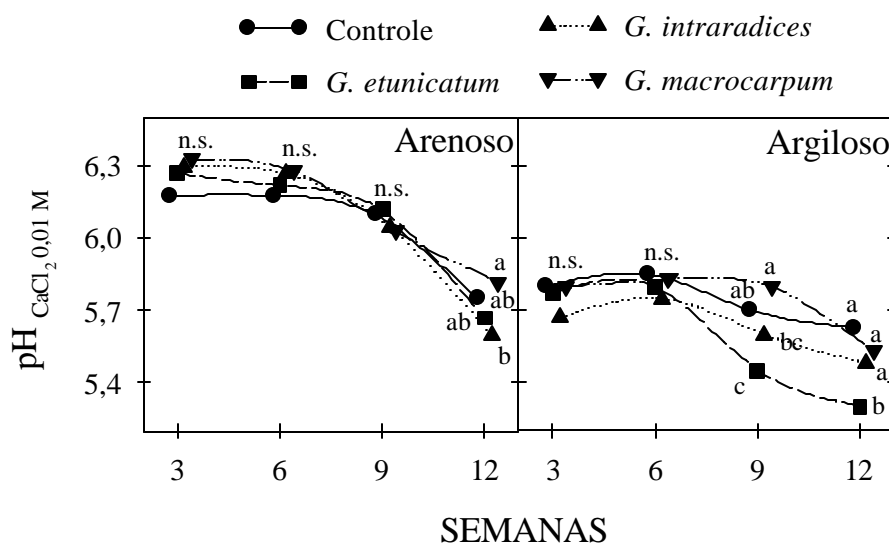


Figura 12 - Valores de pH em solução centimolar de CaCl<sub>2</sub>, a cada três semanas, em substrato arenoso e argiloso cultivados com plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas (controle). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* ( $P < 0,05$ ) dentro de cada época e substrato; n.s.= diferença não significativa.

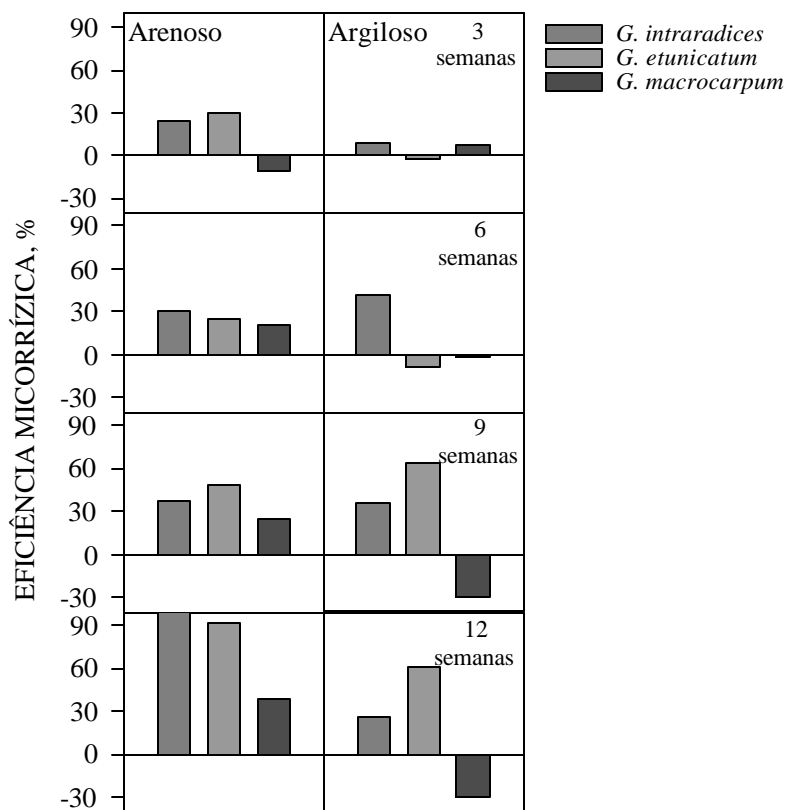


Figura 13 - Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de plantas de soja em relação ao controle não inoculado, a cada três semanas, em substrato arenoso e argiloso.

### 3.4 Discussão

O fato de o tratamento com *G. macrocarpum* ter induzido toxidez de Mn no substrato argiloso (Figura 2) foi surpreendente, pois se esperava que tais sintomas ocorressem no tratamento controle. Em experimentos anteriores, observou-se que esta espécie de FMA, porém não o mesmo isolado, propiciou maior crescimento de plantas de soja e reduziu a concentração e os sintomas de toxidez de Mn em relação ao controle não micorrizado (Cardoso, 1985). Essa observação despertou ainda mais a suspeita de que a manifestação dos sintomas de toxidez de Mn nas plantas micorrizadas, não é um fator intrínseco da espécie de FMA, mas pode ser o resultado de diversas interações tais como a alteração diferenciada da fisiologia do hospedeiro, com possíveis reflexos na alteração da comunidade microbiana da micorrizosfera e nos processos biológicos de oxidação e redução do Mn. Essa hipótese ganha mais importância quando se observa o grande aumento da disponibilidade de Mn no substrato argiloso, no tratamento com *G. macrocarpum* (Figura 11). Nesse substrato, todos os tratamentos com FMA resultaram em aumentos na disponibilidade do Mn, o que refletiu em aumentos de sua concentração na planta (Figura 5). Entretanto, nas plantas dos tratamentos com os FMA *G. etunicatum* e *G. intraradices* também houve maior concentração de P nos tecidos (Figura 4), apesar da maior biomassa das mesmas (Figura 1). A maior concentração de P nessas plantas pode ter propiciado às mesmas, condições de melhor suportar o aumento da disponibilidade de Mn, havendo nesses casos, supressão da expressão dos sintomas de toxidez. Isso pode ter ocorrido pelo aumento da tolerância interna ao Mn (Foy et al., 1978) das plantas melhor nutridas em P, ou mesmo ter havido no interior das plantas reações de precipitação com os íons fosfato, diminuindo suas atividades e em consequência os efeitos danosos. Habte & Soedarjo (1996) observaram que houve formação de compostos de baixa solubilidade entre Mn e P no solo, resultando em  $Mn_3(PO_4)_2$ . Não há evidências de que essas reações de precipitação ocorreram também no interior da plantas desse experimento. Contudo, essa hipótese não pode ser descartada, podendo ter sido um mecanismo de atenuação dos sintomas de toxidez de Mn, já que as plantas micorrizadas com *G. intraradices* e *G. etunicatum*, apresentaram

maiores teores de P. Nesse caso, a determinação do teor total de Mn na planta não fornece informações sobre qual era a atividade dos íons Mn nos seus tecidos. Parte desse Mn poderia estar precipitada por reações com íons fosfato, porém em virtude do processo de digestão nítrico-perclórica todo o Mn pode ter sido solubilizado e quantificado. Análises de microscopia eletrônica com microanálise de raios X poderiam auxiliar a identificar a microdistribuição desses eventuais precipitados no interior das células da planta (Memon et al., 1981).

A disponibilidade de Fe no substrato (Figura 10) também sofreu variações com os tratamentos. A disponibilidade foi maior no substrato arenoso, fato facilmente explicável pelo menor valor de pH encontrado nesse solo (Figura 12). É possível que a presença dos FMA também resulte em alteração da disponibilidade do Fe na micorrizosfera, em função de alterações das comunidades microbianas que fazem sua oxidação e redução, ou ainda sobre alterações na qualidade e/ou quantidade dos exsudatos radiculares, aumentando a produção de substâncias redutoras.

Nas plantas cultivadas no substrato arenoso, em que a disponibilidade de Mn natural era baixa, comparada com a do solo argiloso, houve menor concentração de Mn nas plantas micorrizadas (Figura 5). Esse comportamento pode ser explicado pelo efeito diluição causado pelo maior crescimento das plantas micorrizadas, visto que a diminuição no teor foi proporcional ao incremento da biomassa das plantas. Nesse substrato, o crescimento das plantas foi normal, maior nas plantas micorrizadas, sem que houvesse expressão de sintomas de toxidez de Mn em qualquer tratamento.

A tentativa de justificar a eficiência negativa do FMA *G. macrocarpum* no substrato argiloso (Figura 13) pode encontrar respostas ao se analisar as variáveis referentes ao endófito. As menores produções de MEA e MET observadas no tratamento com *G. macrocarpum* no substrato argiloso (Figuras 8 e 9), aliadas à menor colonização das raízes (Figura 7), podem ter sido os fatores responsáveis pelo menor crescimento das plantas. O menor valor dessas variáveis é um indicativo da falta de adaptação dessa espécie de FMA ao substrato, fato também observado por Nogueira & Cardoso (2000) com outra espécie de FMA em associação com soja, com reflexos negativos na sua eficiência em promover o crescimento do hospedeiro. Há observações de que certas

interações microbianas na rizosfera de plantas micorrizadas também podem resultar em diminuição da micorrização e também do crescimento das plantas quando bactérias antagonistas tornam-se predominantes na rizosfera (Azcón-Aguilar & Barea, 1985; Andrade et al, 1995). Nesta situação, o simbionte apenas foi um dreno de carboidratos do hospedeiro, sem que este se beneficiasse da interação pelo aumento da superfície de exploração do substrato pela micorriza, além de ter resultado no aumento da disponibilidade do Mn no substrato de cultivo. Não é possível afirmar se esse aumento foi devido à alteração da comunidade microbiana de oxidantes e redutores de Mn na rizosfera, em decorrência de alteração da quantidade e qualidade dos exudatos radiculares devido à presença do fungo (Godo & Reisenauer, 1980; Ames et al., 1984), ou foi um efeito direto dos exsudatos radiculares, como a produção de ácidos orgânicos e compostos orgânicos redutores (Graham et al., 1981; Habte & Soedarjo, 1996).

A diminuição do nível de colonização radicular pelos FMA nos dois substratos de 9 para 12 semanas (Figura 7) é decorrente do fato de que neste período houve início da formação de vagens pelas plantas. Isso resulta num dreno de carboidratos mais intenso para as novas regiões de crescimento, em detrimento aos FMA, os quais possivelmente tiveram sua colonização limitada por dispor de menos fontes energéticas para um novo crescimento, como consequência da competição com as vagens em formação. Além disso, houve aumento da massa do sistema radicular até 12 semanas, o que resultou numa “diluição” das raízes colonizadas observadas com 9 semanas. Esse comportamento possivelmente não ocorreria se os resultados de colonização radicular fossem apresentados em valores absolutos de comprimento de raiz colonizada, em vez de valores relativos de porcentagem de raízes colonizadas (Allen, 2001).

Uma interessante observação foi o fato de que, no substrato arenoso, os tratamentos não influenciaram o teor de Si na parte aérea, mas influenciaram grandemente nas raízes, apesar das alternâncias em cada período de amostragem (Figura 6). De modo contrário, no substrato argiloso, a presença dos FMA pouco alterou as concentrações de Si nas raízes, mas apresentou grandes efeitos na parte aérea.

Entretanto, não foi possível observar qualquer relação entre os teores de Si nos tecidos da planta e a manifestação dos sintomas de toxidez de Mn.

Pelos resultados apresentados, observa-se grandes variações nas respostas da planta com relação à micorrização nas diferentes fases de seu desenvolvimento. Plantas avaliadas precocemente, como por exemplo, com seis semanas, teriam respostas à micorrização completamente diferentes daquelas observadas quando as plantas são avaliadas mais tardiamente. Essa constatação é facilmente observada na Figura 13. Nesse caso, ao se considerar a avaliação com 6 semanas, concluir-se-ia que, no substrato argiloso, o tratamento com o FMA *G. etunicatum* causou redução do crescimento das plantas e que o tratamento com *G. macrocarpum* não auxiliou nem prejudicou no desenvolvimento de seu hospedeiro. Entretanto, numa avaliação posterior, como com 12 semanas, observou-se uma inversão do que havia sido observado anteriormente. As plantas micorrizadas com *G. etunicatum* foram as que apresentaram maior crescimento nessa época, ao passo que as micorrizadas com *G. macrocarpum* tiveram seu crescimento reduzido. Essas observações mostram a importância de se avaliar as plantas após estas terem tido tempo suficiente para o estabelecimento da simbiose e da manifestação dos seus benefícios (ou eventualmente, malefícios) na planta.

### 3.5 Conclusões

- A eficiência micorrízica varia em função do endófito, de sua interação com o tipo de solo e da fase de desenvolvimento do hospedeiro;
- Na interação ineficiente, a micorrização pode aumentar a expressão dos sintomas de toxidez no hospedeiro;
- A micorrização das plantas também resulta na alteração da disponibilidade de Fe e Mn no substrato, sem que isto seja resultante de alterações no pH;
- Com base nesses resultados, a espécie de FMA a ser utilizada nos experimentos seguintes será *G. etunicatum*.

#### **4 TOXIDEZ DE MANGANÊS E DEPOSIÇÃO DE CALOSE (β-1,3-GLUCANA) NAS FOLHAS SÃO ATENUADOS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS.**

##### **Resumo**

Plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares podem apresentar atenuação da toxidez de Mn, quando comparadas a plantas não micorrizadas. Sabe-se que a produção de β-1,3-glucana nas folhas tem uma relação direta com o grau de toxidez causada pelo excesso de Mn. Nesse experimento, plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas com *Glomus etunicatum* foram cultivadas em substrato arenoso (NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico) que recebeu doses de 0, 5, 10, 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn e com teor inicial 6 mg kg<sup>-1</sup> (DTPA). Nas folhas velhas a produção de β-1,3-glucana aumentou com as doses de Mn, mas não diferiu nos tratamentos com e sem *G. etunicatum*. Nas folhas jovens, ocorreu o mesmo em relação às doses de Mn, mas em menor intensidade nas plantas micorrizadas. Houve maior concentração de P nos tecidos e de Si nas raízes das plantas micorrizadas. Os sintomas de toxidez de Mn nas plantas micorrizadas ocorreram somente na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup>, já as não micorrizadas os apresentavam na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>. Não houve diferenças quanto à concentração de Mn nos tecidos das plantas micorrizadas e não micorrizadas, indicando que a atenuação da toxidez nas plantas micorrizadas, confirmada pela menor produção de calose nas folhas mais jovens, bem como pelo aspecto visual das mesmas, foi devida à melhoria de seu estado nutricional e aumento da tolerância interna ao Mn. Além disso, também pode estar relacionada com a maior concentração de Si nas raízes.

**Summary: MANGANESE TOXICITY AND CALLOSE ( $\beta$ -1,3-GLUCAN) DEPOSITION IN LEAVES ARE ATTENUATED IN MYCORRHIZAL SOYBEAN.**

Plants colonized by arbuscular mycorrhizal fungi may present Mn toxicity attenuation, compared to non-mycorrhizal plants. It is known that  $\beta$ -1,3-glucan production in the leaves is directly related to the toxicity caused by Mn excess. In this study, soybean plants colonized and non-colonized by *Glomus etunicatum* were cultivated in a sandy substrate (Quartzipsamment by Soil Taxonomy, USDA), and Mn doses of 0, 5, 10, 20 and 40 mg kg<sup>-1</sup> were applied in addition to its natural Mn availability of 6 mg kg<sup>-1</sup>. In the oldest leaves,  $\beta$ -1,3-glucan production increased according to the Mn levels increase, but it did not differ among treatments with and without *G. etunicatum*. Similar results were observed for the younger leaves in relation to Mn addition, but at a lower intensity in the mycorrhizal plants. Evaluation of the mycorrhizal plants revealed higher P concentration in shoots, roots and in younger and older leaves. Si concentration was higher in the roots of mycorrhizal plants. Mn toxicity symptoms in mycorrhizal plants were observed only at the highest Mn level, whereas in the non-mycorrhizal plants these symptoms were seen already at the dose of 10 mg kg<sup>-1</sup>. There were no differences between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants in tissue Mn concentrations. This finding suggests that the Mn toxicity attenuation in mycorrhizal plants, as confirmed by lower callose concentration in the younger leaves and by the plant's healthy appearance, was due to an improvement in plant nutrition and to the increase of the plant's internal tolerance to Mn. It may also be related to the higher Si concentration in the roots.

#### **4.1 Introdução**

O Mn é um dos micronutrientes de plantas que, dependendo de seu conteúdo total no solo e da combinação de fatores que controlam sua disponibilidade,

como pH, Eh, conteúdo de matéria orgânica e atividade microbiana, pode atingir níveis tóxicos (Horst, 1988). Sob essa visão, torna-se fácil concluir que muitos solos tropicais estão sujeitos a essa situação, que leva à diminuição da produtividade das culturas. Em algumas situações, a diminuição da produtividade pode ocorrer sem que haja manifestação visível dos sintomas de toxidez na planta (Arines et al., 1989).

Além dos mecanismos de tolerância ao excesso de Mn inerentes aos vegetais, existem relatos de que a associação micorrízica pode resultar na menor concentração de Mn nas plantas, funcionando como um agente protetor. McGee (1987) e Bethlenfalvay & Franson (1989) observaram a atenuação da toxidez de Mn em plantas micorrizadas. Cardoso (1985) e Nogueira & Cardoso (2000) também observaram que plantas de soja micorrizadas apresentaram menor concentração de Mn na parte aérea quando a colonização radicular pelos fungos micorrízicos foi favorecida. Embora não se conheçam os mecanismos pelos quais isso ocorre, alguns autores sugerem que o P pode diminuir a toxidez de  $Mn^{2+}$  por inativar seu excesso no interior da planta (Foy et al., 1978). Cardoso (1996) encontrou padrões distintos de correlação entre concentração de Mn e P na parte aérea de soja na ausência e presença de micorriza. No último caso, embora houvesse aumento na concentração de P, a de Mn permaneceu constante, menor que o controle não micorrizado.

O Si influencia a absorção e translocação de vários nutrientes e pode diminuir ou eliminar os efeitos adversos do excesso de metais do meio sobre as plantas, especialmente o  $Mn^{2+}$  (Epstein, 1994). Em alguns casos, o Si aumenta a tolerância das plantas ao  $Mn^{2+}$  por diminuir sua absorção; em outros, a absorção de  $Mn^{2+}$  não é diminuída pelo Si, mas há aumento da tolerância interna. Yost & Fox (1982) observaram grande aumento da concentração de Si na parte aérea de plantas de soja micorrizadas. Sob esse aspecto, plantas micorrizadas poderiam ter atenuação da toxidez de Mn pelo aumento da absorção de Si.

O excesso de Mn no tecido foliar induz a formação de calose ( $\beta$ -1,3-glucana), uma reação da planta para isolar a área do tecido que foi lesionada. A concentração de calose extraível das folhas correlaciona-se com a densidade de lesões formadas em consequência da toxidez de  $Mn^{2+}$ , o que pode ser uma técnica sensível para

indicar as respostas da planta ao Mn no tecido (Wissemeier & Horst, 1991). Mesmo antes do surgimento dos sintomas típicos da toxidez de Mn, pode haver aumento da deposição de calose nas folhas da planta (Wissemeier et al., 1992), predizendo as condições de estresse, antes que os sintomas visíveis tenham se manifestado.

Esse trabalho teve o objetivo de avaliar se a micorrização das plantas com a espécie de fungo micorrízico arbuscular (FMA) *G. etunicatum* foi capaz de atenuar os sintomas da toxidez de Mn em substrato arenoso, ao qual foram adicionadas doses crescentes desse micronutriente, até um nível considerado tóxico, e verificar a relação entre a produção de calose e os sintomas de toxidez de Mn nas plantas micorrizadas e não micorrizadas.

## 4.2 Material e Métodos

A escolha da espécie de FMA *G. etunicatum* foi feita com base nas observações apresentadas no capítulo anterior, tendo esta sido uma das que propiciaram o maior desenvolvimento das plantas. Optou-se pelo substrato arenoso [NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico (Embrapa, 1999); Typic Quartzipsamment (Estados Unidos, 1975)] por apresentar baixo teor natural de Mn disponível, o que permitiu a adição de doses crescentes de Mn na forma de sal, para se verificar os efeitos sobre plantas micorrizadas e não micorrizadas. Além disso, o substrato arenoso apresenta menor poder tampão (CTC) e baixo valor de pH (Tabela 1), o que propicia mais  $Mn^{2+}$  disponível na solução e conseqüente efeito nas plantas.

O tratamento para eliminação dos FMA nativos do substrato foi feito por autoclavagem a 121°C por 2 h. Com base nos resultados da análise química do substrato, foi feita a calagem, calculando-se a quantidade de calcário a ser adicionada através do método da saturação por bases (Raij et al., 1996), porém com o objetivo de atingir um valor de 50%, para que o aumento do pH não tornasse indisponível o Mn adicionado. Assim, foi adicionado 1,67 g/vaso de calcário dolomítico PRNT 131%. Após 15 dias de

incubação, foi feita a adubação com P (27,75 mg kg<sup>-1</sup>, na forma de superfosfato triplo moído, < 0,25 mm) e K (136 mg kg<sup>-1</sup> na forma de KCl), misturando-os ao substrato.

Tabela 1. Características químicas do substrato utilizado no experimento (Neossolo Quartzarênico típico – NQ) antes (1) e após (2) a autoclavagem.

amostra	pH CaCl <sub>2</sub>	M.O. g dm <sup>-3</sup>	P S-SO <sub>4</sub>		K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	T	V m		
			mg dm <sup>-3</sup>									mmolc dm <sup>-3</sup>		%
NQ	1	3,8	14	4	5	0,5	5	3	9	38	8,5	47	18	51
	2	3,7	15	2	7	0,5	6	1	9	38	7,5	46	16	55
----- micronutrientes (mg dm <sup>-3</sup> ) -----														
			B		Cu		Fe		Mn		Zn			
NQ	1		0,15		0,1		58,8		4,0		0,5			
	2		0,17		0,1		88,2		6,0		0,7			

Os tratamentos foram: controle não inoculado ou *Glomus etunicatum*, em combinação com 5 doses de Mn (0, 5, 10, 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup>) adicionadas ao substrato na forma de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, em 5 repetições (50 vasos de 4 kg). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5.

A infestação do substrato com o FMA foi feita com 1.600 esporos, obtidos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), do mesmo substrato cultivado com soja no experimento anterior, o qual estava armazenado em câmara fria a 5 °C desde a colheita do mesmo. Todos os vasos receberam 5 mL de um “filtrado” (< 44 µm) proveniente dos vasos de onde foram obtidos os esporos, visando restabelecer a comunidade microbiana, exceto no que se refere aos FMA nos vasos do tratamento controle (vide capítulo anterior).

A semeadura de cinco sementes por vaso da cultivar IAC-8 foi feita no dia 30/05/99, deixando-se duas plantas por vaso depois de uma semana, ocasião em que foram feitas adubações complementares com S (1,55 mg kg<sup>-1</sup> na forma de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), B (0,32 mg kg<sup>-1</sup> na forma de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Cu (0,53 mg kg<sup>-1</sup> na forma de CuO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e Mo (0,04 mg kg<sup>-1</sup> na forma de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), via solução. No momento da emergência, as plântulas receberam 5 ml de suspensão de células de estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*, visando o fornecimento de N às plantas via fixação biológica

Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação com temperatura controlada (mínima de 20°C e máxima de 35°C). Também foi feita uma extensão do fotoperíodo pelo fornecimento de luz artificial incandescente pela manhã, no final da tarde e início da noite, de modo a se ter um fotoperíodo de 14 h.

As plantas foram colhidas para análise aos 80 dias após a emergência, quando se encontravam na fase de formação das vagens. Antes do corte das plantas, o folíolo central do segundo trifólio mais jovem e do segundo trifólio mais velho foram colhidos, pesados e imediatamente imersos em uma solução conservadora (contendo 700 mL de etanol, 50 mL de formaldeído, 50 mL de ácido propiônico e H<sub>2</sub>O q.s.p 1 L), na qual permaneceram até o momento da determinação de calose, realizadas na Universidade de Tübingen – Alemanha, conforme a descrição a seguir: o folíolo armazenado na solução conservadora foi enxaguado com água deionizada e pernoitou em uma solução de etanol 90%. Em seguida, foi enxaguado e incubado por 2 h à temperatura ambiente, em uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Foi novamente enxaguado em água destilada, moído com auxílio de pistilo e almofariz em 10 mL de uma solução de NaOH 1N e o material transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL, submetendo o conjunto à incubação por 15 min em banho-Maria a 80°C para a solubilização da calose. Após centrifugação por 5 min a 380 g, tomaram-se duas alíquotas de 200 µL do extrato alcalino sobrenadante, as quais foram usadas para a quantificação de calose, de acordo com a emissão de fluorescência após reação com anilina azul (Kauss, 1989). Utilizou-se um espectrofluorômetro (marca Kontron, modelo SFM 25; com sensibilidade de 400 volts) contra uma curva padrão de laminarina (Sigma L9634), feita diariamente para cada conjunto de extrato e leitura, a qual é um polímero de origem vegetal constituído de β-1,3-glucana. Para cada amostra foi feito um branco sem anilina azul. Os resultados foram expressos em µg equivalente de laminarina por grama de folha seca em estufa. Um folíolo adjacente àquele utilizado para a determinação de calose foi pesado antes (massa do material fresco) e depois de seco a 60°C em estufa (massa do material seco). Esse procedimento foi usado para estimar a massa de material seco do folíolo usado na determinação de calose.

Um trifólio vizinho àqueles utilizados para a determinação de calose, incluindo pecíolo, foi colhido e usado para análise do teor de macronutrientes, exceto N, e de Cu, Fe, Mn e Zn. A parte aérea remanescente foi moída e submetida à determinação dos macronutrientes e micronutrientes metálicos: N (destilação semi-microkjeldahl) após digestão sulfúrica; P (colorimetria do metavanadato); S (turbidimetria); K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn (fotometria de absorção atômica) a partir do extrato nítrico-perclórico. O teor de Si foi determinado conforme Bataglia et al. (1978). As raízes foram removidas do substrato, lavadas sob água de torneira, solução de HCl 0,01 N e duas vezes em água destilada. Uma amostra de cerca de 0,5 g foi usada para avaliação da colonização micorrízica (Phillips & Hayman, 1970; Giovannetti & Mosse, 1980), inclusive para o controle não inoculado. O material remanescente foi utilizado para estimativa da massa de material seco e determinação da concentração de nutrientes e Si.

Uma amostra do substrato foi armazenada a 5°C com umidade natural até o momento da estimativa do comprimento de micélio externo total (MET) produzido pelos FMA (Schubert et al., 1987; modificado por Melloni & Cardoso, 1999). Nova adaptação foi feita nesse método para facilitar a contagem do micélio externo total. Nesse caso, após a extração descrita por Melloni & Cardoso (1999), a suspensão de micélio foi incubada por 2 h no escuro com uma solução de calcofluor white M2R (Sigma F3397) 2% na proporção de 1:1 (Bloem et al, 1995). Após esse procedimento, realizou-se contagem do micélio sob microscópio de epifluorescência com luz ultravioleta, no aumento de 400x. Outra amostra foi seca ao ar e peneirada (< 2 mm) para determinação dos teores de Mn e Fe disponíveis por fotometria de absorção atômica após extração com a solução Mehlich I (HCl 0,05 + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>) na proporção de 1:10 substrato/solução, agitados horizontalmente por 15 minutos a 250 rpm e filtrados em papel de filtro faixa azul número 42 (Framex<sup>®</sup>). Obtiveram-se, também, os valores de pH em solução centimolar de CaCl<sub>2</sub>, na proporção de 1:2,5 de substrato/solução (Raij & Quaggio, 1983).

Para a determinação de Si no tecido vegetal, inicialmente testou-se o método proposto por Elliot & Snyder (1992) adaptado por Korndörfer et al. (1999), optando-se posteriormente pela determinação de Si em material vegetal pelo método da

fusão de cinzas (Bataglia et al., 1978) modificado, por apresentar melhores resultados. A modificação feita no método foi quanto ao uso do ácido utilizado nos procedimentos de determinação. O método original recomenda o uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , porém, durante os procedimentos, observou-se que este trazia grande contaminação com Si às amostras, resultando em amostras branco com altos valores de leitura de absorbância. Assim, testou-se o HCl, na mesma normalidade, o que resultou em baixas leituras nas amostras branco. Para a determinação de uma reta-padrão de Si, partiu-se de uma solução estoque de Si em ampola contendo  $1000 \pm 0,10$  mg de Si em NaOH (Titrisol, Merck®). O conteúdo da ampola foi diluído em balão volumétrico de 1 L, obtendo-se solução estoque de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a qual foi acondicionada em vários frascos plásticos de 50 mL e congelada a  $-20^\circ\text{C}$ . Os frascos plásticos com a solução estoque foram utilizados um a um, conforme necessário. Pipetaram-se volumes apropriados para se obterem as concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 e  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  em balões volumétricos de polietileno de 100 mL, em duplicata. As leituras de absorbância a 660 nm foram feitas em diferentes intervalos (15 min, 2 h e 15 h), com a finalidade de se verificar a estabilidade do complexo sílico-molibdico de coloração azul. A reprodutibilidade das leituras e a estabilidade do fotolorímetro foram periodicamente aferidas pela inclusão de uma solução padrão de Si de concentração conhecida, normalmente num ponto intermediário da reta padrão. Calcularam-se as concentrações de Si no tecido vegetal, com base na reta padrão, nas diluições, na alíquota de extrato utilizada e na quantidade de tecido vegetal incinerado.

Uma avaliação com um padrão interno foi feita para verificar a precisão do método na recuperação do Si das amostras de tecido vegetal. Pesaram-se 500 mg de uma mesma amostra em cadinhos de níquel com 37 mL de capacidade, em triplicata, às quais foram adicionados volumes da solução estoque suficientes para propiciar concentrações de Si de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  no balão volumétrico de 100 mL no momento da leitura. As mesmas concentrações de Si foram adicionadas em cadinhos de Ni na ausência de tecido vegetal. O volume de líquido nos cadinhos foi ajustado para 2 mL com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada, após o que, foram submetidos à secagem a  $60^\circ\text{C}$  por 50 h em estufa com circulação forçada de ar, antes de se dar prosseguimento à análise.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o procedimento GLM do SAS<sup>®</sup> (The Statistical Analysis System) (SAS, 1991), empregando-se o teste *t* de Student para a comparação de médias dos efeitos entre micorrização e não micorrização sobre as variáveis analisadas, em cada dose de Mn.

### 4.3 Resultados

Os primeiros sintomas de toxidez de Mn foram observados com 30 dias, nas doses de 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, tanto nas plantas micorrizadas, quanto nas não micorrizadas. Com o tempo, as plantas micorrizadas apresentaram maior desenvolvimento, e aos 80 dias, dentre as micorrizadas, apenas aquelas cultivadas no tratamento com 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn apresentaram sintomas de toxidez. As plantas não micorrizadas apresentaram sintomas de toxidez de Mn já na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>. Todas as plantas micorrizadas apresentaram-se mais desenvolvidas em relação às não micorrizadas, em todas as doses de Mn, inclusive no tratamento sem adição de Mn (Figura 1), o que resultou em valores significativamente maiores de massa de material seco da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) (Figura 2). A MSPA das plantas micorrizadas tendeu a aumentar e depois diminuiu com o aumento das doses de Mn, o que indica que o teor natural de Mn naquele solo foi limitante. Nas plantas não micorrizadas, não houve efeito significativo das doses de Mn na produção de MSPA. Esse efeito também não foi constatado nas raízes, tanto no controle, quanto no tratamento com *G. etunicatum*, havendo apenas efeito do FMA.

A determinação dos teores de Fe e Mn e do pH no substrato de cultivo revelou que não houve efeito dos tratamentos sobre a disponibilidade de Fe, com teor médio de 56 mg dm<sup>-3</sup> (não apresentado). Já a disponibilidade de Mn aumentou linearmente com as doses adicionadas, porém sem efeito significativo da presença ou ausência dos FMA. Entretanto, os valores de pH foram diminuídos nos tratamentos com FMA, em todas as doses de Mn em cerca de 0,25 unidade, sem que houvesse efeito das doses (Figura 3).



Figura 1 - Aspecto das plantas com 80 dias, de acordo com as doses de Mn adicionadas ao substrato. Parte superior: plantas não micorrizadas; parte inferior: plantas micorrizadas com *G. etunicatum*.

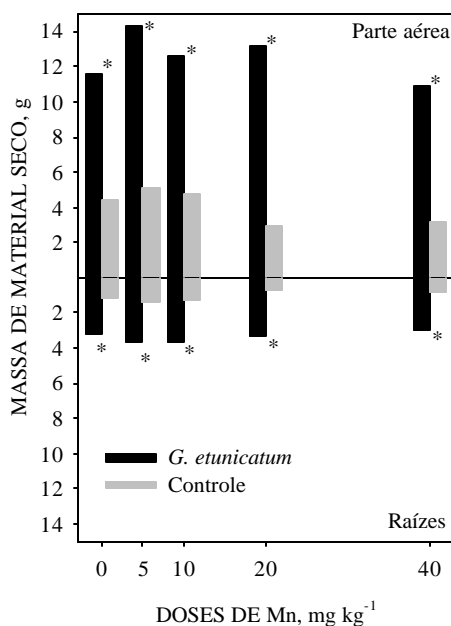


Figura 2 - Massa de material seco da parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

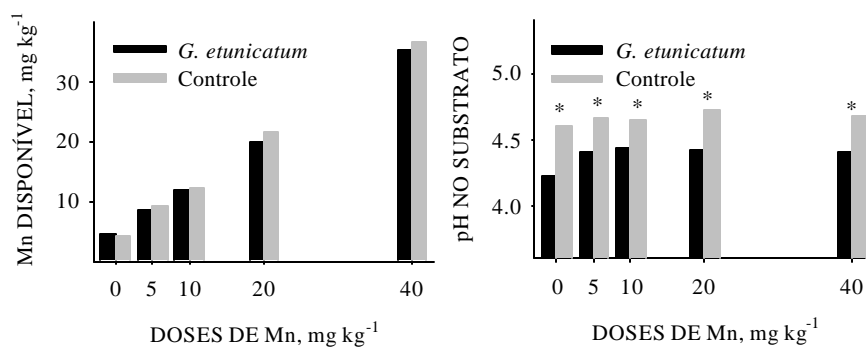


Figura 3 - Mn disponível e pH do substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

A colonização das raízes por *G. etunicatum* foi negativamente influenciada pelo aumento das doses de Mn, demonstrado pelo ajuste do modelo de regressão decrescente (Figura 4). Os maiores valores de colonização radicular foram encontrados no tratamento em que não foi adicionado Mn, da ordem de 55%, com diminuição desse valor para cerca de 30% nas duas maiores doses. De maneira semelhante à colonização radicular, o comprimento de micélio externo total também foi negativamente influenciado pelo aumento das doses de Mn no tratamento com *G. etunicatum*. O ajuste do modelo de regressão indicou diminuição dessa variável, que foi cerca de 41 m g<sup>-1</sup> no tratamento sem adição de Mn, e diminuiu para cerca de 29 m g<sup>-1</sup> na dose de 20 mg kg<sup>-1</sup>. Houve tendência de aumento dessa variável à medida que se tendeu para a dose de 40 mg kg<sup>-1</sup>.

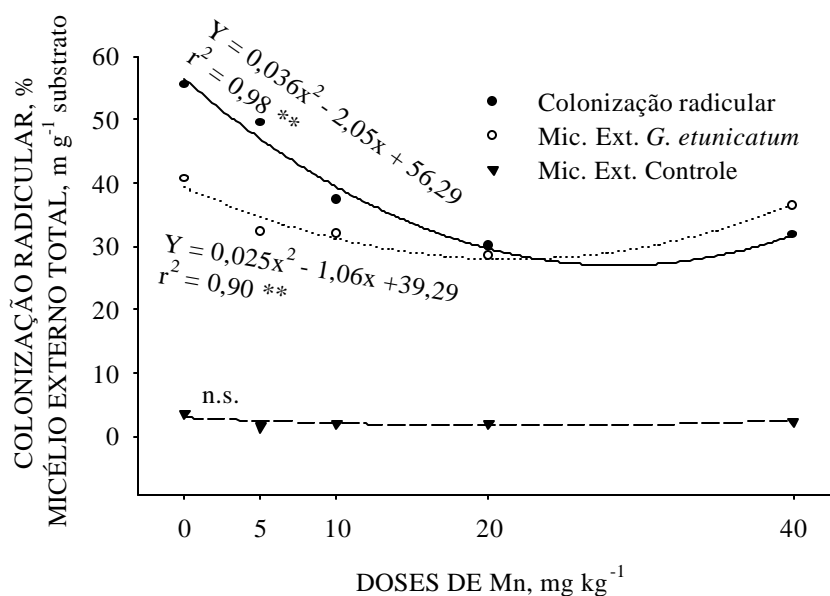


Figura 4 - Colonização radicular por *G. etunicatum* e comprimento de micélio externo em substrato cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), que recebeu doses crescentes de Mn. \*\* = Ajuste de regressão significativo a  $P < 0,01$ ; n.s. = não significativo.

A deposição de calose nas folhas das plantas aumentou com o aumento das doses de Mn (Figura 5). Na segunda folha mais velha, a produção de calose não diferiu entre plantas micorrizadas e não micorrizadas, apresentando aumento da produção com o aumento das doses de Mn. Embora com diferenças não significativas, esses valores tenderam a ser mais altos nas plantas do tratamento controle que nas micorrizadas nas maiores doses de Mn, variando de 11 a 35 mg de calose equivalentes a laminarina por grama de folha seca e 12 a 29 mg g<sup>-1</sup> nas plantas micorrizadas. Quando se analisaram as segundas folhas mais jovens, formadas mais próximo à época de colheita, a produção de calose foi significativamente reduzida nas folhas das plantas micorrizadas, em todas as doses de Mn, variando de 7,5 a 20 mg g<sup>-1</sup> nas plantas do tratamento controle e de 3 a 11,5 mg g<sup>-1</sup> nas micorrizadas. Nesse caso houve interação significativa entre os fatores. Embora as relações entre a deposição de calose nas segundas folhas mais jovens de plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas e as doses de Mn tivessem sido positivas e significativas, os coeficientes angular e linear do ajuste de regressão foram menores para os resultados dos tratamentos micorrizados, mostrando que a formação de micorriza diminuiu a deposição de calose nas folhas mais jovens de soja, o que indica menor nível de estresse causado pelo excesso de Mn. Os resultados dos ajustes de regressão para deposição de calose nas folhas mais jovens foram  $Y = -0,01x^2 + 0,58x + 1,97$  ( $r^2 = 0,72$  a  $P < 0,01$ ) para as plantas do tratamento micorrizado e  $Y = -0,017x^2 + 0,95x + 5,25$  ( $r^2 = 0,69$  a  $P < 0,01$ ) para as do tratamento controle.

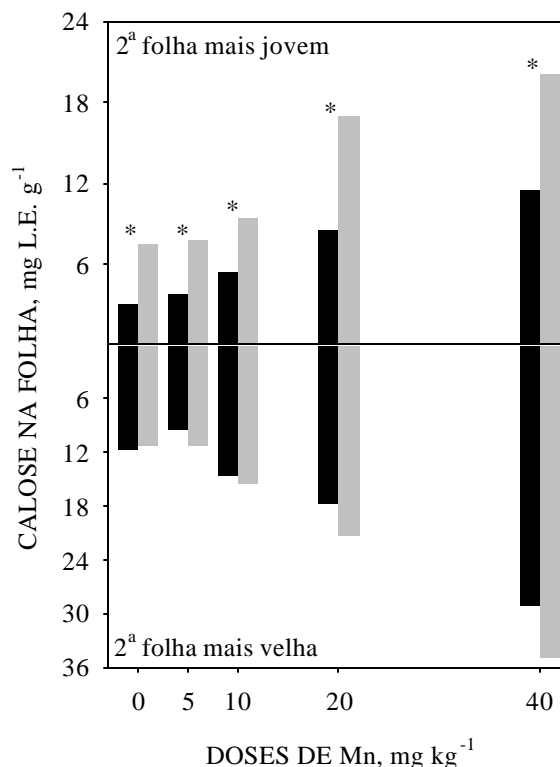


Figura 5 - Produção de calose na segunda folha mais jovem e na segunda folha mais velha de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn. L.E. = equivalente em laminarina.

O teor de N nas plantas não foi influenciado pelas doses de Mn, mas apenas pelos tratamentos com e sem FMA (Figura 6), sendo maior nas plantas dos tratamentos sem FMA. A nodulação das plantas de soja por *Bradyrhizobium elkanii*, representada pela massa seca de nódulos, foi grandemente favorecida no tratamento com *G. etunicatum*. Por serem variáveis intimamente relacionadas, foram apresentadas conjuntamente com o teor de N nas plantas (Figura 6). Apesar de as plantas apresentarem bom desenvolvimento inicial, sem suprimento de N mineral, o que indica que este foi inicialmente proveniente da fixação biológica, passaram a apresentar sintomas de deficiência de N após 40 dias, quando as plantas estavam no florescimento, com amarelecimento generalizado das folhas mais velhas. Diante dessa situação, fez-se necessária a aplicação de N mineral em cobertura, ocasião em que também foi fornecido

K. Com esse procedimento, os sintomas de deficiência foram sanados e as plantas recuperaram sua coloração característica. As duas maiores doses de Mn influenciaram negativamente a produção de massa de nódulos (Figura 6). O aumento de produção de massa de nódulos na dose 0 para a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> de Mn sugere que o teor natural de Mn no substrato foi limitante para a nodulação. Entretanto, a diminuição na dose 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn refletiu seu efeito tóxico quando em excesso, numa faixa relativamente estreita de fornecimento desse nutriente.

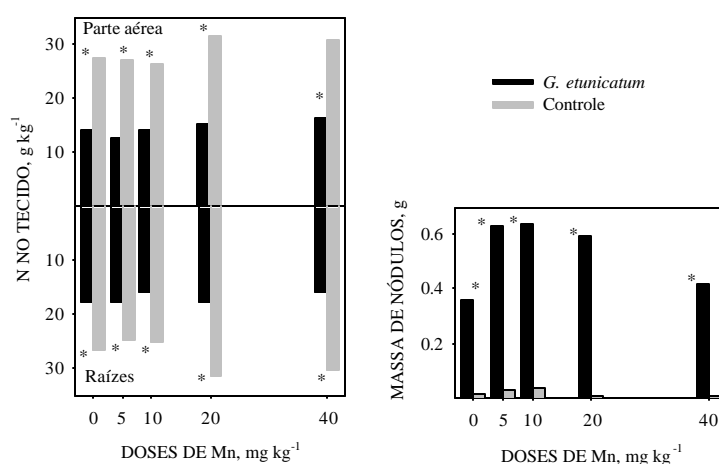


Figura 6 - Concentração de N na parte aérea e raízes e massa de nódulos secos de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

A concentração de P foi aumentada na segunda folha mais jovem e na segunda mais velha, bem como na parte aérea e raízes das plantas micorrizadas com *G. etunicatum*, em todas as doses de Mn (Figura 7). Não houve efeito significativo de doses de Mn para teor de P nas folhas. Para os teores na parte aérea e raízes, os efeitos das doses de Mn sobre a concentração de P foram mais evidentes nas plantas micorrizadas (ajuste de regressão não apresentado), sendo que não houve efeito desse fator nas plantas sem micorrização. Na parte aérea das plantas micorrizadas, os teores de P tenderam a aumentar da menor para a maior dose de Mn, com um efeito linear. Nas raízes, o comportamento foi quadrático, com diminuição, seguida de aumento da concentração de P com o aumento das doses de Mn (ajustes de regressão não apresentados).

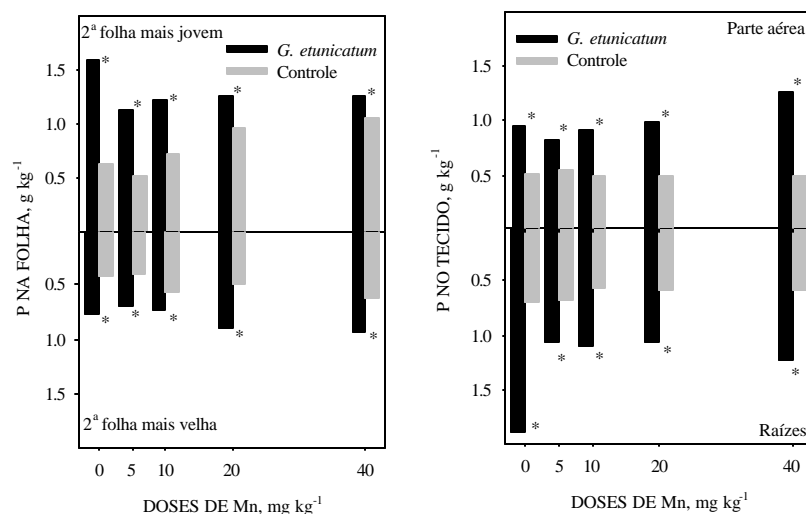


Figura 7 - Concentração de P na segunda folha mais jovem, segunda folha mais velha, parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ , na mesma dose de Mn.

A micorrização com *G. etunicatum* não resultou em diminuição da concentração de Mn em nenhuma das partes em que foi avaliado nas plantas de soja, sendo que, na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, na parte aérea e raízes, causou aumento da concentração (Figura 8). Os efeitos das doses de Mn foram bastante nítidos, especialmente nas duas folhas analisadas, com relações positivas e significativas com o aumento das doses de Mn no substrato, na média dos tratamentos com e sem micorrização, sem que houvesse interação significativa nesse caso. Nas folhas mais novas os teores encontrados variaram de 200 a 1250 mg kg<sup>-1</sup> da menor para a maior dose, respectivamente. Nas folhas mais velhas, esse aumento foi ainda maior, variando de 250 a 1750 mg kg<sup>-1</sup> da menor para a maior dose de Mn, respectivamente. Já na parte aérea e raízes, houve interação entre os dois fatores, também com relação significativa e positiva com o aumento do Mn adicionado ao substrato. Nesse caso, ocorreu que os coeficientes angulares dos ajustes de regressão dos tratamentos com *G. etunicatum* foram maiores (não apresentados), o que indica o maior acúmulo de Mn nas plantas micorrizadas, com o aumento das doses de Mn. A concentração de Mn na parte aérea foi em geral, cerca de três vezes superior à das raízes.

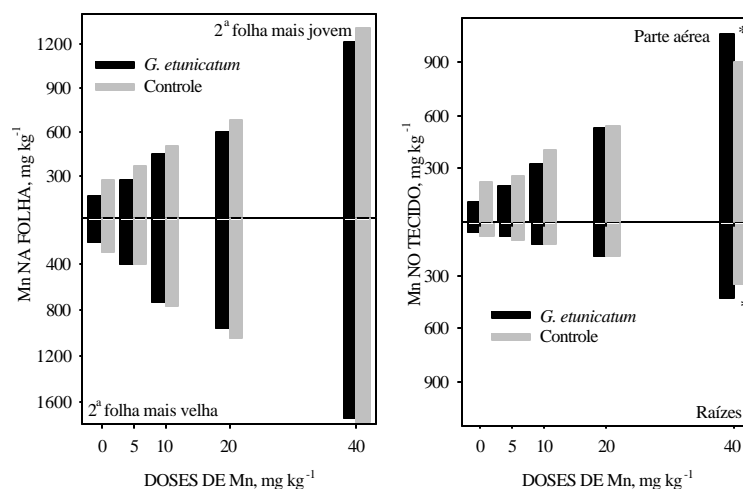


Figura 8 - Concentração de Mn na segunda folha mais jovem, segunda folha mais velha, parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

Não houve efeito das doses de Mn sobre a concentração de Fe nas folhas jovens e velhas (Figura 9), nem interação entre os fatores para essas duas variáveis. Nesse caso, a micorrização resultou em diminuição da concentração de Fe nos dois tipos de folhas apenas no tratamento sem adição de Mn. Nas demais doses, somente foram observadas tendências não significativas. Na média das doses, os teores encontrados nas folhas mais jovens foram de 91 e 103 mg kg<sup>-1</sup> de Fe nos tratamentos com e sem FMA, respectivamente e de 112 e 144 mg kg<sup>-1</sup> na segunda folha mais velha. Para a parte aérea e raízes, também não houve efeito das doses de Mn, mas o efeito da micorrização foi significativo e variável para cada dose, o que foi indicado pela interação entre os fatores. A micorrização das plantas causou, nas doses 0 e 5 mg kg<sup>-1</sup> de Mn adicionado, diminuição da concentração de Fe na parte aérea, sendo observado na dose 0 na planta micorrizada, a metade do valor encontrado na planta sem micorrização (Figura 9). De modo contrário, a micorrização resultou em aumento no teor de Fe nas raízes das plantas, em todas as doses de Mn.

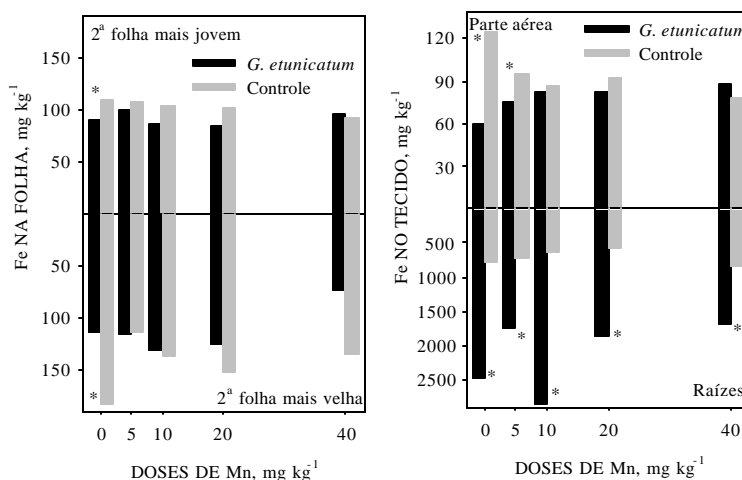


Figura 9 - Concentração de Fe na segunda folha mais jovem, segunda folha mais velha, parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

Os demais nutrientes foram aumentados ou diminuídos pela presença dos FMA, dependendo da dose de Mn (Tabela 2). O K apresentou aumento na concentração em alguns tratamentos com FMA, à exceção da segunda folha mais velha. Esse comportamento pode ser atribuído à alta mobilidade do K na planta, que pode ter sido translocado dessa região para outras, como por exemplo, as partes mais novas da planta e com maior atividade metabólica. Já na segunda folha mais jovem, houve maior acúmulo de K nas plantas micorrizadas até a dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mn. As concentrações de Ca e Mg, ao contrário das de K, diminuíram nas plantas micorrizadas em algumas doses de Mn, comportamento típico do efeito diluição causado pela maior biomassa das plantas micorrizadas. O S foi pouco influenciado nas folhas e parte aérea devido à micorrização. Entretanto, a presença de *G. etunicatum* resultou em grande aumento da concentração desse nutriente nas raízes, comparando-se ao controle sem FMA, em todas as doses de Mn. O Cu também foi afetado pela presença de *G. etunicatum*, pelo aumento de sua concentração, principalmente nas raízes, em todas as doses de Mn. O Zn teve sua concentração diminuída pela presença do FMA apenas nas raízes, em algumas doses de Mn.

Tabela 2. Concentração de K, Ca, Mg, S, Cu e Zn na segunda folha mais jovem, segunda folha mais velha, na parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*Glomus*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn

PARTE DA PLANTA	DOSES DE Mn, mg kg <sup>-1</sup>									
	0		5		10		20		40	
	<i>Glomus</i>	controle	<i>Glomus</i>	controle	<i>Glomus</i>	controle	<i>Glomus</i>	controle	<i>Glomus</i>	controle
	K, g kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	24	14*	19	13*	22	15*	19	18	17	18
2 <sup>a</sup> + velha	13	13	14	11	15	14	15	17	17	15
p. aérea	18	13*	16	14	18	16	18	17	20	13*
raízes	29	27	26	27	27	26	29	24*	30	25*
	Ca, g kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	4,1	6,0*	3,5	5,5*	4,4	6,0*	4,1	6,5*	5,7	6,4
2 <sup>a</sup> + velha	7,1	6,1	6,3	6,1	7,0	8,4	6,9	7,3	8,6	7,6
p. aérea	4,2	5,3*	3,5	4,8*	4,0	5,5*	4,4	4,5	5,4	4,3*
raízes	2,4	2,9*	2,1	2,6*	2,0	2,7*	1,9	2,5*	2,3	2,0
	Mg, g kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	3,5	5,4*	3,0	4,8*	3,6	5,1*	2,9	6,2*	3,2	7,2*
2 <sup>a</sup> + velha	3,5	4,6	3,1	3,9	3,4	5,9*	3,0	6,1*	4,3	6,5*
p. aérea	3,4	4,6*	3,2	4,4*	3,5	4,6*	3,5	4,5*	4,3	4,3
raízes	1,7	1,7	1,5	1,8*	1,4	1,7*	1,6	1,6	1,7	1,6
	S, g kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	2,3	2,2	2,1	2,1	2,4	2,4	2,1	2,7*	2,1	2,9*
2 <sup>a</sup> + velha	2,1	2,1	2,5	2,4	2,3	2,7	2,3	2,9	2,0	2,4
p. aérea	2,0	2,1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,1	2,4	2,2	2,0
raízes	3,9	2,2*	3,6	2,5*	3,6	2,4*	3,3	2,4*	3,5	2,3*
	Cu, mg kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	5,0	3,2*	4,6	3,2*	5,0	3,6*	4,8	3,6*	7,5	4,6*
2 <sup>a</sup> + velha	3,8	2,2*	3,2	2,5	4,4	2,2*	3,6	2,2*	5,0	3,2*
p. aérea	4,8	4,2	4,0	3,6	4,6	5,0	4,0	2,6	7,0	3,0*
raízes	11,6	4,6*	8,2	5,6*	10,8	7,2*	10,4	7,6*	8,8	6,0*
	Zn, mg kg <sup>-1</sup>									
2 <sup>a</sup> + jovem	46	42	45	46	41	50	40	49	55	58
2 <sup>a</sup> + velha	74	109	77	148	98	83	92	88	98	100
p. aérea	41	47	39	45	42	47	42	43	49	46
raízes	39	47	35	57*	31	51*	35	45	44	64*

\* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste *t*, na mesma dose de Mn.

Pelo resultado das leituras de absorvância a 660 nm na obtenção da reta-padrão para a determinação de Si no material vegetal, observou-se que o complexo sílico-molíbdeno teve alta estabilidade, com repetição quase fiel das leituras nos

diferentes intervalos de tempo, tanto que as quatro leituras foram utilizadas para traçar a reta padrão (Figura 10).

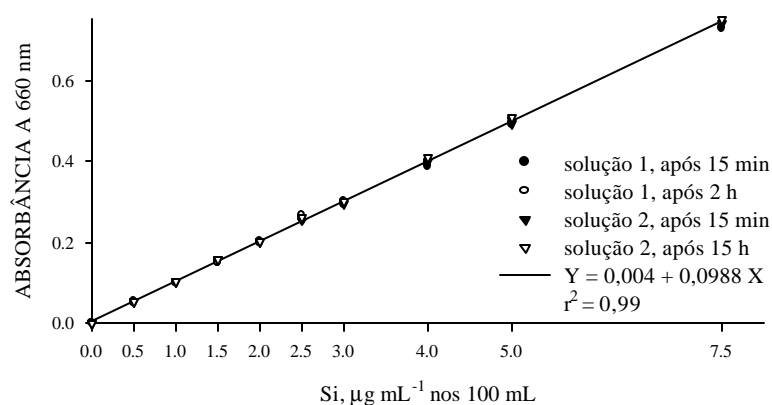


Figura 10 - Reta padrão para determinação de Si em tecidos vegetais. Soluções 1 e 2 representam dois conjuntos seqüenciais de diluição dos padrões preparados separadamente.

Na avaliação de um padrão interno de Si (Figura 11) houve boa relação entre Si adicionado e Si recuperado, conforme os altos coeficientes de determinação obtidos. Na presença de material vegetal, houve maior dispersão dos pontos, o que pode ser atribuído à queima incompleta do material adicionado, liberando mais ou menos Si a ser contabilizado.

A concentração de Si na parte aérea foi pouco alterada pela micorrização (Figura 12), com aumento causado pela presença do FMA apenas na dose de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ . O ajuste de regressão para as doses de Mn somente foi significativo para o tratamento não micorrizado, o qual apresentou relação quadrática negativa com o aumento das doses (não apresentado), com os valores variando entre 0,9 e  $0,5 \text{ g kg}^{-1}$ . Por outro lado, o aumento do teor de Si nas raízes das plantas micorrizadas foi considerável, sem que houvesse efeito significativo das doses de Mn. Na média das doses, os teores de Si encontrados nas raízes das plantas foram de  $13,1$  e  $5,9 \text{ g kg}^{-1}$  nas plantas micorrizadas e não micorrizadas, respectivamente.

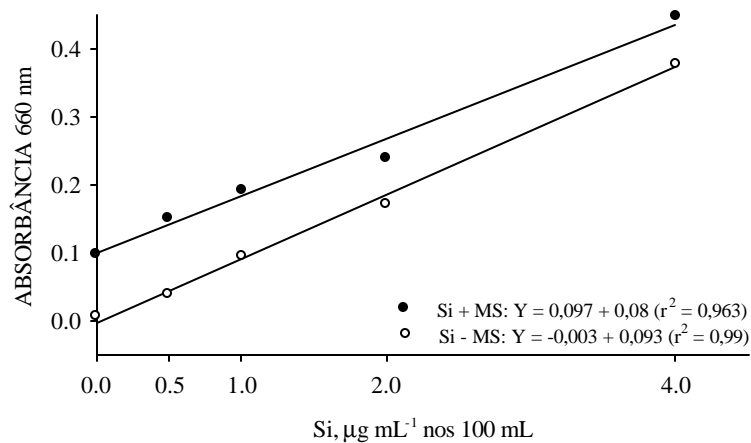


Figura 11 - Recuperação de Si submetido aos procedimentos de determinação descritos anteriormente. Si + MS = Si adicionado aos cadinhos juntamente com 500 mg de tecido vegetal; Si - MS = Si adicionado aos cadinhos sem tecido vegetal.

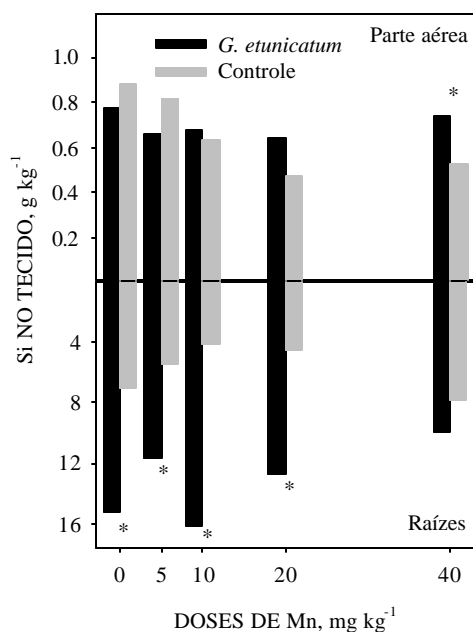


Figura 12 - Concentração de Si na parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum*) e não micorrizadas (controle), cultivadas em substrato que recebeu doses crescentes de Mn. \* = diferença significativa entre controle e *G. etunicatum* a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ , na mesma dose de Mn.

#### 4.4 Discussão

O efeito benéfico da micorrização no crescimento das plantas foi muito expressivo (Figura 1), fato comumente relatado na literatura desde longa data. Entretanto, a supressão dos sintomas da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas também ficou muito evidente, sendo que apenas a planta micorrizada na maior dose de Mn apresentou sintomas, ao passo que nas plantas não micorrizadas os sintomas de encarquilhamento, lesões necróticas no limbo foliar e nas nervuras já eram bastante evidentes a partir da dose de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , apesar da não redução dos teores de Mn no tecido (Figura 8). Isso indica que a micorrização aumentou o nível de tolerância interna da planta ao Mn. Não se sabe exatamente qual mecanismo regula esse aumento de tolerância interna ao Mn, mas sugere-se que a compartimentalização do excesso de Mn nos vacúolos (Foy, 1984) e a precipitação de formas oxidadas na parede celular (Wissemeier & Horst, 1992) podem ser mecanismos plausíveis. Outra possibilidade poderia ser a complexação do Mn com o fosfato, diminuindo sua atividade no interior da planta (Foy et al., 1978; Jones & Fox, 1978). No caso desse experimento, isso pode ter ocorrido, visto que a concentração de P nas plantas micorrizadas foi muito superior às não micorrizadas (Figura 7).

Apesar de a micorrização ter causado diminuição significativa do pH do substrato, em cerca de 0,25 unidade, não houve efeito das doses de Mn sobre essa variável. Esse comportamento pode ser explicado pela maior atividade metabólica da planta micorrizada, especialmente no que se refere à sua maior capacidade de absorção de nutrientes. O maior vigor das plantas micorrizadas, devido à sua maior absorção de P, resulta na maior absorção de outros nutrientes. Assim, no substrato em que a planta micorrizada foi cultivada, mais íons foram removidos, e quando esses íons são cátions, outros cátions, como o  $\text{H}^+$ , são exsudados pela raiz para que seja mantido o equilíbrio elétrico na planta (Marschner, 1995). Além disso, o próprio processo de remoção de cátions do complexo de troca do solo exige que íons  $\text{H}^+$  sejam formados para sua substituição, o que resulta em diminuição do pH.

A colonização radicular e a produção de MET por *G. etunicatum* diminuíram com o aumento das doses de Mn (Figura 4). Estudos prévios (Nogueira & Cardoso, 2000) demonstraram que existe grande relação entre essas duas variáveis e que os fatores que afetam a fase interna também afetam a fase externa da simbiose. Nesse caso, a disponibilidade de Mn parece ter sido o fator determinante na diminuição da colonização radicular, visto que, mesmo a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, já causou significativa redução dessa variável. Navarro (1989), utilizando como substrato areia lavada, e soja como hospedeiro, não observou efeito significativo de doses de Mn adicionadas ao substrato. Entretanto, os níveis de colonização obtidos não foram superiores a 8%, sugerindo que pode ter havido falta de adaptação dos FMA estudados ao substrato, o que não permitiu que os efeitos da adição de Mn até 12 mg kg<sup>-1</sup> fossem evidenciados. A estimativa de comprimento do MET no tratamento com *G. etunicatum* seguiu a mesma tendência da colonização radicular, enquanto o “MET” quantificado no tratamento controle se manteve constante e com baixos valores. É importante salientar que, embora de baixo valor, o comprimento de micélio externo estimado no controle foi proveniente de outros fungos filamentosos que se estabeleceram no substrato, já que as raízes das plantas não micorrizadas apresentaram-se isentas de colonização. As hifas desses fungos, na maioria das vezes, não podem ser distinguidas visualmente das hifas produzidas pelos FMA durante o procedimento de avaliação, sendo uma restrição desse método (Sylvia 1988, 1992).

A produção de calose nas folhas da soja foi severamente influenciada pela micorrização e pelas doses de Mn<sup>2+</sup> apenas nas folhas mais jovens (Figura 5). Esse comportamento deve-se ao fato de que na época em que a segunda folha mais velha foi formada, ou seja, com aproximadamente 15 dias após a germinação, todas as plantas passavam por estresse devido ao excesso de Mn, principalmente nas maiores doses. As plantas micorrizadas ainda estavam em fase de estabelecimento da simbiose, sem que pudessem se beneficiar da associação micorrízica. Isso evidencia que o estresse causado pelo excesso de Mn às folhas é irreversível e perdura até o final de sua vida. O fato de a produção de calose ter sido suprimida nas folhas mais jovens das plantas micorrizadas, mesmo nos tratamentos que receberam as maiores doses de Mn<sup>2+</sup>, evidencia que o

estresse causado pelo excesso de Mn foi menor nas plantas micorrizadas, apenas quando a planta teve tempo para se beneficiar da simbiose. Wissemeier & Horst (1987) também observaram que a formação de calose foi maior nas folhas mais velhas de caupi. É preciso considerar, porém, que o método espectrofluorométrico de determinação de calose representa apenas uma medida relativa, pois a eficiência da fluorescência da calose extraída das folhas depende do seu grau de polimerização e da fonte de  $\beta$ -1,3-glucana usada para as curvas de calibração. Contudo, os valores absolutos de calose não são necessários para a avaliação dos resultados na maioria dos estudos (Kauss, 1989). Nesse caso, mesmo valores relativos foram suficientes para evidenciar a atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas, fato que não tem relatos anteriores na literatura.

É conhecido o fato de que a micorrização apresenta grande efeito sinérgico com o rizóbio, o que causa maior nodulação das leguminosas (Harris et al., 1985; Cardoso, 1986). Esse efeito está relacionado com o melhor estado nutricional das plantas micorrizadas, especialmente com relação ao P, um dos elementos mais limitantes para a nodulação, uma vez que a interação demanda grande quantidade de energia na forma de ATP. Uma planta com maior suprimento de P teria melhores condições de atender à demanda energética decorrente do estabelecimento da simbiose durante a formação do nódulo e manutenção dos bacteróides. Sabe-se que os nódulos das leguminosas tendem à senescência após o florescimento e se intensifica durante a formação de vagens e grãos, como consequência da força de dreno de carboidratos e nutrientes causado pela nova região de crescimento, além de fatores governados pela planta, como hormônios e suprimento de  $O_2$  na zona bacteroidal (Hungria et al., 1994). Apesar de terem sido colhidos com 80 dias, os nódulos estavam intactos, o que permitiu a avaliação da massa produzida. Isso, entretanto, não significa que estavam ativos, já que não se fez análise da atividade da nitrogenase. É importante salientar que houve algum fator limitante à fixação biológica de N, de causa não identificada, nas plantas de todos os tratamentos, o que exigiu fornecimento de N mineral aos 40 dias.

Apesar da maior massa de nódulos produzida pelas plantas micorrizadas, a concentração de N, tanto na parte aérea, quanto nas raízes, sempre foi maior nas plantas não micorrizadas (Figura 6). Esse comportamento é típico para nutrientes de

fácil translocação na planta e de alta mobilidade no solo, resultado do efeito diluição nas plantas micorrizadas, por estas apresentarem maior biomassa. Tem que se ressaltar que todos os tratamentos receberam a mesma dose de N em cobertura com 40 dias, quando as plantas estavam na floração. Como as plantas não micorrizadas apresentavam menor biomassa, o N fornecido ficou mais concentrado na planta, o que explica os maiores valores de concentração obtidos.

Nota-se que, mesmo na segunda folha mais velha, houve efeito positivo da micorrização no aumento da concentração de P (Figura 7). Isso não significa que a micorrização já propiciava maior absorção de P na ocasião em que a referida folha foi formada (cerca de 15 dias após a emergência), pois sendo o P um elemento de relativa mobilidade na planta (Marschner, 1995), sua concentração pode ter sido aumentada após o estabelecimento da simbiose resultar em melhor fornecimento de P. É importante ressaltar que as plantas e as folhas foram colhidas com 80 dias, tempo suficiente para que a simbiose fosse estabelecida e a planta ter obtido os benefícios dessa interação.

Dentre os nutrientes avaliados, o P foi o que apresentou aumento de sua concentração na planta em todas as doses de Mn no tratamento com *G. etunicatum* (Figura 7). Esse aumento de absorção e concentração de P pelas plantas micorrizadas, apesar da sua maior produção de biomassa, provavelmente foi o fator de maior contribuição para seu maior vigor (Figura 1), uma vez que a dose de P fornecida às plantas foi propositadamente limitante, de modo a favorecer o micotrofismo. Estando as plantas micorrizadas melhor nutridas com relação a P, também tiveram condições de suportar os efeitos negativos do excesso de Mn, mesmo nas maiores doses adicionadas desse nutriente. Assim, as plantas micorrizadas também apresentaram menor produção de calose, visto que sofreram menos estresse pelo maior fornecimento de P, o que auxiliou a atenuar o efeito negativo causado pelo excesso de Mn.

Apesar de as concentrações de Mn nas plantas micorrizadas e não micorrizadas terem sido equivalentes (Figura 8), as primeiras apresentaram sintomas de toxidez somente na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn e, mesmo assim, apresentaram-se mais vigorosas que as do tratamento controle, as quais foram severamente injuriadas pelo excesso de Mn. Além disso, apesar da mesma concentração de Mn, as plantas

micorrizadas apresentaram menor produção de calose (Figura 5), indicando menor nível de estresse. Nesse estudo, a hipótese de que a micorrização das plantas causa redução na concentração de Mn, e por isso diminuição da sua toxidez, não foi comprovada, muito embora tenha sido nítida a atenuação da toxidez causada pelo excesso de Mn na presença dos FMA. Nesse caso, parece ter sido o aumento na concentração de P nos tecidos das plantas micorrizadas o fator preponderante na atenuação dos sintomas. As plantas melhor nutridas e conseqüentemente melhor desenvolvidas tiveram condições de melhor suportar o excesso de Mn em seus tecidos, visto que esses teores sempre foram superiores aos considerados adequados para a soja, ou seja, 21 a 100 mg kg<sup>-1</sup>, conforme Malavolta et al. (1989), sendo que, na maior dose de Mn, esses valores foram cerca de 12 vezes superiores. Outra possibilidade é a ocorrência de reações entre os íons fosfato e Mn<sup>2+</sup> no interior da planta, diminuindo a atividade do excesso de Mn (Jones & Fox, 1978; Foy, 1984).

O fato de ter havido maior concentração de Fe nas raízes das plantas micorrizadas (Figura 9) pode estar associado com a diminuição do pH no substrato em que foram cultivadas as plantas (Figura 3), uma vez que a disponibilidade de Fe aumenta com o decréscimo do pH. Entretanto, como citado anteriormente, não houve alteração da disponibilidade de Fe em função das doses crescentes de Mn ou da presença ou ausência de FMA. Todavia, a disponibilidade de um nutriente no substrato homogeneizado deve diferir do que realmente ocorre nos microssítios e na micorrizosfera, locais de intensa atividade microbiana. Outra possibilidade é a de que tenha ocorrido oxidação do Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> na superfície das raízes, resultando em sua precipitação, mais intensa nas raízes das plantas micorrizadas, em virtude de sua maior atividade metabólica. Seja qual for o mecanismo que resultou em aumento na concentração de Fe nas raízes das plantas micorrizadas, não promoveu aumento da concentração desse elemento na parte aérea, indicando que parte do Fe ficou retida nas raízes das plantas micorrizadas. Nas doses 0 e 5 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, as plantas não micorrizadas apresentaram concentração de Fe significativamente maior na parte aérea. É possível que esse comportamento não tenha ocorrido nas demais doses de Mn porque à medida que se aumenta a disponibilidade de Mn<sup>2+</sup> (Figura 3) ocorre inibição competitiva da absorção de Fe<sup>2+</sup> (Marschner, 1995). Em

casos extremos, o excesso de Mn pode causar deficiência de Fe (Mukhopadhyay & Sharma, 1991), fato não observado nesse experimento, mesmo na maior dose de Mn. Memon et al. (1981) observaram que uma alta relação Mn:Fe no solo foi um fator importante na indução de toxidez de Mn em plantas de chá. Como a disponibilidade de Fe no substrato não foi alterada pelos tratamentos e a disponibilidade de Mn aumentou com a adição de Mn, o conseqüente aumento da relação Mn:Fe pode ter contribuído para resultar em toxidez de Mn. Entretanto, esse efeito foi menos expressivo nas plantas micorrizadas.

Nutrientes como o Ca e Mg (Tabela 2) tiveram sua concentração diminuída nas plantas micorrizadas. Entretanto, se for considerada a quantidade total absorvida, multiplicando-se a concentração pela biomassa das plantas, obtém-se maiores valores nas plantas micorrizadas, justamente em função de sua maior biomassa. Por esses resultados, observa-se que a proporção entre os nutrientes nas diversas partes das plantas é profundamente alterada pela micorrização, resultando em aumento ou diminuição nos valores de concentração. Essa mudança pode acarretar as mais variadas respostas da planta em relação ao Mn disponível e sua absorção.

Não foram observados efeitos da adição de Mn sobre os teores de Ca e Mg nas plantas. O  $Mn^{2+}$  é conhecido por induzir deficiência desses dois nutrientes por causar inibição competitiva pelos sítios de absorção nas raízes (Mukhopadhyay & Sharma, 1991). Para o Cu e Zn houve apenas efeito da micorrização, sendo que no caso do Cu houve aumento dos teores nas plantas micorrizadas em todas as partes analisadas. São relativamente comuns os relatos de que ocorrem maiores concentrações de Cu e Zn nas plantas micorrizadas (Marshner & Dell, 1994). Entretanto, nesse experimento o Zn foi influenciado pela micorrização apenas nas raízes, onde houve diminuição da concentração, resultado do efeito diluição.

O método de determinação de Si proposto por Elliot & Snyder (1992), adaptado por Korndörfer et al. (1999), não se mostrou eficiente, tendo em vista que, durante a digestão úmida da amostra com NaOH e  $H_2O_2$ , ocorreu formação de espuma e conseqüente aderência de parte da amostra na parede do tubo de digestão, o que subestimou a quantidade total de Si a ser determinada, pois parte do material não foi

digerida. Outro agravante foi o fato de o extrato obtido não ser claro, mas de coloração amarelada, o que atrapalhou a leitura da absorbância e fez necessário o uso de um branco sem adição de molibdato para cada amostra, o que aumentou o trabalho e consumo de reagentes. Outro problema foi o fato de que a leitura da intensidade do composto amarelo formado pela reação do silício com o molibdato ter que ser realizada dentro de quinze minutos, período após o qual havia degradação do composto, comprovada pelo decréscimo nos valores de absorbância da mesma amostra a vários intervalos de tempo. Leituras com mais de 15 min seriam subestimadas pela degradação do composto amarelo de baixa estabilidade, o que aumentaria ainda mais a variabilidade dos resultados. Diante desses problemas, optou-se pelo uso do método descrito por Bataglia et al. (1978).

Para testar a eficiência desse método em recuperar Si, estabeleceu-se um padrão interno com doses crescentes de Si, que foi submetido aos processos de determinação. O quase paralelismo entre as retas obtidas da recuperação de Si indicou que o material vegetal não seqüestrou o Si adicionado e que a diferença existente entre ambas foi decorrente do Si liberado pelo tecido vegetal.

Aumentos no teor de Si na parte aérea de plantas de soja micorrizadas foram observados por Yost & Fox (1982). Entretanto, não foi encontrada nenhuma referência sobre aumentos desse elemento nas raízes das plantas devido à micorrização. Portanto, o resultado apresentado na Figura 12, constitui uma informação inédita. É importante notar que esse comportamento pode ser muito variável, dependendo da interação solo-fungo-hospedeiro, assim como foi encontrada grande variação nos resultados de concentração de Si quando se avaliaram diferentes FMA em dois substratos (argiloso e arenoso), conforme apresentado no capítulo anterior.

Sabe-se que o fornecimento de Si solúvel a plantas crescendo em meio com excesso de Mn causa atenuação de seu efeito tóxico (Horst & Marschner, 1978; Horiguchi, 1987). Esse processo ocorre pelo fato de que a presença do Si, de alguma forma, propicia uma distribuição mais uniforme do Mn no limbo foliar, de forma a evitar que este se acumule em altas concentrações em determinados pontos, o que levaria à morte das células daquela região (Williams & Vlamis, 1957). Entretanto, não existe

informação sobre os efeitos do Si na distribuição e/ou translocação do Mn nas raízes, ou ainda, destas para a parte aérea.

Nesse estudo, foi nítida a atenuação da toxidez causada pelo excesso de Mn na presença de *G. etunicatum*, o que foi confirmado pela menor deposição de calose nas folhas mais jovens, embora não houvesse diminuição do teor de Mn na planta. O aumento na concentração de P nos tecidos das plantas micorrizadas, aliado ao aumento na concentração de Si nas raízes, parecem ter sido os fatores preponderantes na atenuação dos sintomas.

#### **4.5 Conclusões**

- Plantas micorrizadas por *G. etunicatum* apresentaram supressão dos sintomas de toxidez de Mn, sem que seus teores na planta fossem diminuídos;
- A deposição de calose nas folhas aumentou com a disponibilidade de Mn no substrato, mas numa intensidade menor nas plantas micorrizadas;
- A deposição de calose nas folhas das plantas no início do desenvolvimento perdurou até na fase final, como resultado da toxidez de Mn;
- Plantas micorrizadas apresentaram significativo aumento da concentração de Si nas raízes.

## 5 INTERAÇÕES MICROBIANAS AFETAM A DISPONIBILIDADE DE MANGANÊS E SUA ABSORÇÃO POR SOJA.

### Resumo

Avaliou-se o efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em soja, com e sem o restabelecimento da comunidade microbiana do solo autoclavado, sobre a disponibilidade, a absorção e a expressão dos sintomas de toxidez de Mn na planta. Para isso, um substrato argiloso (NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico) com alta disponibilidade de Mn natural foi autoclavado para que fosse eliminada toda sua microbiota nativa. Antes da semeadura da soja, esporos desinfestados superficialmente dos FMA *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* foram adicionados ao substrato, em combinação ou não com um filtrado do solo original (<40 µm) visando o restabelecimento da comunidade microbiana nativa, exceto FMA. Manteve-se um tratamento apenas com filtrado, sem FMA. O controle recebeu o filtrado autoclavado de modo que os tratamentos foram: controle “estéril”, “filtrado”, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado, *G. macrocarpum* + filtrado, com oito repetições por tratamento. A hipótese de estudo foi a de que a presença dos FMA altera a composição da comunidade de bactérias oxidantes e redutoras de Mn no substrato, que por sua vez podem alterar seu estado de oxidação, disponibilidade às plantas e a expressão dos sintomas de toxidez. O crescimento das plantas associadas aos FMA foi maior nos tratamentos que também receberam o filtrado de solo. Nesses casos, houve também diminuição do pH no substrato, maior disponibilidade de Fe e menor disponibilidade de Mn. O teor de P nos tecidos das plantas aumentou nos tratamentos

com FMA, mas na parte aérea houve ligeira diminuição quando além dos FMA também foi adicionado o filtrado. Já o Ca e o Si tiveram maior concentração na parte aérea das plantas nos tratamentos que receberam apenas FMA, sem filtrado. O Fe apresentou comportamento inverso na parte aérea e raízes: na parte aérea, sua concentração foi maior nas plantas do tratamento controle e diminuiu nas plantas micorrizadas, em maior intensidade naquelas que também receberam filtrado; nas raízes, esse comportamento foi inverso, sendo sua concentração menor nas plantas controle e maior nas dos tratamentos que receberam FMA + filtrado. A concentração de Mn na parte aérea e raízes das plantas foi maior nos tratamentos controle e apenas filtrado, sendo diminuída nas plantas micorrizadas, em maior intensidade nas dos tratamentos que também receberam filtrado. Esse comportamento indica forte interação entre FMA e a comunidade microbiana do solo sobre a disponibilidade e absorção pelas plantas dos nutrientes sujeitos a processos de oxi-redução nas condições do solo, como o Fe e o Mn. A avaliação do número de UFC de bactérias oxidantes e redutoras de Mn no substrato revelou que não houve diferenças significativas em função dos tratamentos, possivelmente devido à estratégia de amostragem do substrato.

**Summary: MICROBIAL INTERACTIONS AFFECT MANGANESE AVAILABILITY AND ITS UPTAKE BY SOYBEAN.**

The objective of this study was to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) when inoculated in soybean growing in an autoclaved soil, with and without a re-established microbial community on the availability and uptake of Mn and on the expression of Mn toxicity symptoms in plants. A loamy soil (Typic Rhodudalf) with high natural Mn availability was autoclaved in order to eliminate its native microorganisms. Before sowing soybean seeds, surface sterilized spores *G. etunicatum* or *G. macrocarpum*, were added to the substrate in combination or not with a soil suspension from the natural soil, filtered through a mesh filter (< 40 µm), to re-establish the native microbial community, except AMF. Other treatment received only

the filtered soil suspension, whilst the control received the autoclaved filtrated, referred to as “sterile”. Therefore the treatments were: sterile control; filtered soil suspension (filtered); *Glomus etunicatum*; *G. macrocarpum*; *G. etunicatum* + filtered; *G. macrocarpum* + filtered. A total of eight replications per treatment were installed. Our working hypothesis was that AMF change the microbial community composition of Mn reducing and oxidizing bacteria around the plant. As a consequence, the oxidation state of Mn, its availability to plants and its toxicity would be altered. The AMF associations increased plant growth much more in treatments that also received the filtered. Likewise, in these treatments, the soil pH decreased and Fe availability increased, while the availability of Mn decreased. P concentrations in both shoot and roots increased in the treatments with AMF, independent of the addition of the filtered. Ca and Si concentration were higher in the shoots of plants that received only AMF, without the filtered. Fe concentrations were higher in the shoots of control plants, lower in those with AMF and very high in those that had received only the filtered. On the contrary, the concentration of Fe in the roots was lower in the control plants and higher in those that had received AMF + filtered. Mn concentrations in the shoots and roots were higher in the control plants and in those that had received only filtered, but were lower in mycorrhizal plants, especially in those that received the filtered. The evaluation of Mn oxidizing and reducing bacteria in the substrate showed no quantitative differences for both groups in the different treatments.

## 5.1 Introdução

O manganês (Mn) constitui aproximadamente 0,1% da massa total da terra, sendo o décimo-segundo elemento e o quinto metal mais abundante (Nealson et al., 1988). No solo, sua disponibilidade como nutriente de plantas e outros organismos depende de seu estado de oxidação. A forma disponível às plantas é a reduzida,  $Mn^{2+}$ , enquanto a forma oxidada,  $Mn^{4+}$ , resulta em óxidos insolúveis (Marschner, 1995). A predominância de cada forma ou o equilíbrio entre elas é governado química e

biologicamente. Segundo Ghiorse (1988), a oxidação do Mn é biológica, enquanto a redução pode ser química ou biológica. Dessa forma, a disponibilidade de Mn pode ser determinada pela atividade de organismos oxidantes e redutores de Mn, principalmente entre valores de pH entre 5,2 e 7,8 (Huber & Wilhelm, 1988).

Muitos trabalhos enfocaram a oxidação biológica de Mn no solo (Bromfield & Skerman, 1950; Bromfield, 1974; Dubinina, 1979b; Douka, 1980), mesmo sob condições de acidez (Sparrow & Uren, 1987). Embora Sparrow & Uren (1987) tenham observado que a redução biológica do Mn foi pequena, Kothari et al. (1991) observaram que o Mn disponível no substrato diminuiu na mesma ordem que o número de bactérias redutoras de Mn, indicando forte papel da redução biológica de Mn. Sob essa ótica, a disponibilidade de Mn pode ser aumentada por fatores que aumentem o número de microrganismos redutores (Marschner et al., 1991; Rengel et al., 1996) ou diminua a de oxidantes (Bromfield, 1978). O desequilíbrio entre essas duas comunidades, favorecendo os redutores ou suprimindo os oxidantes, poderia resultar em toxidez de Mn às plantas, desde que seu conteúdo no solo seja suficiente para atingir níveis tóxicos.

As interações micorrízicas com as plantas podem causar mudanças na composição das comunidades oxidantes e redutoras de Mn na rizosfera e, por conseguinte, na nutrição das plantas também em relação ao Mn (Kothari et al., 1991; Arines et al., 1992; Posta et al., 1994).

Recentemente alguns trabalhos sobre oxidação e redução de Mn têm enfocado interações ecológicas entre microrganismos e mesmo entre plantas e microrganismos. Bactérias redutoras de Mn suprimiram, tanto em meio de cultura, quanto no solo, o desenvolvimento do fungo *Gaeumanomyces sp.*, agente causal de uma doença de trigo denominada “mal do pé”. Nesse caso, as bactérias redutoras de Mn mantiveram sua disponibilidade alta o suficiente para inibir o desenvolvimento fúngico (Marschner et al., 1991). Esse fungo é capaz de oxidar Mn, fato que se suspeita estar envolvido na sua ação patogênica, talvez por causar deficiência local de Mn na rizosfera, tornando a planta mais suscetível à sua penetração (Wilhelm et al., 1990). Em outro estudo, genótipos de trigo tolerantes à deficiência de Mn tiveram três vezes mais

bactérias redutoras de Mn do que oxidantes na sua rizosfera, em comparação ao genótipo sensível (Rengel, 1997). De modo inverso, plantas de soja deficientes em Mn tiveram dez vezes mais bactérias oxidantes de Mn na sua rizosfera do que plantas não deficientes (Huber & McCay-Buis, 1993).

Um dos mecanismos envolvidos na redução do Mn é a produção de ácidos e metabólitos redutores, como o  $H_2S$  ou ácidos orgânicos, os quais podem reduzir o Mn abioticamente. Além disso, algumas bactérias parecem ter mecanismos enzimáticos para a redução do Mn (Boogerd & Vrind, 1987; Ghiorse, 1988). Dubinina (1979a) observou que o processo oxidação do Mn feito por *Leptothrix sp.* não resultou na utilização da energia produzida para a assimilação do carbono, portanto, a bactéria não utilizou a energia da oxidação para seu crescimento, mas o processo foi utilizado para consumir  $H_2O_2$ , como um mecanismo protetor contra o acúmulo a níveis tóxicos desse subproduto de seu metabolismo. Mais tarde Boogerd & Vrind (1987) concluíram que o fator responsável pela oxidação de Mn por essa bactéria era de origem protéica.

Esse experimento teve o objetivo de avaliar a possível interação entre FMA e bactérias com capacidade de oxidação e redução de Mn sobre a expressão de sintomas de toxidez de Mn em soja cultivada em substrato com alto teor natural de Mn.

## 5.2 Material e Métodos

Utilizou-se uma amostra da camada superficial de um solo muito argiloso (0-20 cm), classificado como NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico (Embrapa, 1999) [Typic Rhodudalf (Estados Unidos, 1975)] por apresentar alto teor natural de Mn disponível, o que foi aumentado ainda mais após a autoclavagem (Tabela 1) a  $121^{\circ}C$  por 2 h, para a eliminação da microbiota nativa do substrato.

Tabela 1. Características químicas do substrato utilizado no experimento antes (1) e após (2) a autoclavagem.

amostra	pH	M.O. CaCl <sub>2</sub>	P S-SO <sub>4</sub>		K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	T	V	
			mg dm <sup>-3</sup>										mmolc dm <sup>-3</sup>
NV <sub>e</sub>	1	5,6	19	6	10	0,8	45	16	0	20	62	82	76
	2	5,2	19	8	12	1,0	55	19	0	22	75	97	77
----- micronutrientes (mg dm <sup>-3</sup> ) -----													
			B		Cu		Fe		Mn			Zn	
NV <sub>e</sub>	1		0,23		0,1		22,2		63,2			2,3	
	2		0,23		0,2		10,0		306,0			1,4	

Não houve necessidade de calagem e o P e o K foram fornecidos nas doses de 24 mg kg<sup>-1</sup> (superfosfato triplo) e 121 mg kg<sup>-1</sup> (KCl), respectivamente.

Os tratamentos foram: infestação do substrato (vasos com 3,4 kg) com 1100 esporos, obtidos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), das espécies *G. macrocarpum* ou *G. etunicatum*, desinfestados superficialmente (Colozzi-Filho & Balota, 1994), para que fosse restringida ao máximo a entrada de outros organismos; esporos de *G. macrocarpum* ou *G. etunicatum* mais 20 mL de uma suspensão do mesmo solo utilizado no experimento, porém não autoclavado, com a finalidade de restaurar a comunidade microbiana, exceto FMA (Arines et al., 1989). A suspensão foi obtida pela agitação de 1 kg de solo em 2 L de água, deixada em repouso por 30 min para sedimentar as partículas mais grosseiras, sendo o sobrenadante passado por uma série de peneiras de modo a reter esporos de fungos micorrízicos. Essa suspensão será referida no texto como “filtrado” (amostras do filtrado foram examinadas sob microscópio estereoscópio para confirmar a ausência de esporos de FMA); outro tratamento foi a adição de apenas o filtrado de solo sem propágulos de FMA. O tratamento controle também recebeu os 20 mL do filtrado, porém a suspensão nesse caso foi previamente autoclavada. Cada tratamento teve 8 repetições, perfazendo 48 unidades experimentais.

A semeadura de cinco sementes por vaso da cultivar IAC-8, desinfestadas superficialmente com solução comercial de hipoclorito de sódio a 25% em água, foi feita no dia 22/06/99, deixando-se duas plantas por vaso depois de uma

semana. Após o desbaste, foram feitas adubações complementares com S ( $1,12 \text{ mg kg}^{-1}$  na forma de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), B ( $0,37 \text{ mg kg}^{-1}$  na forma de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), Cu ( $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$  na forma de  $\text{CuO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e Mo ( $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$  na forma de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), todos via solução. O fornecimento de N foi feito via fixação biológica, inoculando-se as plântulas com uma suspensão de células das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii*, deixadas a crescer por cinco dias. O experimento foi mantido em casa-de-vegetação com temperatura controlada (mínima de  $20^\circ\text{C}$  e máxima de  $35^\circ\text{C}$ ). Também foi feita uma extensão do fotoperíodo pelo fornecimento de luz artificial incandescente pela manhã, no final da tarde e início da noite, de modo a se ter 14 h de luminosidade. A irrigação foi feita diariamente com água destilada conforme a necessidade.

Aos 70 dias após a emergência, durante a fase de formação de vagens, as plantas e o substrato foram colhidos para análise. A parte aérea, após lavagem por duas vezes em água destilada, foi seca a  $60^\circ\text{C}$  em estufa com circulação forçada de ar até peso constante, após o que foi moída e submetida à determinação de P (colorimetria do metavanadato), Ca, Fe e Mn (fotometria de absorção atômica) a partir do extrato nítrico-perclórico, e também o teor de Si [Bataglia et al. (1978); modificado conforme descrito no capítulo 4]. As raízes foram removidas do substrato, lavadas sob água de torneira, solução de HCl 0,01 N e duas vezes em água destilada e secas como a parte aérea. Uma alíquota foi reidratada e usada para avaliação da colonização micorrízica (Phillips & Hayman, 1970; Giovannetti & Mosse, 1980), inclusive para o controle não inoculado com fungos micorrízicos e o tratamento que apenas recebeu o filtrado. O material remanescente foi submetido às mesmas análises que a parte aérea.

Uma amostra do substrato foi armazenada a  $5^\circ\text{C}$  com umidade natural até o momento da estimativa do comprimento de micélio externo total (MET) produzido pelos FMA (Schubert et al., 1987; modificado por Melloni & Cardoso, 1999), com nova modificação descrita no capítulo 4. Esse procedimento também foi feito no substrato do tratamento controle e no que recebeu apenas o filtrado. Essas mesmas amostras foram utilizadas para a avaliação do número de unidades formadoras de colônias de bactérias oxidantes (Huber & Graham, 1992) e redutoras de Mn (Ridge & Rovira, 1971;

modificado por Marschner et al., 1991) por meio de diluição em série do substrato em solução salina 0,85% e plaqueamento de 50  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-4}$ . Outra amostra foi seca ao ar e passada por peneira 2 mm de malha, para determinação dos teores de Mn e Fe disponíveis por fotometria de absorção atômica após extração com a solução Mehlich I ( $\text{HCl}$  0,05 +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ ) na proporção de 1:10 substrato/solução, agitados horizontalmente por 15 minutos a 250 rpm e filtrados em papel de filtro faixa azul número 42 (Framex<sup>®</sup>). Obtiveram-se, também, os valores de pH em solução centimolar de  $\text{CaCl}_2$ , na proporção de 1:2,5 de substrato/solução (Raij et al., 1983).

As análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando-se o procedimento GLM do SAS<sup>®</sup> (The Statistical Analysis System), empregando-se o teste *t* de Student a  $P < 0,05$ . Também foram feitas análises de correlação simples entre algumas variáveis por meio do procedimento CORR, obtendo-se o coeficiente de correlação de Pearson (SAS, 1991).

### 5.3 Resultados

As plantas de soja apresentaram severos sintomas de toxidez de Mn, logo no início de seu desenvolvimento, em todos os tratamentos, já que sua disponibilidade no substrato após a autoclavagem foi superior a  $300 \text{ mg dm}^{-3}$ . Entretanto, quando as plantas micorrizadas também receberam um filtrado do solo original para repor a comunidade microbiana natural (filtrado), exceto os FMA nativos, os sintomas de toxidez de Mn foram atenuados, principalmente no tratamento com *G. macrocarpum* + filtrado. Com o tempo, as plantas micorrizadas passaram a ter os sintomas de toxidez suprimidos, principalmente quando também receberam o filtrado (Figura 1). Observa-se que no tratamento com *G. macrocarpum* + filtrado a atenuação dos sintomas já ocorreu com 40 dias.

O crescimento das plantas micorrizadas foi favorecido, principalmente quando também se adicionou o filtrado do solo original (Figura 2). As plantas dos tratamentos com *G. macrocarpum* se desenvolveram mais que as do tratamento com *G.*

*etunicatum*, tanto na presença, quanto na ausência do filtrado. Já o tratamento que recebeu somente o filtrado resultou em crescimento das plantas semelhante ao do controle. Nessa mesma figura, observa-se que o nível de colonização radicular pelos FMA não foi alterado pela adição do filtrado, nem pela espécie micorrízica, atingindo um valor médio de 47 %. Já a produção de micélio externo por *G. macrocarpum* foi superior à do tratamento com *G. etunicatum*, apenas na ausência do filtrado.

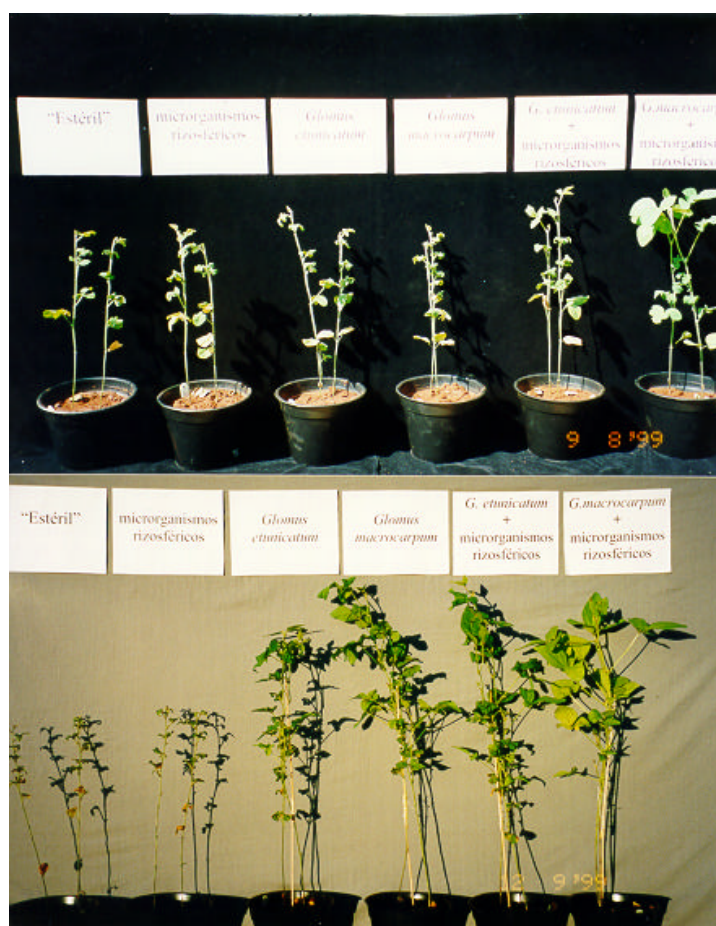


Figura 1 - Aspecto de plantas de soja cultivadas em substrato autoclavado, com alta disponibilidade de Mn disponível, de acordo com os tratamentos, da esquerda para a direita: controle ("estéril"), filtrado (microrganismos rizosféricos), *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado e *G. macrocarpum* + filtrado. Parte superior: 40 dias; parte inferior: 70 dias após a emergência.

Houve, no substrato, significativa alteração dos valores de pH pelos tratamentos (Figura 3). Nos tratamentos em que não se adicionou o filtrado, ou seja, no controle e nos tratamentos apenas com *G. etunicatum* e *G. macrocarpum*, os valores de pH permaneceram em cerca de 5,9. Já no tratamento que recebeu apenas o filtrado, o valor de pH foi aumentado significativamente em cerca de 0,1 unidade, indo para pouco mais de 6,0. De modo contrário, quando a adição do filtrado foi feita conjuntamente com cada um dos FMA, os valores de pH diminuíram para próximo a 5,8. Já a disponibilidade de Fe em relação ao controle e o tratamento com filtrado foi significativamente menor no tratamento com *G. etunicatum* e significativamente maior no tratamento com *G. macrocarpum* + filtrado. De modo contrário, o Mn tendeu a ter sua disponibilidade diminuída nos tratamentos com os FMA + filtrado, em relação ao controle e ao tratamento apenas com filtrado, que por sua vez não diferiram dos tratamentos que apenas receberam os FMA.

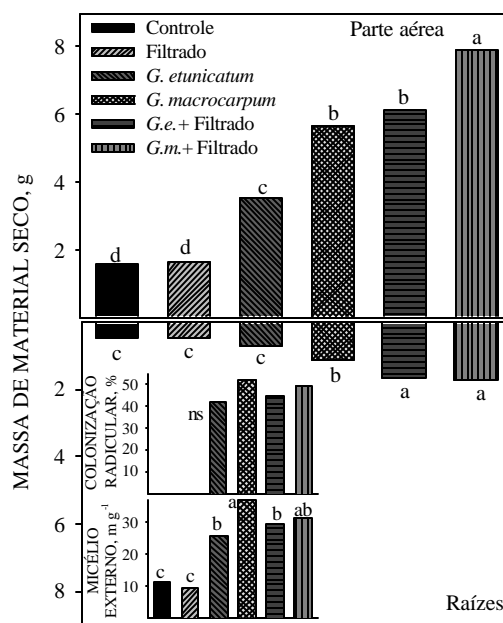


Figura 2 - Gráfico principal: Massa de material seco produzido pela parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) e *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Gráficos secundários: Colonização Radicular e produção de micélio externo total. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

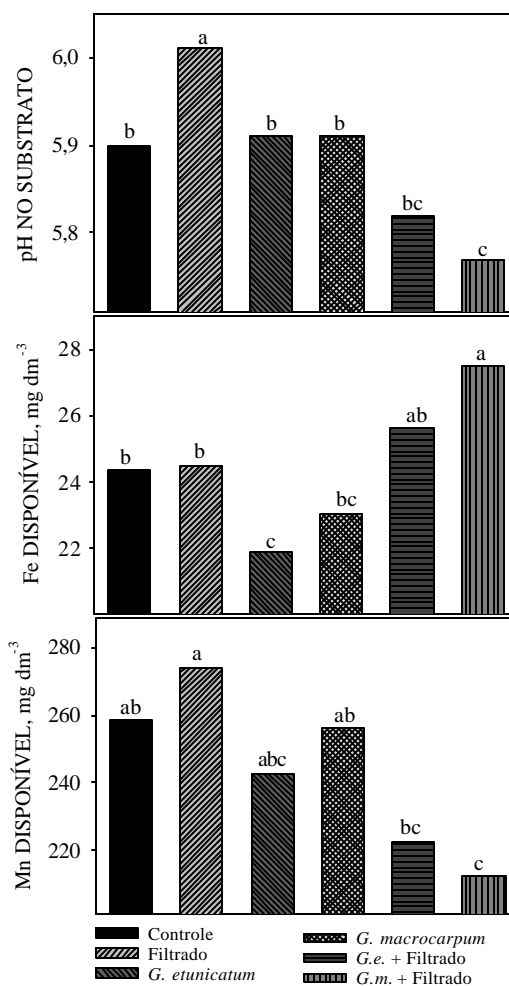


Figura 3 - pH, Fe e Mn disponíveis no substrato, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) e *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

A concentração de P nos tecidos foi grandemente favorecida nas plantas micorrizadas (Figura 4), praticamente o dobro em relação às plantas do tratamento controle e do tratamento com filtrado. Embora os teores de P tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas micorrizadas tivessem sido maiores, ao menos na parte aérea, esses valores foram significativamente diminuídos em cada tratamento com FMA quando cada um também recebeu simultaneamente o filtrado.

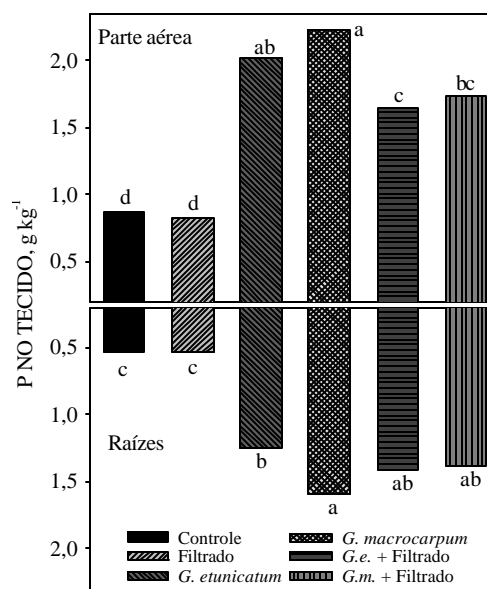


Figura 4 - Teor de P na parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) e *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

Para o Ca, também houve diferenças com relação aos tratamentos (Figura 5), mais expressivos na parte aérea. Naqueles que receberam somente os FMA, a concentração nas plantas foi significativamente superior, comparada às do tratamento controle, do tratamento que recebeu apenas o filtrado e dos tratamentos que receberam os FMA + filtrado, que por sua vez, não diferiram entre si.

A concentração de Fe na parte aérea das plantas foi significativamente maior no tratamento controle (Figura 6), tendo sido reduzida no tratamento que recebeu apenas o filtrado e os FMA. Nos tratamentos que receberam os FMA + o filtrado essa redução foi ainda mais expressiva. Esse comportamento ocorreu de forma inversa nas raízes, tendo sido observado o menor teor nas raízes das plantas do tratamento controle e maior nas raízes das plantas micorrizadas. Nas plantas micorrizadas com *G. etunicatum* a concentração de Fe aumentou nas raízes quando as plantas também receberam o filtrado, enquanto que nas plantas micorrizadas com *G. macrocarpum* a adição do filtrado não alterou o teor de Fe nas raízes das plantas.

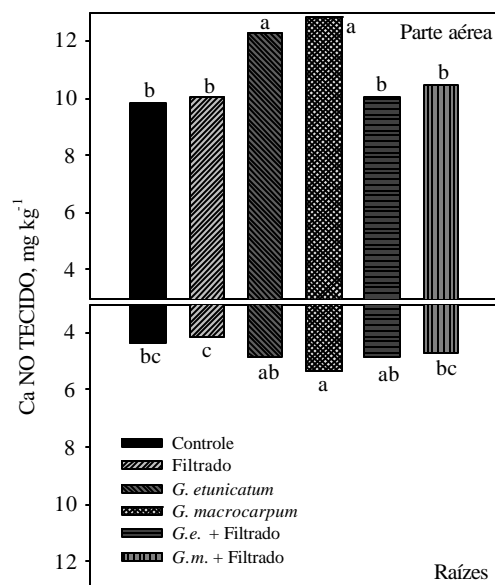


Figura 5 - Teor de Ca na parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) e *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

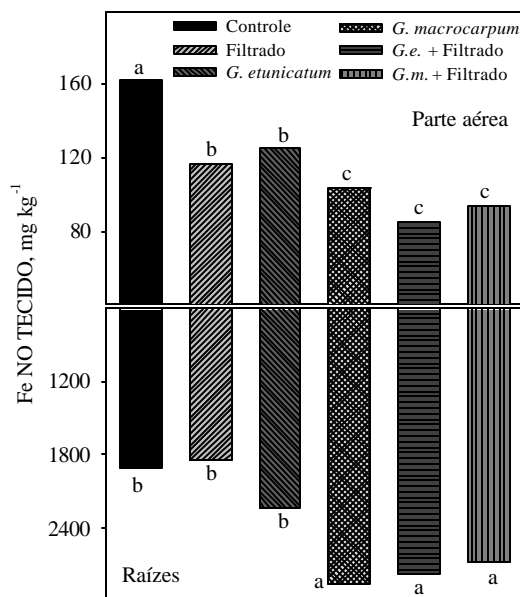


Figura 6 - Teor de Fe na parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) e *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

Os teores de Mn também foram influenciados pelos tratamentos (Figura 7), os quais foram significativamente reduzidos na parte aérea das plantas micorrizadas em relação ao controle, com maior intensidade nos tratamentos com FMA + filtrado. Nesse caso, as plantas do tratamento controle apresentaram teores superiores a 2500 mg kg<sup>-1</sup>, ao passo que, nas plantas micorrizadas que receberam também o filtrado, esse teor foi diminuído em mais de 1200 mg kg<sup>-1</sup>. Nas raízes, essa diminuição da concentração de Mn nas plantas micorrizadas também ocorreu, principalmente comparando-se com o tratamento que recebeu apenas o filtrado. Novamente, a maior diminuição da concentração de Mn foi observada nas plantas que, além dos FMA, também receberam o filtrado.

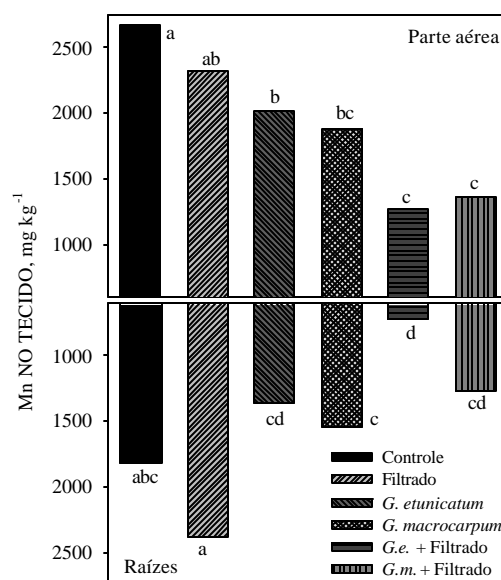


Figura 7 - Teor de Mn na parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) ou *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

A concentração de Si foi maior nas plantas que receberam apenas FMA em relação ao controle (Figura 8), tanto na parte aérea quanto nas raízes. Quando as plantas micorrizadas também receberam o filtrado, os teores diminuíram para valores estatisticamente iguais aos do tratamento controle, tanto na parte aérea, quanto nas

raízes, de forma semelhante ao que ocorreu com o Ca. Os teores de Si encontrados nas raízes foram cerca de três vezes mais altos que os encontrados na parte aérea.

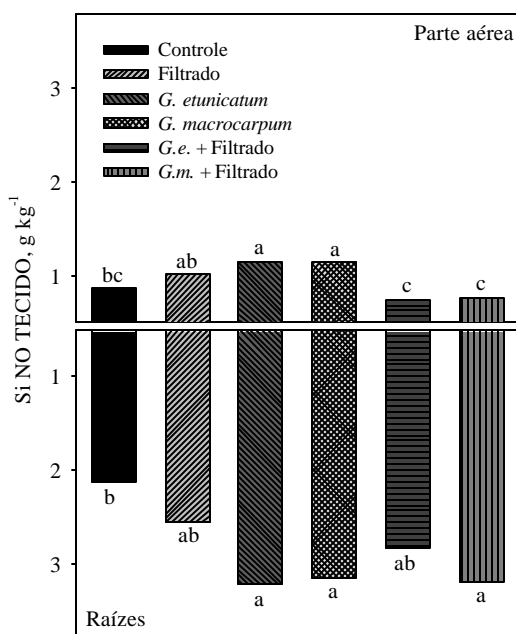


Figura 8 - Teor de Si na parte aérea e raízes de plantas de soja, de acordo com os tratamentos: controle, filtrado, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum* + filtrado (*G.e.* + filtrado) ou *G. macrocarpum* + filtrado (*G.m.* + filtrado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a  $P < 0,05$ .

As variáveis relacionadas à micorrização, ou seja, a % de colonização radicular e o micélio externo total (MET), apresentaram coeficientes de correlação positivos e altamente significativos com as variáveis MSPA, teores de P na parte aérea e raízes, bem como teores de Fe nas raízes (Tabela 2). Quando essas variáveis foram correlacionadas com a disponibilidade de Mn, teores de Mn na parte aérea e raízes, além do teor do Fe na parte aérea, os coeficientes de correlação foram negativos e apenas a correlação entre MET e Mn disponível não foi significativa.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (prob. > |R|) entre algumas variáveis avaliadas no experimento.

variável	Colonização Radicular, %			Micélio Externo Total, m g <sup>-1</sup>		
	Coef. de Pearson	prob. >  R	n	Coef. de Pearson	prob. >  R	n
MET	0,74	0,0001	45	-	-	-
MSPA	0,73	0,0001	48	0,75	0,0001	45
P <sub>parte aérea</sub>	0,85	0,0001	48	0,66	0,0001	45
P <sub>raízes</sub>	0,85	0,0001	34	0,82	0,0001	32
Mn <sub>disponível</sub>	-0,45	0,026	42	-0,18	n.s.	45
Mn <sub>parte aérea</sub>	-0,49	0,0004	48	-0,42	0,0038	45
Mn <sub>raízes</sub>	-0,35	0,04	34	-0,43	0,005	32
Fe <sub>parte aérea</sub>	-0,50	0,0003	48	-0,65	0,0001	45
Fe <sub>raízes</sub>	0,64	0,0001	34	0,77	0,0001	32

## 5.4 Discussão

O fato de as plantas apresentarem severos sintomas de toxidez de Mn em todos os tratamentos no início de seu desenvolvimento novamente se repetiu, assim como no experimento anterior (capítulo 4), nas maiores doses de Mn. Esse comportamento é atribuído ao fato de que na fase inicial de estabelecimento da simbiose não há ou há menos benefício do fungo à planta. Em alguns casos, as plantas micorrizadas nas fases iniciais podem inclusive ser mais injuriadas em relação a plantas não micorrizadas. Isso decorre do fato de que, na fase inicial de estabelecimento, o fungo consome reservas energéticas da planta, a qual pode sofrer ainda mais o efeito do estresse a que é submetida. Entretanto, quando as condições do meio são favoráveis à simbiose, as plantas micorrizadas se recuperam e passam a receber os benefícios da simbiose, o que geralmente resulta em plantas mais vigorosas e com condições de melhor suportar o estresse a que são submetidas. Esse comportamento pode ser visto na Figura 1, a qual mostra um aspecto das plantas em duas fases do seu desenvolvimento. Nota-se que na fase inicial, apenas as plantas com *G. macrocarpum* + filtrado resultavam na supressão dos sintomas de toxidez de Mn nas folhas. Numa fase posterior,

com 70 dias, as plantas micorrizadas apresentaram maior atenuação da toxidez de Mn, principalmente nos tratamentos que, além dos FMA, também receberam o filtrado.

A interação entre fungo-planta-ambiente é fundamental na expressão dos resultados decorrentes da micorrização, os quais podem ser modulados por muitos fatores, tais como: luz, temperatura (Hayman, 1974), tipo de solo (Cardoso, 1986), espécie ou isolado do fungo (Lambais & Cardoso, 1990) e hospedeiro (Fernandes et al., 1987). Sob esses aspectos, nesse experimento o tratamento com *G. macrocarpum* foi o que mais resultou em crescimento da planta, em relação ao tratamento com *G. etunicatum* (Figura 2). É interessante observar que a eficiência dos dois FMA foi aumentada quando também se adicionou o filtrado reintroduzindo a comunidade microbiana nativa. Ainda assim, as plantas do tratamento com *G. macrocarpum* apresentaram resultados mais expressivos. Esse comportamento revela que, além das diferenças de eficiência em auxiliar o crescimento da planta, inerentes às espécies de FMA, ocorre uma modulação dessa resposta de crescimento quando a comunidade microbiana do solo, ou pelo menos parte dela, é restabelecida. Sabe-se que, além da interação entre as plantas e os FMA, também ocorre forte interação entre estes e os demais microrganismos do solo (Paulitz & Linderman, 1989; Linderman, 1992; Posta et al., 1994). Há relatos de que certos isolados de *Bacillus* estimulam a micorrização (Alten et al., 1993; Aboul-Nasr, 1996) e conseqüentemente a produção de micélio externo, fato que pode alterar profundamente a eficiência da simbiose. Nesse experimento, entretanto, não se observaram diferenças significativas quanto à produção de micélio externo ou níveis de colonização radicular pelos FMA nos tratamentos com e sem a adição do filtrado, embora tivesse sido constatado aumento do crescimento das plantas (Figura 2). Os resultados positivos e significativos das análises de correlação entre produção de biomassa da parte aérea das plantas, colonização radicular e produção de micélio externo pelos FMA (Tabela 2) salientam a importância da micorrização no crescimento das plantas. O micélio externo representa um importante componente da simbiose, visto que é o responsável pela exploração de água e nutrientes, principalmente o P, de sítios onde as raízes não alcançam (Li, 1991). Isso ficou bastante evidente pelos altos coeficientes de correlação encontrados entre colonização radicular, produção de micélio externo e os

teores de P na parte aérea e raízes (Tabela 2) e pelos teores encontrados nas plantas micorrizadas (Figura 4).

A presença do micélio externo de FMA *per se* pode liberar substâncias responsáveis pelo estímulo ou inibição de certos grupos microbianos, com impacto no equilíbrio microbiano da rizosfera (Filion et al., 1999). Além disso, também ocorrem mudanças no padrão de exsudação das raízes das plantas micorrizadas, o que influi qualitativamente sobre a comunidade microbiana presente na rizosfera (Andrade et al., 1997). A Figura 9 ilustra a interação entre fungos micorrízicos e outros microrganismos do solo. Nota-se, nesse caso, um grande crescimento bacteriano ao redor de um esporo de fungo micorrízico, constituído por grupos microbianos que podem estar estabelecendo as mais diferentes relações ecológicas entre si, que podem variar desde o neutralismo até uma simbiose mutualística ou um antagonismo (Cardoso, 1992).

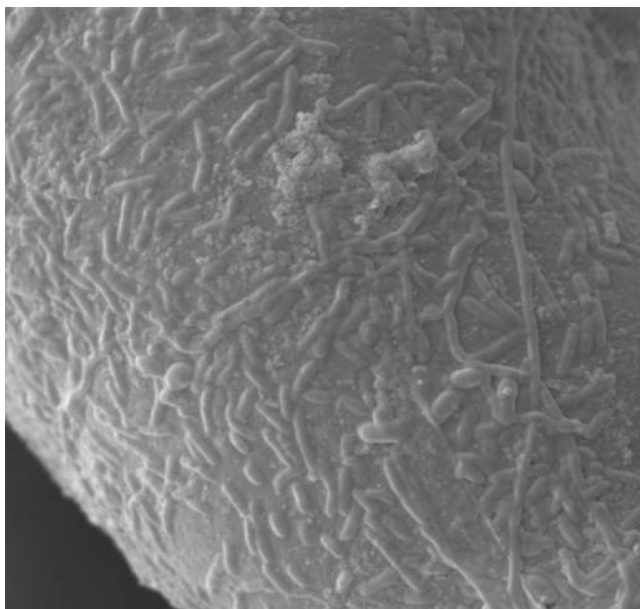


Figura 9 - Crescimento microbiano sobre um esporo de fungo micorrízico arbuscular. Micrografia eletrônica de varredura obtida no Núcleo de Apoio à Pesquisa/ESALQ. Aumento: 2000 x.

As diferenças de resposta de crescimento das plantas aos tratamentos podem estar relacionadas às alterações que ocorreram no substrato. A diminuição dos valores de pH no tratamento com *G. macrocarpum* + filtrado (Figura 3) parece ter

correspondido a aumento da disponibilidade do Fe. Entretanto, no substrato do tratamento que recebeu apenas *G. etunicatum*, houve diminuição da disponibilidade de Fe em relação aos tratamentos controle e filtrado, sem que tivesse havido aumento do pH. Esse comportamento permite sugerir que as mudanças na disponibilidade de Fe não foram devidas a alterações químicas no substrato, mas biológicas, as quais podem ter sido causadas pelas raízes das plantas ou pelos microrganismos associados. Essa suspeita fica ainda mais forte quando se observa que, para o Mn, o comportamento foi o inverso, o qual teve sua disponibilidade significativamente diminuída no tratamento com *G. macrocarpum* + filtrado. Caso a diminuição do pH do substrato estivesse alterando sua disponibilidade, seria de se esperar um aumento e não uma diminuição como ocorreu. Arines et al. (1992) também observaram diminuição da disponibilidade de Mn em substrato em que cresceram plantas micorrizadas o que coincidiu com o maior número de bactérias oxidantes de Mn isoladas desses tratamentos. Os resultados obtidos da quantificação das colônias de bactérias oxidantes e redutoras de Mn nesse experimento não foram influenciados significativamente pelos tratamentos, uma vez que houve grande variação entre os resultados (não apresentados). Essa falta de relação entre número de colônias de oxidantes e de redutores de Mn e os tratamentos empregados, pode ser devida ao modo de amostragem do substrato para a análise, em que foi amostrada uma alíquota do substrato homogeneizado, após a retirada das raízes. Possivelmente maiores diferenças na composição da comunidade microbiana oxidante e redutora de Mn estejam na região rizosférica, a qual possui maior atividade metabólica (Cardoso & Freitas, 1992). Para futuras avaliações da comunidade microbiana oxidante e redutora de Mn, as amostragens de substrato deverão ser feitas na região rizosférica.

Análises de correlação simples entre Fe na parte aérea e raízes e Fe disponível no substrato não foram significativas, ao passo que houve correlação significativa e positiva entre Mn disponível e o seu teor na parte aérea e raízes, com valores do coeficiente de correlação de Pearson de +0,72 e +0,61, respectivamente. Isso indica que o teor de Fe nos tecidos não foi dependente de sua disponibilidade no solo, enquanto que para o Mn houve uma forte relação entre sua disponibilidade no substrato e os teores encontrados na parte aérea e raízes. Essas diferenças indicam que o

mecanismo de regulação da absorção desses dois nutrientes não foi o mesmo. Para o Fe, independentemente da alteração de sua disponibilidade no substrato, parece ter havido alteração do padrão de translocação das raízes para a parte aérea, sendo que, maior concentração nas raízes não resultou em proporcional aumento na parte aérea. De modo contrário, o coeficiente de correlação entre teor de Fe na parte aérea e teor de Fe nas raízes foi de  $-0,59$ . Por outro lado, para o Mn os mecanismos que regularam sua absorção pela planta parecem ter ocorrido no substrato, pois a alteração de sua disponibilidade no substrato refletiu nos teores encontrados tanto na parte aérea quanto nas raízes em proporções semelhantes. A presença de micorriza pareceu ter um papel importante na disponibilidade de Mn no substrato, visto que a colonização radicular apresentou correlação negativa com o Mn disponível (Tabela 2). Da mesma forma, tanto a colonização radicular, quanto a produção de micélio externo, apresentaram correlações negativas com os teores de Mn na parte aérea e raízes e os teores de Fe na parte aérea. De forma contrária, essas correlações foram positivas com o teor de Fe nas raízes, evidenciando que a micorrização atuou de maneira diferenciada nos mecanismos de absorção e translocação de Fe e Mn pelas plantas.

Em um artigo de revisão, Clarkson (1985) cita que a secreção de ácidos orgânicos pelas raízes diminuiu a estabilidade de agregados, que resultou no rompimento de partículas de silte durante o desenvolvimento de feijoeiro, causando aumentos na disponibilidade de Al, Fe e Mn amorfos. A comunidade microbiana da rizosfera é, na sua maioria, dependente de compostos de carbono que são desprendidos ou exsudados pelas raízes, tais como açúcares, compostos aminados, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e ésteres fosfato, o que constitui um custo para a planta que pode chegar a 40% da fotossíntese total (Lynch & Whipps, 1990). Entretanto, sabe-se que as interações micorrízicas alteram quantitativa e qualitativamente o padrão de exsudação das raízes (Rengel, 1997), o que resulta em alteração da composição da comunidade microbiana na rizosfera das plantas (Kothari et al., 1990). Nesse experimento essa alteração da comunidade microbiana causada pela micorrização é perfeitamente passível de ter ocorrido, o que certamente refletiu nos padrões de disponibilidade e absorção de Fe e Mn.

O fato de que as plantas micorrizadas apresentaram teores semelhantes de P nos tratamentos com e sem o restabelecimento da comunidade microbiana (Figura 4) ressalta mais a hipótese de que a atenuação dos sintomas de toxidez de Mn foi causada por alterações da disponibilidade e padrões de absorção e translocação de Fe e Mn nas plantas micorrizadas pelo restabelecimento da comunidade microbiana. Em algumas situações, a atenuação da toxidez de Mn parece ocorrer pela diminuição da atividade de íons  $Mn^{2+}$  no interior da planta pela formação de compostos insolúveis com o íon fosfato (Foy, 1984; Ma & Takahashi, 1990). Caso esse mecanismo de atenuação da toxidez de Mn tivesse ocorrido nesse experimento, as plantas micorrizadas e sem o restabelecimento da comunidade microbiana nativa também teriam apresentado maior desenvolvimento e atenuação dos sintomas de toxidez, visto que apresentaram maiores concentrações de P tanto na parte aérea quanto nas raízes. Entretanto, deve-se considerar que os mecanismos que levam à atenuação da toxidez de Mn não ocorrem isoladamente, mas conjuntamente, em maior ou menor intensidade. O Si é reconhecidamente atenuador da toxidez de Mn (Horst & Marschner, 1978) e pode ter sua concentração aumentada nas plantas micorrizadas (Yost & Fox, 1982; Nogueira et al., 2000). Porém, nesse experimento, sua concentração foi pouco alterada e não permitiu estabelecer relação com a atenuação da toxidez de Mn observada.

## 5.5 Conclusões

- As plantas micorrizadas apresentaram maior crescimento e atenuação da toxidez de Mn, o que se tornou mais evidente quando também receberam o filtrado proveniente do solo natural, com melhores resultados para a micorrização com *G. macrocarpum*.
- A micorrização das plantas resultou em alterações no pH e na disponibilidade de Fe e Mn no substrato, mas a direção dessas alterações foi modulada quando se restabelece a comunidade microbiana nativa;

- O padrão de concentração de Fe e Mn na parte aérea e raízes foi diferenciado, sendo a concentração de Fe nas plantas menos dependente de sua disponibilidade no substrato, ao contrário do que ocorreu para o Mn.
- Os mecanismos que atuam na absorção e translocação de Fe estão mais relacionados a eventos que ocorrem nas raízes ou na interface raiz/substrato, enquanto que para o Mn os mecanismos são mais dependentes de eventos que ocorrem no substrato.

## 6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS OXIDANTES E REDUTORAS DE MANGANÊS COM BASE EM SEQUÊNCIAS DO rDNA 16S.

### Resumo

O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bactérias oxidantes e redutoras de Mn por meio do seqüenciamento da porção do DNA genômico que codifica para a região 16S do rRNA. Para o isolamento das bactérias oxidantes e redutoras de Mn foi feita diluição em série e plaqueamento de amostras do substrato utilizado no experimento apresentado no capítulo 5, em meio de cultura apropriado para o isolamento de cada grupo. Para o isolamento de bactérias oxidantes de Mn foram testados previamente dois meios de cultura, obtendo-se sucesso em apenas um deles, ainda assim somente após ajuste do teor de Mn solúvel no meio. Foram obtidos 29 isolados de bactérias redutoras de Mn; quatro isolados morfológicamente semelhantes, mas sem capacidade de redução, além de 28 isolados com capacidade de oxidação de Mn. Seis isolados de cada grupo mais um não redutor foram cultivados em meio líquido e a suspensão de células submetida à extração de DNA genômico para seqüenciamento após amplificação por PCR da região do rDNA 16S, com a finalidade de identificação e estabelecimento de relações filogenéticas com seqüências depositadas no *GenBank*. Todos os isolados redutores de Mn, se enquadraram no gênero *Streptomyces*, exceto um que se enquadrou no gênero *Variovorax*. Os oxidantes de Mn se agruparam em três *clusters* distintos pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Variovorax* e *Ralstonia*, sendo que alguns isolados apresentaram homologia com uma bactéria quimiolitotrófica oxidante de Fe ainda não classificada, identificada apenas pelo seqüenciamento parcial de seu DNA.

**Summary: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MANGANESE OXIDIZING AND REDUCING BACTERIA BASED ON 16S rDNA SEQUENCE.**

The aim of this work was to isolate and identify Mn oxidizing and reducing bacteria, by means of sequencing the genomic DNA region which codifies for the 16S rRNA. With this purpose, Mn oxidizing and reducing bacteria were isolated by plating a suspension of substrate samples from the experiment described in the chapter 5, on specific growing media, for each case. For the isolation of Mn oxidizing bacteria two growth media were previously tested, from which only one was successful in retrieving Mn oxidizing bacteria, and even that only after the adjustment of an ideal Mn concentration in the medium. We obtained 29 Mn reducing isolates and four additional ones with a similar morphological pattern, but these were none Mn reducing, and 28 Mn oxidizing isolates. Six isolates of each group plus one of the non-reducing group were cultivated in liquid medium and the cells suspensions were used for DNA extraction. The 16S rDNA region of each isolate was sequenced, after amplifying by PCR, with the purpose of identifying them and establishing their phylogenetical relationships with sequences deposited in the GenBank. Almost all Mn reducing isolates belong to the genus *Streptomyces*, except one, which presented high homology with the genus *Variovorax*. The Mn oxidizing isolates formed three clusters belonging to the genera *Arthrobacter*, *Variovorax* and *Ralstonia*, and some of them presented homology with a Fe oxidizing bacterium which has not yet been classified but was identified by partial sequencing of its DNA.

## **6.1 Introdução**

Os resultados apresentados nos capítulos 3 e 5 fortaleceram a hipótese de que a disponibilidade de Mn no solo argiloso era influenciada pela atividade de bactérias oxidantes e redutoras de Mn. Diante disso, surgiu a necessidade de se tentar isolar e identificar os organismos envolvidos nesse processo.

Para o isolamento de grupos de bactérias com capacidade de oxidação ou redução de Mn, foram utilizados meios de cultura que permitem que as colônias de bactérias expressem essa atividade e sejam identificadas pela transformação característica que causam no meio em que se desenvolvem. No caso do meio de cultura específico para redutores de Mn, este recebe Mn na forma oxidada, geralmente  $\text{KMnO}_4$ , o qual torna o meio de cultura marrom pela presença de Mn oxidado. Quando uma colônia de bactéria capaz de reduzir Mn se desenvolve nesse meio, ocorre a formação de um halo claro ao redor da mesma, resultado da redução do  $\text{Mn}^{4+}$  para  $\text{Mn}^{2+}$  (Marschner et al., 1991). Já as bactérias oxidantes de Mn são identificadas pela deposição de um precipitado marrom ao redor ou sobre suas colônias, já que o meio utilizado para seu desenvolvimento (meio de Garretsen) (Huber & Graham, 1992) contém Mn reduzido (incolor) e é inicialmente branco. A deposição de óxidos de Mn pode ser confirmada pela reação com algumas gotas de uma solução de leuco-cristal violeta, a qual, em contato com óxidos de Mn, exibe coloração azul. Outro meio de cultura também utilizado para o isolamento de bactérias oxidantes de Mn é o meio de Bromfield (Bromfield, 1974). Nesse caso, o meio para a obtenção de colônias oxidantes de Mn deve conter baixa concentração de substrato orgânico, porque mudanças de pH para valores maiores que 8 ou menores que 6, decorrentes do crescimento microbiano exagerado na presença de alimento abundante, impedem a formação de óxidos de Mn. Assim, pode haver a desvantagem de que a baixa disponibilidade de nutrientes e energia nesse meio possa inibir o desenvolvimento de colônias potencialmente oxidantes de Mn.

Alguns grupos de microrganismos têm sido isolados e identificados quanto à sua capacidade de oxidação ou redução de Mn. Posta et al. (1994) encontraram, entre as bactérias redutoras de Mn no solo, os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Actinomyces*. Já as relatadas como oxidantes de Mn são *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* (Bromfield & Skerman, 1950), *Arthrobacter* (Bromfield, 1974) e *Leptothrix discophora* (Boogerd & Vrind, 1987). Nota-se que, em alguns casos, bactérias relatadas como oxidantes, também podem ser redutoras de Mn, como é o caso do gênero *Bacillus*. Uma extensa revisão sobre a biologia de bactérias oxidantes de Fe e Mn é apresentada por Ghiorse (1984).

O primeiro passo para estudar os processos biológicos deve ser a identificação do organismo relacionado ao processo. As tentativas de se estabelecer a classificação filogenética de um organismo com base em características fenotípicas são limitadas, o que se torna ainda mais complicado no caso de bactérias (Woese, 1987). Entretanto, com os recentes avanços da biologia molecular, tornou-se possível a identificação de organismos a partir do seqüenciamento de uma parte específica de seu DNA genômico. No caso de bactérias, uma das regiões mais utilizadas é a que codifica para a subunidade 16S do rRNA. Dentro dessa molécula a porção mais informativa ou discriminativa é o sexto elemento da porção terminal 5' (posição 60-120 de *Escherichia coli*) (Ludwig et al., 1998). A partir do seqüenciamento, a identificação, bem como o estabelecimento de relações filogenéticas, se faz por comparação com as seqüências obtidas de vários organismos, depositadas em bancos de dados com seqüências de genes ribossomais (Ludwig & Schleifer, 1994). Embora não exista um consenso oficial, similaridades ao redor de 95% podem ser aceitas como o limite para considerar dois indivíduos como pertencentes ao mesmo gênero (Ludwig et al., 1998).

Embora o seqüenciamento parcial do rDNA 16S seja criticado (Ludwig et al., 1998), Kataoka et al. (1997) utilizaram com sucesso uma seqüência de nucleotídeos de apenas 120 pares de base da região  $\alpha$  do rDNA 16S para criar um índice para identificação rápida dentro do gênero *Streptomyces*. Essa região  $\alpha$  apresenta variabilidade de bases que permite a discriminação entre as espécies e está localizada na posição 158-277 do rDNA 16S de *Streptomyces ambofaciens* (Stackebrandt et al., 1991).

O objetivo desse trabalho foi fazer o isolamento e identificação, por meio de seqüenciamento parcial da região do DNA genômico que codifica para a subunidade 16S do rRNA, de bactérias oxidantes e redutoras de Mn.

## 6.2 Material e Métodos

O isolamento das bactérias oxidantes e redutoras de Mn, extração do seu DNA genômico, amplificação da região que codifica para o rRNA 16S por PCR e seu

seqüenciamento parcial foram feitos no Instituto de Biologia e no Instituto de Ecologia e Fisiologia de Plantas da Universidade de Tübingen – Alemanha.

O meio de cultura usado para o isolamento das bactérias redutoras de Mn foi um meio não seletivo (Ridge & Rovira, 1971; modificado por Marschner et al. 1991), constituído por ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,12);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,002);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,001); glicose (2,5); peptona (2,5); extrato de levedura (5,0); bacto ágar (10,0). Após a autoclavagem e resfriamento a  $50^\circ\text{C}$ , adicionaram-se 474 mg de  $\text{KMnO}_4$ , previamente dissolvidos em 40 mL de água destilada autoclavada. A adição do  $\text{KMnO}_4$  torna o meio marrom pela formação de óxidos de Mn, principalmente  $\text{MnO}_2$ . Finalmente, para inibir o crescimento fúngico, adicionaram-se  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cicloheximida, previamente dissolvidos em 5 mL de etanol a 70%, momentos antes de se verter o meio nas placas de Petri de 9 cm de diâmetro (20 mL por placa).

As bactérias oxidantes de Mn foram isoladas no meio de Garretsen (Huber & Graham, 1992), ligeiramente modificado, previamente testado quanto à concentração de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , constituído de ( $\text{g L}^{-1}$ ): Citrato tricálcico (20);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,01);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05); ágar (20), dissolvidos em 0,8 L de água destilada e autoclavados separadamente de 0,2 L de água destilada contendo 0,05; 0,20; 0,80; 2,0 ou 5,0  $\text{g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , usado para se fazer uma prévia seleção da concentração de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  que propiciasse o melhor crescimento das colônias de bactérias e atividade de oxidação de Mn. O pH foi ajustado para 7,0 com HCl ou NaOH 0,1N e os frascos autoclavados. Após resfriamento a  $50^\circ\text{C}$ , as duas soluções autoclavadas separadamente foram misturadas em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura foi mantido sob agitação em agitador magnético até o momento de verte-lo para placas, para evitar a sedimentação do citrato tricálcico. Um segundo meio de cultura para oxidantes de Mn foi também testado em vários experimentos, combinando-se concentrações de sacarose e extrato de levedura (Bromfield, 1974), na tentativa de se isolar bactérias oxidantes de Mn, cuja constituição foi ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1);  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (0,1);  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,20), de acordo com Arines et al. (1992); ágar (20); sacarose (0,012; 0,024; 0,075; 0,150; 0,50; 1,0; 1,5

ou 2,0); extrato de levedura (0,015; 0,030; 0,10; 0,20; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0), em esquema fatorial com cinco réplicas. Essa combinação entre doses de extrato de levedura e sacarose no meio de cultura teve o objetivo de se tentar encontrar a melhor combinação desses dois constituintes para a promoção da deposição de Mn oxidado. Em todos os meios de cultura foi adicionada cicloheximida, da mesma maneira, forma e quantidade que no meio para redutores de Mn. Os valores de pH no meio de Bromfield foram medidos após 30 dias de incubação a 27°C, cortando-se todo o meio em pequenos pedaços (aproximadamente 20 g), adicionando-se 50 mL de água deionizada, procedendo-se à leitura do pH do sobrenadante após pelo menos 20 min de equilíbrio.

Alíquotas do substrato do experimento descrito no capítulo 5, armazenadas a 5°C (3 g em 27 mL de solução de NaCl 0,9%), em sete das oito repetições, foram colocadas em frascos erlenmeyer previamente autoclavados contendo a solução salina e agitadas por 1 h em um agitador horizontal a 270 rpm. Cada frasco recebeu aproximadamente 100 pérolas de vidro (2,7-3 mm de diâmetro) previamente autoclavadas, para auxiliar no rompimento dos agregados do substrato e liberar as bactérias para a suspensão. A partir dessa suspensão, foram feitas diluições seriais até a ordem de  $1 \times 10^{-4}$ . Uma alíquota de 50  $\mu$ L foi espalhada na superfície de cada placa contendo o meio de cultura e incubada a 27°C. A atividade de redutores de Mn foi avaliada com 3 dias, procedendo-se nova contagem com 5 dias, enquanto os oxidantes no meio de Garretsen foram avaliados com 7 dias de incubação. Nesse último, uma gota de uma solução de leuco cristal violeta (LCV a 0,04% em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N) foi usada como indicador para confirmar a presença de Mn oxidado, apesar do aspecto marrom característico das colônias (Huber & Graham, 1992). A reação do LCV com os óxidos de Mn resulta em coloração azul.

Várias colônias isoladas (de redutores ou oxidantes) foram purificadas pelo método do estriamento, em quatro zonas de diluição, no respectivo meio de cultura, porém sem cicloheximida. As colônias isoladas foram estriadas pela segunda vez da mesma maneira, numa nova placa, de onde uma outra colônia isolada, considerada pura e, daqui em diante, denominada clone, foi inoculada para se multiplicar numa terceira

placa. Colônias provenientes dessa última placa foram coletadas com auxílio de alça de platina, em câmara de fluxo laminar, e armazenadas em glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pela morfologia das colônias e com auxílio de microscópio óptico, observou-se que as colônias de redutores de Mn eram muito semelhantes a *Streptomyces*. Essas colônias foram agrupadas de acordo com sua morfologia (coloração, abundância de “micélio”, rapidez de crescimento, redução de Mn), sendo atribuída uma letra, variando de “A” a “G”, seguida de um número que representa a repetição e o tratamento do qual foi proveniente. Com a finalidade de comparação com as bactérias de colônias redutoras, algumas colônias semelhantes às de *Streptomyces*, porém sem capacidade de redução de Mn no meio de cultura, também foram isoladas e processadas da mesma maneira, mas designadas pelas letras NR (não redutoras). As colônias de oxidantes receberam apenas um número, precedido das letras “Ox”, relacionado ao número do vaso do qual foram isoladas, uma vez que não foi possível distinguir morfologicamente cada colônia.

Para se obter material para extração de DNA, transferiu-se uma colônia da placa de crescimento para erlenmeyer com 25 mL de meio líquido previamente autoclavado, tomando-se cuidados para evitar contaminações. No caso dos redutores de Mn, utilizou-se o meio HA, contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de levedura (4); extrato de malte (10); glicose (4); pH ajustado a 7,3. Os oxidantes de Mn foram cultivados em meio LB, contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): caseína hidrolizada (10); extrato de levedura (5); NaCl (5); pH ajustado a 7,5. Após a inoculação, o meio líquido foi agitado em agitador horizontal (40 rpm) a  $27^{\circ}\text{C}$ . Após 47 dias de crescimento, as células em suspensão foram precipitadas por centrifugação. Todo o conteúdo do frasco erlenmeyer foi transferido para frascos de centrífuga de 50 mL e centrifugado por 10 min a  $10.000\text{ g}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , descartando-se o sobrenadante. Para os redutores de Mn, o *pellet* formado pela massa de células precipitadas foi homogeneizado em um almofariz de 5 mL, com auxílio de pistilo. Esse procedimento foi necessário porque este grupo de bactérias formou pequenos grumos durante seu crescimento. Após homogeneização, que para os oxidantes bastou agitar em agitador de tubos por alguns segundos, os *pellets* foram ressuspensos em 1,5 mL de água esterilizada, por agitador de tubos, transferidos para um frasco eppendorf® de 2 mL e

novamente precipitados, agora a 14.000 g por 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de ser usado para extração do DNA genômico.

A extração do DNA genômico das bactérias foi feita com o uso de um kit da Qiagen<sup>®</sup> (Qiagen RNA/DNA mini kit (25) n.º. 14123), de acordo com as instruções do fabricante, exceto que os dois passos finais da lavagem do *pellet* de DNA foram omitidos. Como a quantidade de material a ser utilizado para extração de DNA é fator limitante para o bom funcionamento da resina de troca, foi feita uma calibração aproximada, com base em células de *E. coli*. O fabricante recomenda uma quantidade máxima de  $4 \times 10^8$  células para cada procedimento de extração. Assim, foi obtido o valor de 32 mg para o peso fresco de um *pellet* de *E. coli* contendo  $3,4 \times 10^8$  células, facilmente quantificadas por espectrofotometria. Essa quantidade de células permitiu que a capacidade de retenção de ácidos nucleicos da resina não fosse superada. Esse valor (32 mg) foi utilizado como alíquota de células a serem submetidas à extração de DNA de todos os clones isolados.

Cada produto da extração de DNA foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) e verificado em gel de eletroforese de agarose a 1% em um transiluminador com luz ultravioleta (Herolab E.A.S.Y. RH. Germany), após coloração com brometo de etídio. Em cada gel acrescentou-se a uma canaleta um marcador Lambda DNA/*Hind*III Marker, 2 (MBI Fermentas<sup>®</sup>). A partir do material extraído, um fragmento que codifica para a região 16S do rRNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se um par de iniciadores universais (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; posição 8 a 27 e 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'; posição 1541 a 1522 [numeração baseada em *E. coli*]) (Ramos et al., 1997). Na amplificação, utilizou-se o kit Taq PCR Core (Qiagen<sup>®</sup>), num volume final de reação de 100  $\mu\text{L}$ . As reações de PCR e as seguintes reações de seqüenciamento foram conduzidas em um termociclador utilizando-se os seguintes tempos e temperatura: um ciclo a  $36^{\circ}\text{C}$  por 1 min e  $92^{\circ}\text{C}$  por dois minutos, para desnaturação prévia, seguida por 36 ciclos consistindo de desnaturação a  $92^{\circ}\text{C}$  por 1 min, anelamento a  $45^{\circ}\text{C}$  por 45 s e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1,5 min. No final dos 36 ciclos,

foi realizado um ciclo extra para extensão a 72°C por 3 min. Um controle negativo (sem DNA) foi adicionado em cada reação para se confirmar a ausência de contaminantes. Os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose a 1%, como anteriormente, após purificados com auxílio do kit E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle-Pure kit (PeqLab<sup>®</sup>), de acordo com a recomendação do fabricante. Em seguida, o material foi ressuspendido em 25 ou 40 µL de 5 mM Tris-Cl pH 8, de acordo com a intensidade da banda observada anteriormente no gel de agarose e armazenado a -20°C até ser utilizado.

Os iniciadores de seqüenciamento, além daqueles usados para a amplificação da região 16S pela PCR, foram escolhidos com base nas regiões conservadas de cerca de 150 seqüências de bactérias obtidas do *GenBank* (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa Clustal W. Dessa maneira, foram construídos os primers: 5'-GGC CTT CGG GTT GTA AA-3'; e 5'-TTT ACA ACC CGA AGG CC-3' (posições 416 a 432 e 432 a 416, respectivamente da numeração de *E. coli*). O seqüenciamento foi feito utilizando-se dideoxirribonucleotídeos trifosfatos marcados (Kit ABI PRISM<sup>®</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction). Os parâmetros da reação de PCR de seqüenciamento foram: 1 ciclo a 36°C por 1 min e 92°C por 30 s, seguidos de 36 ciclos a 92°C por 30 s para denaturação, anelamento a 42°C por 15 s e extensão a 60°C por 3 min. Os produtos da reação foram precipitados pela adição de 2µL de LiCl 4M e 40µL de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 14.000 g por 40 min a 20°C e ressuspendidos em 4 µL de solução tampão de carregamento, contendo formaldeído. Antes de se carregar o gel de seqüenciamento, as amostras foram desnaturadas a 92°C por 3 min. A eletroforese e a coleta dos dados foi feita em um seqüenciador modelo ABI 373A (Perkin-Elmer Corporation), conectado a um computador Macintosh. As duas fitas do fragmento amplificado foram seqüenciadas.

A seqüência final de cada clone foi obtida pela comparação e montagem das seqüências das duas fitas por meio do *software* "Sequencher", após o que foi comparada quanto à similaridade com as existentes no banco de dados do *National Center for Biochemistry Information* (NCBI), utilizando-se o programa BLAST N (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul, 1997). Para a obtenção da árvore filogenética de cada grupo de bactérias utilizou-se o método *neighbor-joinig*

(Saitou & Nei, 1987), após o cálculo da matriz de similaridade por meio do programa Phylip, utilizando-se o método *Maximum Likelihood* (URL: <http://rdp.cme.msu.edu/cgis/phylip.cgi>). Para isso, seqüências representativas depositadas no *GenBank*, que apresentaram alta homologia com as seqüências obtidas, foram incluídas na árvore como referência. O conjunto de seqüências foi carregado no programa sem a opção de inclusão de vizinhos, ou seja, seqüências com alta similaridade depositadas no RDP.

### 6.3 Resultados

Colônias capazes de reduzir Mn foram observadas após 3 dias de incubação, pela formação de um halo claro ao redor das mesmas (Figura 1). Quando se adicionou uma gota de HCl 0,1 N à superfície desse meio não inoculado, houve a formação de uma área clara abaixo e ao redor do ponto de aplicação em poucos minutos, de forma semelhante àquelas formadas ao redor das colônias das bactérias redutoras. Nesse caso, ficou evidente que a redução do Mn foi devida à diminuição do pH pelo HCl. Para avaliar se o halo claro gerado por algumas colônias foi resultante da diminuição do pH devido ao metabolismo bacteriano, foi feita a excisão do ágar na região do halo, pelo uso de um vazador. O ágar ao redor das colônias que não formaram halo claro também foi extraído e ambos submetidos a avaliações do pH, após o equilíbrio de 4 g do ágar com 10 mL de água destilada. O valor de pH no ágar proveniente do halo claro ao redor das colônias foi de  $8,79 \pm 0,23$  enquanto que no ágar ao redor das colônias que não formaram halo foi de  $8,87 \pm 0,35$ . No meio não inoculado o valor foi de  $7,61 \pm 0,10$ , o que indicou que a inoculação do meio resultou em aumento do pH e não em diminuição.

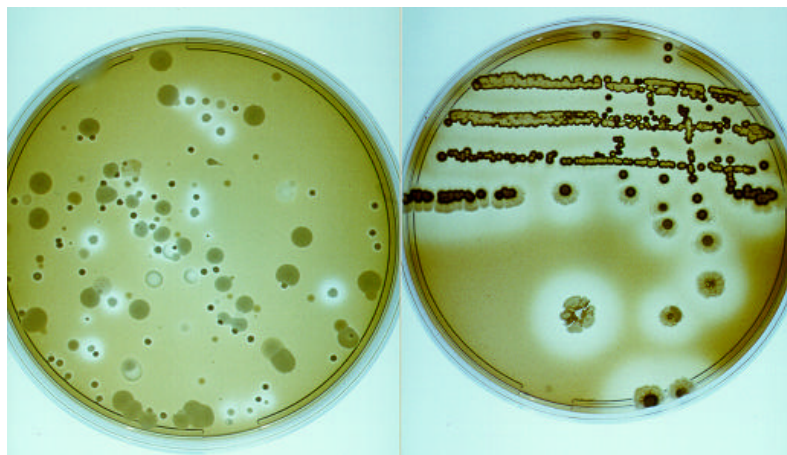


Figura 1 - Aspecto das placas com crescimento de bactérias com capacidade para redução de Mn. À esquerda, no plaqueamento de uma suspensão  $5 \times 10^{-6}$  do substrato, algumas colônias formam halo claro, resultado da redução do Mn oxidado do meio, inicialmente marrom. À direita, uma das colônias, com capacidade de redução de Mn da placa à esquerda, foi estriada em nova placa para a obtenção de colônias isoladas.

No meio de Bromfield para oxidantes de Mn, nenhuma deposição de óxidos de Mn foi obtida com até 40 dias de incubação, em qualquer combinação entre doses de extrato de levedura e sacarose. Após 14 dias de incubação, algumas colônias causaram coloração marrom no meio ao redor, a qual não apresentou reação com o LCV, portanto não resultante do Mn oxidado, mas possivelmente proveniente de pigmentos produzidos pelo crescimento bacteriano. Maiores doses de sacarose e extrato de levedura (ambos superiores a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) causaram aumento no pH do meio do valor inicial de 6,85 para valores superiores a 7,5 (Tabela 1), enquanto as doses mais baixas resultaram em apenas ligeiro aumento no pH do meio (não apresentado), porém em pobre crescimento bacteriano. Em qualquer caso, a deposição de óxidos de Mn não foi claramente observada sob, ao redor ou sobre as colônias. Na tentativa de se obter deposição de óxidos de Mn, as placas foram incubadas até 40 dias, o que resultou em auto-oxidação do Mn adicionado em todo o meio, conforme foi verificado pela reação com LCV, mas sem que houvesse pontos distintos de oxidação de Mn próximos às colônias. A auto-oxidação do Mn também ocorreu no meio de cultura de placas não inoculadas, mantidas como controle.

Tabela 1. Valores de pH ( $\pm$  desvio-padrão) resultantes da combinação entre doses de extrato de levedura e sacarose no meio de Bromfield para oxidantes de Mn

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )			
	0,5	1,0	1,5	2,0
0,5	7,93 (0,03)	8,05 (0,05)	8,05 (0,18)	8,10 (0,07)
1,0	6,83 (0,14)	7,38 (0,03)	7,56 (0,08)	7,50 (0,15)
1,5	7,56 (0,03)	7,68 (0,10)	7,70 (0,05)	7,62 (0,16)
2,0	7,0 (0,23)	7,66 (0,05)	7,82 (0,10)	7,58 (0,04)

A obtenção de colônias de bactérias com deposição de óxidos de Mn foi possível no meio de Garretsen após setes dias de incubação, apenas na concentração de 0,8 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Figura 2). Nas concentrações de 0,05 e 0,20 g L<sup>-1</sup> não houve deposição de óxidos de Mn, o que foi confirmado com adição da solução de LCV às placas, embora o crescimento bacteriano tivesse ocorrido. Nas duas maiores concentrações de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (2 e 5 g L<sup>-1</sup>) houve deposição de óxidos por algumas colônias, mas o crescimento bacteriano foi fortemente inibido na concentração de 2 g L<sup>-1</sup> e quase completamente inibido na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Com esses resultados, a concentração usada para o isolamento de oxidantes de Mn foi de 0,8 g L<sup>-1</sup>.

Foram obtidos 29 clones de redutores, 4 de não redutores e 25 de oxidantes de Mn. Um isolado não redutor, seis oxidantes e seis redutores foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à extração de DNA, amplificação por PCR da região que codifica para o rRNA 16S e seqüenciados.

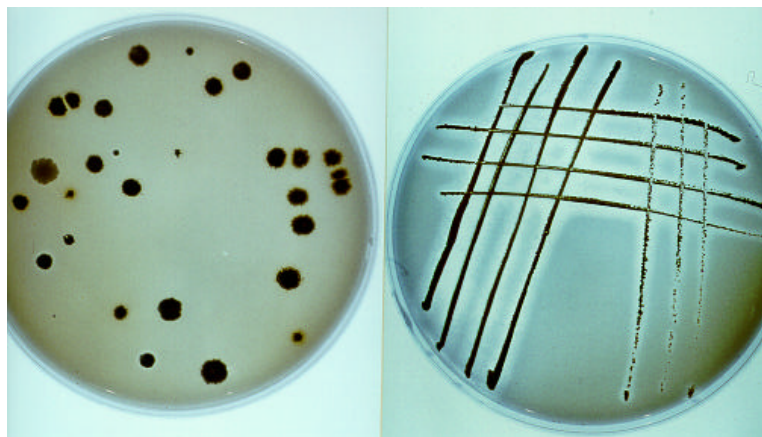


Figura 2 - Aspecto das placas com crescimento de bactérias com capacidade para oxidação de Mn. À esquerda, no plaqueamento de uma suspensão  $5 \times 10^{-6}$  do substrato, algumas colônias formam deposição de Mn oxidado, a partir de Mn reduzido no meio, inicialmente branco. À direita, uma das colônias com capacidade de oxidação de Mn da placa à esquerda foi estriada em nova placa para a obtenção de colônias isoladas.

O resultado do seqüenciamento das bactérias obtidas do meio para redutores (B6, C33, D45, D47, G13 e G3), incluindo o isolado não redutor (Nr 33), foram comparadas com seqüências depositadas no *GenBank* e, exceto D45, todas apresentaram similaridade maior ou igual a 98 % com espécies do gênero *Streptomyces* (Tabela 2), confirmando o que já era esperado pelo aspecto das colônias. De modo contrário, o isolado D45, apesar de ter apresentado morfologia de colônia semelhante à de *Streptomyces*, apresentou baixa homologia com as seqüências dos demais isolados e com aquelas, também de *Streptomyces*, obtidas do *GenBank* (Figura 3). O isolado B6 apresentou similaridade de 98% com *S. galbus* DSM40480 e com *S. viridochromogenes*; C33, similaridade de 100% com *S. scabies*; D47, 98% de similaridade com *S. longisporus*; G13, 98% com *S. tendae* e 97% com *S. sampsonii*; G3, 99% com *S. bikinensis*; enquanto que Nr33 apresentou similaridade de 99,8% com *S. tendae*.



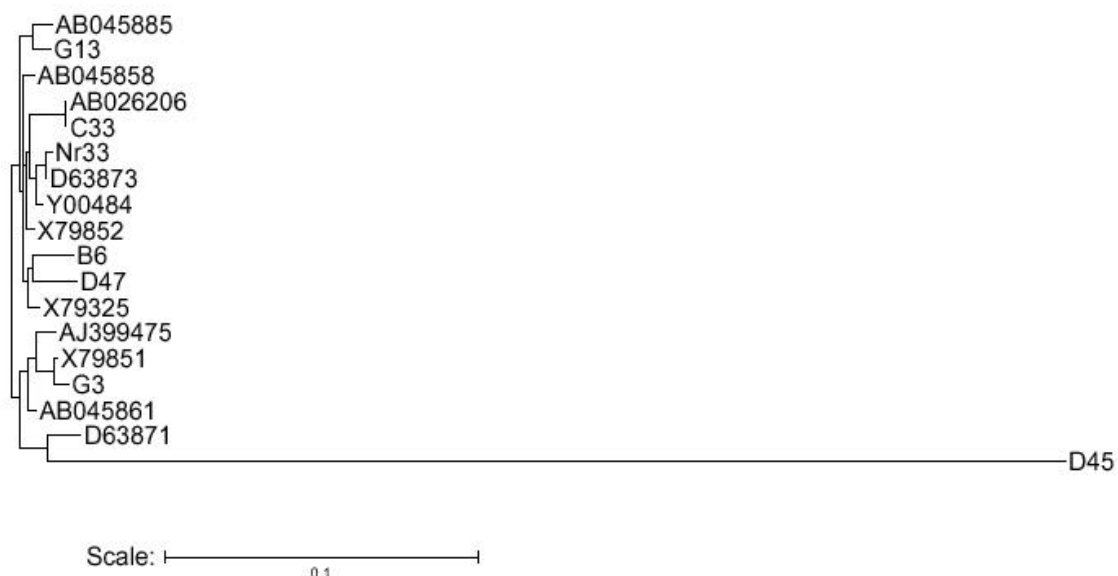


Figura 3 - Relações filogenéticas entre bactérias isoladas em meio para redutores de Mn (C33, G3, D45, D47, B6, Nr33 e G13) e algumas bactérias com seqüências depositadas no *GenBank*.

Uma análise conjunta de similaridade entre todas as seqüências dos isolados, mais as obtidas do *GenBank* (não apresentada), revelou que há similaridade maior que 98% entre os isolados D45 e Ox26, os quais, por sua vez, apresentam similaridade superior a 98% com *Variovorax paradoxus* (D30793). Com essa constatação, o isolado D45, embora redutor de Mn, também foi incluído na análise filogenética das bactérias oxidantes de Mn. O resultado da análise indicou que esses isolados se agruparam em 3 *clusters* definidos (Figura 4), com índices de similaridade superiores a 97% (Tabela 3). O isolado Ox4 se enquadrou no *cluster* formado por seqüências de bactérias do gênero *Ralstonia*, apresentando 99% de similaridade com *Ralstonia* sp. LD3; Ox26 e D45 se enquadraram no *cluster* formado por bactérias do gênero *Variovorax*, Ox26 com 99% de similaridade com *Variovorax paradoxus* (D30793) e D45 com similaridade de 97% com esta espécie; Ox12, Ox17.2, Ox17.3 e Ox10 se enquadraram no *cluster* formado por bactérias do gênero *Arthrobacter*. O isolado Ox12 apresentou 99% de similaridade com dois isolados de *A. globiformis* (X80736). Já os isolados Ox17.2 e Ox17.3 apresentaram 100% de similaridade entre si e



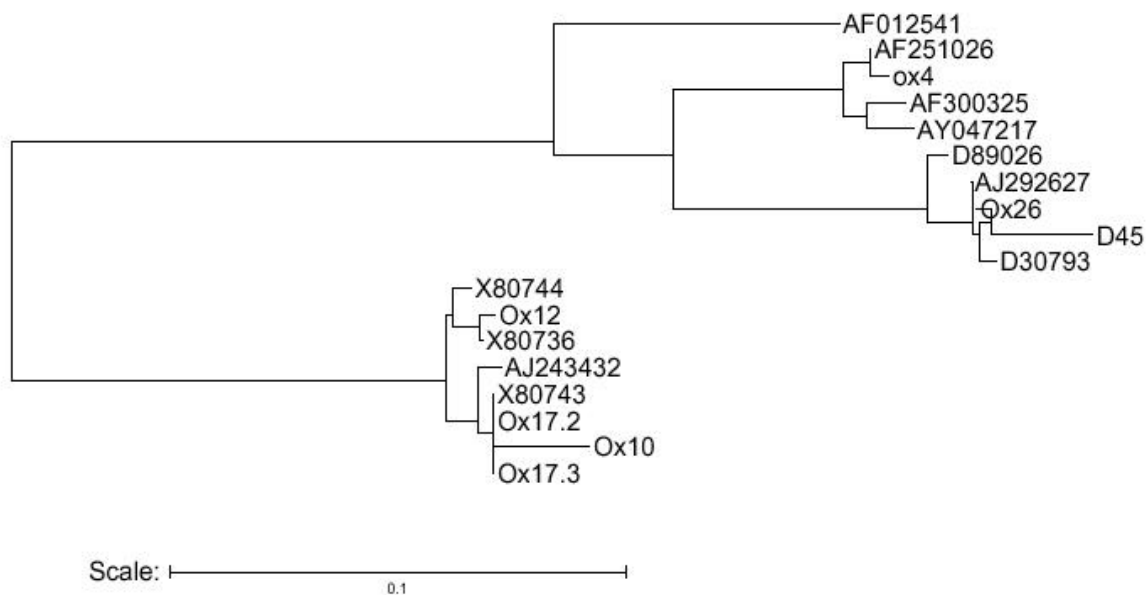


Figura 4 - Relações filogenéticas entre bactérias isoladas em meio para oxidantes de Mn (Ox4, Ox26, O12, Ox17.2, Ox17.3 e Ox10) e da redutora D45, com algumas bactérias com seqüências depositadas no *GenBank*.

#### 6.4 Discussão

A avaliação do pH no meio de cultura para redutores de Mn revelou que no ágar ao redor das colônias não redutoras e no ágar da região em que houve formação do halo claro (redução do Mn), os valores foram aproximadamente os mesmos. Em ambos casos, os valores de pH aumentaram comparando-se com o pH do meio não inoculado, de 7,6 para mais de 8,5. É claro que esse aumento nos valores de pH foi devido à atividade metabólica das bactérias em cultivo e que a redução do Mn, caracterizada pela formação do halo claro, não foi efeito da diminuição do pH, uma vez que, de modo contrário, seu valor foi aumentado em relação ao do meio das placas sem bactérias. De acordo com Ghiorse (1988), os microrganismos redutores de Mn isolados do solo envolvem alguns grupos de bactérias e fungos capazes de produzir  $H_2S$ ,  $H_2O_2$ , ácidos orgânicos ou outros produtos finais do metabolismo que podem reduzir os óxidos de Mn abioticamente. Embora algumas bactérias pareçam envolver enzimas respiratórias

na redução de óxidos de Mn, o envolvimento dessa via metabólica não é bem entendido. Outra observação interessante foi a de que nem todas as colônias de bactéria morfológicamente semelhantes apresentaram atividade de redução de Mn, o que sugere que esta é uma característica genética de cada colônia.

O fato de que a concentração de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  recomendada de  $5 \text{ g L}^{-1}$  (Huber & Graham, 1992) ter inibido quase que completamente o desenvolvimento bacteriano na placa foi surpreendente. Diante dessa situação, foram testadas várias concentrações e observou-se que  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  foi a concentração que resultou em maior crescimento bacteriano, aliado à nítida deposição de Mn oxidado sobre as colônias. A formação de Mn oxidado foi caracterizada pelo surgimento de uma crosta marrom escura, que pôde ser removida como uma “placa” de óxido. A adição de solução de LCV a essa “placa”, revelou ser Mn oxidado, pela produção de coloração azul do reagente em contato com óxidos de Mn (Huber & Graham, 1992). Essa placa de óxidos de Mn ofereceu certa resistência à fratura quando pressionada com uma alça de platina, quebrando-se em fragmentos angulares, o que é característico de estruturas rígidas.

Utilizando um extrato de células, Douka (1980) observou forte evidência de oxidação enzimática de Mn, uma vez que esta foi completamente inibida por aquecimento e  $\text{HgCl}_2$ . Nesse caso, a velocidade de formação de óxidos de Mn dependeu da concentração do substrato, isto é, da disponibilidade de  $\text{Mn}^{2+}$ . Notou-se também que em baixas concentrações de  $\text{Mn}^{2+}$  disponível, equivalentes às doses de  $0,05$  e  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  utilizadas nesse experimento, também não houve detecção de oxidação de Mn. Numa concentração de  $\text{Mn}^{2+}$  próxima a de  $0,8 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O L}^{-1}$  utilizada nesse estudo, a taxa de oxidação de Mn foi cerca de 80%. Nas concentrações de  $2$  e  $5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , o crescimento bacteriano foi inibido, possivelmente pelo excesso da concentração desse metal no meio. Diante desses resultados, decidiu-se pelo uso do meio de Garretsen, com concentração de  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para o isolamento dos oxidantes de Mn, uma vez que esse processo foi muito evidente nesse meio, apesar da crítica apresentada por Bromfield & Skerman (1950) quanto ao uso do citrato tricálcico como fonte de carbono. Segundo esses autores, a deposição de óxidos de Mn por

bactérias cultivadas nesse meio pode ser de origem não biológica, resultado de subprodutos do metabolismo do citrato tricálcico que entra na constituição do meio.

Os meios de cultura utilizados permitiram selecionar algumas bactérias com capacidade de oxidação e redução do Mn. Entretanto, a observação desse fenômeno no meio artificial não necessariamente significa que também ocorre no solo. As bactérias em meio artificial são favorecidas por condições ideais e não sofrem competição por substrato, como ocorre no solo. Além disso, não há garantia de que todas as bactérias do solo com essas características sejam capazes de se desenvolverem em meio artificial.

O seqüenciamento do rDNA 16S mostrou ser uma ferramenta rápida e prática para a identificação das bactérias oxidantes e redutoras de Mn. Em virtude do grande número de seqüências depositadas nos bancos públicos de seqüências ribossomais, foi possível obter altos índices de similaridade entre as seqüências obtidas e as seqüências depositadas.

Dos isolados de bactérias redutoras de Mn, apenas um (D45) não se enquadrou no gênero *Streptomyces*. Nesse caso, esse isolado apresentou alta homologia com o gênero *Arthrobacter*, que assim como *Streptomyces*, também é um actinomiceto. Este é um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, Gram-positivas, com alto teor de bases G+C em seu genoma e são conhecidas por serem produtoras de compostos bioativos de interesse comercial como os antibióticos (Araújo, 1998). Devido à sua diversidade metabólica, essas bactérias são capazes de degradar moléculas de alta complexidade como quitina, pectina, lipídeos e compostos aromáticos (Crawford, 1988). O habitat primário do gênero *Streptomyces* é o solo, em condições de pH neutro a alcalino, com ocorrência predominante na camada superficial (0-10 cm), embora também tenham sido encontrados em ambientes aquáticos (Araujo, 1998). O isolado C33 apresentou 100% de homologia com *S. scabies*, agente causal da doença conhecida por sarna da batata (Takeuchi et al., 1996). A homologia entre as seqüências avaliadas, com exceção de D45, foi maior que 96%, mas mesmo assim são filogeneticamente distintas entre si. Takeuchi et al. (1996), mesmo obtendo similaridade de 97,8% entre um isolado de *Streptomyces* causador de sarna da batata e um isolado conhecido de *S.*

*scabies*, concluíram que estes organismos eram distintos. Outro isolado que pôde ser identificado foi o Nr33, visto que apresentou 100% de homologia com *S. tendae*.

Dentre os trabalhos que tratam de redução microbiana de Mn, apenas Posta et al. (1994) relatam o envolvimento de actinomicetos, mas não especificamente de *Streptomyces*. Um dos isolados que apresentou característica de redução de Mn (D45) não apresentou homologia com os demais redutores e outras seqüências de *Streptomyces* (Tabela 2, Figura 3). Entretanto, apresentou similaridade de 98% com o isolado oxidante de Mn Ox26 e com a espécie *Variovorax paradoxus* (sinonímia *Alcaligenes paradoxus*) (Tabela 3, Figura 4), uma bactéria com capacidade de degradação da molécula do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético, utilizando-a como fonte de carbono (Vallaeyes et al., 1998). Esta observação permite inferir que um mesmo organismo, ou organismos geneticamente muito próximos, podem realizar tanto oxidação quanto redução de Mn, dependendo da forma disponível no meio. De forma análoga, enquanto Posta et al. (1994) relataram bactérias do gênero *Bacillus* como redutoras de Mn, Bromfield & Skerman (1950) relataram o mesmo gênero realizando oxidação de Mn.

Os isolados Ox10, Ox12, Ox17.2 e Ox17.3 agruparam-se num *cluster* formado por bactérias do gênero *Arthrobacter*, relatado por Bromfield (1974) como oxidante de Mn. Essas bactérias também são caracterizadas por degradar moléculas de carbaryl (Hayatsu et al, 1999) e bifenis policlorados (PCB) no solo (Gilbert & Crowley, 1998). A espécie *A. nicotinovorans* (X80743), a qual apresentou homologia de 98% com Ox10 e de 100% com os isolados Ox17.2 e Ox17.3, é conhecida como bactéria de solo com capacidade de degradação oxidativa de moléculas de nicotina (Schenk & Decker, 1999). Os mesmos isolados também apresentaram alta homologia com *A. oxidans*. O isolado Ox4 formou *cluster* com bactérias do gênero *Ralstonia*, as quais faziam parte do gênero *Pseudomonas*, citadas por Bromfield & Skerman (1950) como oxidantes de Mn e por Posta et al. (1994) como redutoras, situação semelhante ao que ocorre para o gênero *Bacillus*. Essas bactérias também são conhecidas por atuarem na degradação oxidativa de compostos altamente recalcitrantes como o benzeno, o tolueno e o tricloroetileno e são utilizadas em programas de biorremediação de solos contaminados por essas substâncias (Parales et al., 2000).

O fato de as seqüências dos isolados oxidantes de Mn estarem estritamente relacionadas com bactérias que realizam processos oxidativos no solo reforça a constatação que estas também são capazes de realizarem oxidação de íons  $Mn^{2+}$  e que a deposição de Mn oxidado observada no meio de Garretsen não é apenas uma conseqüência de subprodutos oriundos do metabolismo do citrato tricálcico pelas bactérias, conforme sugeriram Bromfield & Skerman (1950). Além disso, os isolados que formaram *cluster* com as bactérias dos gêneros *Ralstonia* e *Variovorax* também apresentaram homologia considerável com o DNA de uma bactéria oxidante de Fe. Essa bactéria ainda não foi classificada por não ser cultivada em meio artificial, existindo apenas o conhecimento de sua seqüência parcial de DNA da região 16S do rRNA, depositada no *GenBank* sob número AF012541. A extração do DNA dessa bactéria para seqüenciamento foi feita de amostras de sedimento marinho, em locais onde ocorrem concreções de óxidos de Fe de origem biológica.

## 6.5 Conclusões

- Os meios de cultura utilizados possibilitaram o isolamento de bactérias que apresentam características de oxidação e redução de Mn;
- O seqüenciamento parcial da rDNA 16S permitiu a identificação, pelo menos quanto ao gênero dos isolados e, em alguns casos, quanto à espécie;
- No caso dos oxidantes de Mn, o seqüenciamento permitiu o estabelecimento de relações filogenéticas com seqüências de bactérias que também realizam processos de oxidação no solo;
- Por meio do seqüenciamento do rDNA 16S, foi possível constatar que bactérias filogeneticamente próximas realizam tanto oxidação quanto redução do Mn.

## **7 ATENUAÇÃO DA TOXIDEZ DE MANGANÊS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS EM COMPARAÇÃO COM PLANTAS NÃO MICORRIZADAS QUE RECEBERAM FÓSFORO SOLÚVEL.**

### **Resumo**

A atenuação da toxidez de Mn de plantas micorrizadas tem sido observada com certa frequência, o que pode ser decorrência de: alteração da comunidade microbiana de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na rizosfera; aumento da absorção de Si; efeito diluição devido ao maior crescimento e complexação do excesso de Mn no interior da planta pela maior concentração de íons fosfato. Esse trabalho avaliou se o efeito da micorrização na atenuação da toxidez de Mn em soja foi devido ao efeito diluição ou pelos maiores teores de P das plantas micorrizadas. Instalaram-se dois experimentos com as mesmas características, porém um colhido com 45 dias e outro com 90 dias. As plantas de soja foram micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e mantidos dois controles não micorrizados: o primeiro recebeu a mesma dose de P das plantas micorrizadas (controle P1); o segundo recebeu dose adicional de P (controle P2) visando a obtenção de plantas micorrizadas e não micorrizadas com crescimento e concentração de P semelhantes. Esses tratamentos foram combinados com o fornecimento de 0, 5, 10, 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn com MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ao substrato. Aos 45 dias, a micorrização não resultou em atenuação dos sintomas de toxidez de Mn e aumento de crescimento das plantas, situação que foi revertida com 90 dias, quando as plantas micorrizadas apresentaram maior crescimento e atenuação da toxidez de Mn. Nessa época, as plantas do tratamento controle P2 apresentaram biomassa semelhante às das plantas micorrizadas, o que permitiu comparar plantas micorrizadas e não micorrizadas de crescimento semelhantes quanto à manifestação da toxidez de Mn.

Mesmo com biomassa semelhante à das plantas micorrizadas, as plantas do tratamento controle P2 apresentaram sintomas de toxidez de Mn a partir da dose 20 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto nas micorrizadas os sintomas surgiram na maior dose de Mn, mas atenuados. Apesar do crescimento semelhante, as plantas micorrizadas tiveram, aos 90 dias, maior concentração de P que as do tratamento controle P2, o que pode ter contribuído para a atenuação da toxidez de Mn. As análises de microscopia eletrônica com microanálise de raios-X não permitiram constatar formação de precipitados entre P e Mn no tecido das raízes. Apesar disso, as plantas micorrizadas apresentaram, aos 90 dias, diminuição significativa dos teores de Fe e Mn na parte aérea e de Mn nas raízes, comparando-se com as plantas do tratamento controle P2. Isso indica que a micorrização diminuiu a concentração de Mn nos tecidos das plantas e esse não foi apenas um efeito de diluição. O maior crescimento das plantas micorrizadas e daquelas do tratamento controle P2 parece ter estimulado o número de bactérias oxidantes de Mn no substrato, mas isso não foi suficiente para explicar a menor concentração de Mn apenas nas plantas micorrizadas, apesar de que o número de redutores de Mn foi estimulado na rizosfera das plantas controle P2 em uma das doses de Mn.

**Summary: MANGANESE TOXICITY ATTENUATION IN MYCORRHIZAL SOYBEAN PLANTS COMPARED TO NON-MYCORRHIZAL P-FERTILIZED PLANTS.**

Manganese toxicity alleviation in mycorrhizal plants has been frequently observed, what may be the result of: changes in the Mn oxidizing and reducing microbial community in the rizosphere; increase of Si absorption; dilution effect caused by greater growth and Mn complexation by phosphate ions. The objective of this paper is to evaluate if the effect of mycorrhiza in Mn toxicity alleviation in soybeans can be related either to the dilution effect or to the higher P contents of mycorrhizal plants. Two experiments were conducted with the same treatments, but one was harvested after 45 days after planting and the other after 90 days. Soybean plants were inoculated with *G.*

*etunicatum* or *G. macrocarpum* and two non-mycorrhizal controls were kept: the first received the same P dose as mycorrhizal plants (control P1), but the second received a higher dose (control P2). The control with extra P was established to obtain mycorrhizal and non-mycorrhizal plants with the same growth pattern and P content. These treatments were combined with the addition of 0, 10, 20 and 40 mg kg<sup>-1</sup> of Mn in the substrate. At 45 days, mycorrhiza neither attenuated Mn toxicity symptoms nor increased plant growth. At 90 d this behavior was reverted, when mycorrhizal plants presented greater growth and Mn toxicity attenuation. At this time, control P2 and mycorrhizal plants showed the same biomass, what enabled us to compare equivalent mycorrhizal and non-mycorrhizal plants, with regard to Mn toxicity expression. Even with the same growth as mycorrhizal plants, the control P2 plants showed Mn toxicity symptoms from 20 mg kg<sup>-1</sup> onwards, while in the mycorrhizal ones, the symptoms were seen only at 40 mg kg<sup>-1</sup>, but attenuated. In spite of equivalent growth, mycorrhizal plants had, at 90 days, higher P contents in comparison with control P2 plants, what may have contributed to the Mn toxicity attenuation. Although it was not possible to show the presence of P and Mn complexes in the root tissues by the electron microscopical analysis with X-ray microprobes, Fe and Mn contents in shoot and Mn in roots of mycorrhizal plants were lowered at 90 days, when compared to control P2 plants. This shows that mycorrhiza decreased Mn in plant tissues not only as result of the dilution effect. The greater growth of mycorrhizal and control P2 plants seems to have stimulated the number of Mn oxidizing bacteria in the substrate, but this was not enough to explain the lower Mn concentration only in mycorrhizal plants. In addition, the number of Mn reducing bacteria was stimulated in the rizosphere of control P2 plants in one of the Mn doses.

## 7.1 Introdução

Embora haja várias constatações de que a micorrização das plantas auxilia na atenuação da toxidez de Mn (Cardoso, 1986; Bethlenfalvay & Franson, 1989),

não se sabe ao certo quais mecanismos estão envolvidos nesse processo. Alguns autores encontraram alteração da comunidade de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na rizosfera de plantas micorrizadas, o que pode resultar em alteração da disponibilidade de Mn às raízes (Kothari et al., 1990; 1991). Outro fator atribuído à atenuação da toxidez de Mn é o fornecimento de Si às plantas (Horst & Marschner, 1978; Horiguchi, 1988). Assim, se a micorrização aumentar os teores de Si nas plantas, conforme observado por Yost & Fox (1982), pode-se concluir que, pelo menos em parte, a atenuação dos sintomas de toxidez de Mn em plantas micorrizadas pode ser devido ao aumento da concentração de Si, já que este é sabidamente atenuador da toxidez de Mn (Epstein, 1994). Nogueira et al. (2000) observaram que em plantas de soja sob estresse de Mn, a micorrização resultou em aumentos na concentração de Si apenas nas raízes, tendo sido pouco influenciada na parte aérea. Não houve efeitos da micorrização sobre a concentração de Mn na parte aérea, raízes e sua disponibilidade no substrato de cultivo. Apesar disso, as plantas micorrizadas apresentaram atenuação da toxidez de Mn, além de maior concentração de P nos tecidos, o que levou à sugestão de que a atenuação da toxidez de Mn pode ter sido devida à sua complexação com íons fosfato no interior da planta. Há relatos de que a atenuação da toxidez de Mn pode ocorrer por meio de reações de precipitação entre íons  $Mn^{2+}$  e fosfato, o que diminui sua atividade no interior da planta (Foy, 1984; Horst, 1988; Ma & Takahashi, 1990a).

Sabe-se que plantas micorrizadas são fisiologicamente diferentes das plantas não micorrizadas. Isto se deve, além da presença do próprio FMA, também às diferenças quanto à absorção de nutrientes e desenvolvimento da planta (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). Um aspecto importante, sobretudo no que se refere ao estudo da toxidez de Mn, é o efeito diluição a que este elemento está sujeito nas plantas micorrizadas, devido ao seu maior desenvolvimento, principalmente pela maior absorção de P. Assim, uma planta micorrizada poderia apresentar atenuação da toxidez de Mn em decorrência de seu maior crescimento e não devido a fatores diretamente ligados à micorrização. Esse problema de avaliação pode ser superado pelo fornecimento de uma dose de P maior às plantas do tratamento não micorrizado, de modo a compensar a absorção extra de P auferida nas plantas micorrizadas, com o objetivo de se obterem

plantas micorrizadas e não micorrizadas com a mesma biomassa e ainda, se possível, com a mesma concentração de P nos tecidos.

Outro aspecto importante quando se avaliam os efeitos da micorrização na atenuação da toxidez de Mn, é que seus efeitos podem se manifestar de forma diferenciada nas diferentes fases do desenvolvimento da simbiose (Nogueira et al., 1999). A resposta das plantas à formação de micorriza varia com a fase de estabelecimento da simbiose, podendo, em alguns casos, haver efeitos negativos sobre o hospedeiro (Nogueira & Cardoso, 2000). Sob esse aspecto, é importante que se façam avaliações das plantas em pelo menos duas fases do desenvolvimento da simbiose, para que não sejam feitas interpretações errôneas com bases em análises pontuais (Pacovsky & Fuller, 1988), cujos resultados refletem a situação apenas daquele momento, mas que pode ser mudado no momento seguinte em função da evolução da simbiose e sua interação com o hospedeiro.

Esse experimento teve por finalidade avaliar o efeito da micorrização na atenuação de toxidez de Mn em plantas de soja, cultivadas sob doses crescentes de Mn, porém utilizando-se como controle plantas não micorrizadas que receberam maior dose de P que a fornecida às plantas micorrizadas, na tentativa de que estas apresentassem teores de P em seus tecidos e crescimento semelhantes. Essa estratégia foi executada para verificar se a atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas foi um efeito causado pela formação da micorriza e seus reflexos na fisiologia da planta, absorção de Si e comunidade microbiana oxidante e redutora de Mn na rizosfera ou foi meramente um efeito de diluição pelo maior crescimento das plantas ou ainda o resultado da maior concentração de P nos tecidos. Dessa forma, foi adicionado um tratamento não micorrizado a mais, ao qual foi fornecida uma dose extra de P. Assim, esperava-se que a concentração de P e a produção de biomassa pelas plantas não micorrizadas que receberam a dose extra de P fossem semelhantes às das plantas micorrizadas, mas que receberam menos P. Como controle absoluto foi conduzido um tratamento sem micorrização, mas que recebeu a mesma dose de P dos tratamentos micorrizados.

## 7.2 Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos com delineamento experimental Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial (4x5) com cinco repetições, sendo os fatores e seus níveis: 4 tratamentos com FMA: controle sem FMA + 30 mg kg<sup>-1</sup> de P; controle sem FMA + 50 mg kg<sup>-1</sup> de P; *G. etunicatum* + 30 mg kg<sup>-1</sup> de P, *G. macrocarpum* + 30 mg kg<sup>-1</sup> de P; 5 doses de manganês: 0, 5, 10, 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn como MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, totalizando 100 parcelas cada um. A única diferença entre os dois experimentos foi que o primeiro foi colhido com 45 dias e o segundo com 90 dias. As épocas não foram analisadas estatisticamente como fatores.

Vasos plásticos, com capacidade para 4 kg de substrato, lavados com solução de Lysoform<sup>®</sup>, enxaguados em água de torneira e água destilada, receberam 4 kg da amostra de um solo classificado como NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico (Embrapa, 1999) ou Typic Quartzipsamment (Estados Unidos, 1975), de modo a constituir uma unidade experimental. A análise química do substrato após a autoclavagem a 121°C por 2h, para eliminar FMA nativos, revelou as seguintes características (Tabela 1):

Tabela 1. Características químicas do substrato após a autoclavagem

pH	M.O.	P	S-SO <sub>4</sub>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	T	V	m
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		mmolc dm <sup>-3</sup>								%
3,7	16	2	25	0,7	2	2	13	42	4,7	47	10	73
micronutrientes												
	B	Cu			Fe			Mn			Zn	
	-----				mg dm <sup>-3</sup>	-----						
	0,02	0,7			151			8,2			0,9	

A calagem do substrato foi feita após a autoclavagem, com base em uma curva de neutralização utilizando-se CaCO<sub>3</sub>, com doses de 0,01; 0,03; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15 g/0,2 L (0,267 kg), com três repetições (Tabela 2). Depois de homogeneizados, o conteúdo foi umedecido até a capacidade de campo e as leituras de pH obtidas após o quarto dia em solução centimolar de CaCl<sub>2</sub>, com leituras de 2 em 2 dias até a estabilização. A finalidade da curva de calibração foi evitar excessivo aumento

do pH e conseqüente indisponibilidade do Mn, de modo a permitir o cálculo de uma dose que resultasse em valores de pH entre 5,0 e 5,5.

Tabela 2. Valores de pH após calagem e incubação por 4, 6 e 10 dias

CaCO <sub>3</sub> g/200 mL	4 dias	6 dias	10 dias
0	4,0	4,0	4,1
0,01	4,1	4,1	4,2
0,03	4,2	4,2	4,3
0,05	4,4	4,3	4,4
0,08	4,7	4,6	4,6
0,10	4,9	4,7	4,8
0,12	5,1	4,9	5,0
0,15	5,3	5,1	5,1

Como o CaCO<sub>3</sub> apresenta alta reatividade, os valores de pH permaneceram estáveis a partir do quarto dia de leitura. A maior dose de CaCO<sub>3</sub> resultou em valores de pH em torno de 5,1, a qual foi usada para o cálculo de calagem dos vasos, resultando em 2,25 g CaCO<sub>3</sub>/vaso. Como 4 kg de solo no vaso ocupam um volume de 3 L, essa calagem foi equivalente a uma aplicação de 1493 kg/ha, considerando-se a camada de 0-20 cm.

Ao substrato dos tratamentos com FMA (*G. etunicatum* ou *G. macrocarpum*) e controle P1 foram adicionados 30 mg kg<sup>-1</sup> de P, equivalente a 0,667 g de superfosfato triplo moído (<0,25 mm) por vaso. O substrato do tratamento controle P2 recebeu 50 mg kg<sup>-1</sup> de P, equivalente a 1,111 g por vaso da mesma fonte. As doses para atingir os teores desejados foram calculadas de modo a se descontar o teor inicialmente disponível no solo, determinado pelo método da resina. O K foi fornecido na forma de KNO<sub>3</sub>, numa dose de 130 mg kg<sup>-1</sup> de K, sendo fornecido 1,341 g KNO<sub>3</sub>/vaso. Essa quantidade do fertilizante forneceu 186 mg de N/vaso. O restante do N foi complementado com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, com o objetivo de fornecer no início do desenvolvimento das plantas, 600 mg de N/vaso. O Ca foi fornecido pela calagem, tendo sido 300 mg dm<sup>-3</sup> pelo fornecimento de 2,25 g de CaCO<sub>3</sub>/vaso. O Mg foi fornecido na forma de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, com o objetivo de fornecer 150 mg dm<sup>-3</sup> de Mg, ou seja, 4,612 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/ vaso. Essa quantidade do fertilizante forneceu 600 mg dm<sup>-3</sup> de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, quantidade suficiente para suprir o S. Os micronutrientes foram fornecidos nas seguintes formas e quantidades, com base nos teores revelados pela análise química do substrato: B (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 1,74 mg/vaso; Cu (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) 0,3 mg Cu/vaso; (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) 0,9 mg Zn/vaso. Para a distribuição dos nutrientes, exceto P e Ca, todos foram fornecidos na forma de solução. Não foi feita inoculação com *Bradyrhizobium*. Aos 45 dias, as plantas que foram colhidas com 90 dias receberam, em cobertura, 50% da adubação com N e K anterior, na forma de solução.

A infestação do substrato nos tratamentos com os FMA foi feita com uma suspensão de esporos, os quais foram obtidos por peneiramento úmido e centrifugação em solução de sacarose (Gerdemann & Nicholson, 1963). Esporos de *G. macrocarpum* foram extraídos de substrato de tratamentos conduzidos com esta espécie em experimentos prévios, tomando-se o cuidado de se confirmar a pureza do inóculo. *G. etunicatum* foi extraído de vasos de multiplicação em braquiária. A suspensão de esporos foi ajustada para se obter 400 esporos em 40 mL, adicionados aos respectivos tratamentos. Logo após a adição, a superfície do vaso foi revolvida para o recebimento das plântulas de soja, o que permitiu a incorporação superficial dos esporos.

O plantio foi realizado em 08/06/00 com plântulas pré-germinadas por três dias em areia lavada e autoclavada. As sementes foram superficialmente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio comercial a 25% por 5 minutos, seguidamente enxaguadas em água destilada e postas a germinar em areia úmida, a 28°C. Cada vaso recebeu cinco plântulas viçosas, que após duas semanas foram desbastadas para duas plantas por vaso.

A reinfestação do substrato com microrganismos do solo, exceto FMA, foi feita 7 dias após o plantio. Todos os tratamentos receberam 20 mL de uma suspensão do solo original não autoclavado, numa tentativa de restabelecer a comunidade microbiana original, exceto FMA. Cerca de 3 kg de uma amostra do solo original foi suspensa em 5 L de água de torneira sob vigorosa agitação e passada por uma série de peneiras, sendo a menor de 44 µm de malha. Amostras da suspensão foram verificadas sob microscópio estereoscópio e não foram constatados esporos de FMA. Em 21/08/00

foi notada a presença de ácaro branco em algumas plantas, ocasião em que foi feita uma pulverização com o acaricida Vertimec® (1 mL L<sup>-1</sup>), visando seu controle.

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e as plantas receberam irrigações com água destilada, conforme as necessidades. A iluminação natural foi complementada de manhã e à tarde com lâmpadas incandescentes, para aumento do fotoperíodo, das 5:30 às 8:00 e das 17:00 às 20:00 h. O controle da temperatura mínima foi feito por meio de aquecedores ligados a termostatos que acionam o sistema de aquecimento quando a temperatura atinge 18°C. Já o controle de temperatura máxima foi feito por meio de exaustores, acionados da mesma maneira, quando a temperatura interna da casa-de-vegetação atinge 32°C.

Após a colheita das plantas em cada período, avaliaram-se a massa de material seco produzida pela parte aérea e raízes, a colonização radicular (Giovannetti & Mosse, 1980), os teores de P (colorimetria), Ca, Fe, Mn (espectrofotometria de absorção atômica) e Si (Bataglia et al., 1978) na parte aérea e raízes. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn na região rizosférica (substrato aderido à raiz) foi estimado pela diluição inicial de 10 g de raízes com solo aderido, em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%), agitados em agitador horizontal por 20 minutos a 120 rpm, a partir da qual fizeram-se diluições em série, tomando-se 1 mL dessa suspensão para 9 mL da mesma solução, até a diluição de  $1 \times 10^{-4}$ , da qual pipetaram-se 50 µL para cada placa de Petri, de modo que a diluição final considerada na placa foi de  $5 \times 10^{-6}$ , em cinco réplicas, submetidas à incubação a 28°C. Foram avaliados apenas o substrato dos tratamentos com as doses 0, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup> de Mn para a avaliação aos 45 dias, uma vez que na maior dose as plantas não produziram biomassa radicular suficiente. Já aos 90 dias, foram avaliados o substrato dos tratamentos 0, 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn. As bactérias redutoras de Mn foram avaliadas após cinco dias do plaqueamento, contando-se nas placas de Petri as colônias que formaram halo claro no meio de cultura contendo Mn oxidado (Marschner et al., 1991). As oxidantes de Mn foram avaliadas após 14 dias do plaqueamento, contando-se as colônias que formaram deposição de Mn oxidado, de coloração marrom escura, no meio de cultura contendo Mn reduzido (Huber & Graham, 1992), modificado pela adição de

apenas  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e não  $5 \text{ g L}^{-1}$  como indicado pelos autores. A colonização radicular foi avaliada pelo método da placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980) após coloração com azul de tripano (Phillips & Hayman, 1970), enquanto que o micélio externo total (MET) foi avaliado segundo Melloni & Cardoso (1999), com as alterações descritas no capítulo 4. Para a determinação de Mn e Fe disponíveis no substrato, foi feita a extração com a solução Mehlich I [ $\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , 25:2,5 (v/v)], agitados por 15 minutos e filtrados em papel de filtro quantitativo faixa azul], fazendo-se leitura do extrato em espectrofotômetro de absorção atômica. O pH foi determinado em  $\text{CaCl}_2 \text{ } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  na proporção 25:10 (v/v), após agitação por 5 minutos e repouso por 30 minutos.

A análise estatística dos dados foi feita com auxílio do programa SAS<sup>®</sup> (SAS, 1991), através do procedimento GLM para análise da variância e aplicação do teste *t* de Student a  $P < 0,05$  para os fatores qualitativos “micorrização”, desdobrando-se sua interação com o fator “doses de Mn”, quando significativa. Quando a interação não foi significativa, somente foram apresentadas as médias dos tratamentos com FMA.

### 7.3 Resultados

Os primeiros sintomas de toxidez de Mn nas plantas dos tratamentos 20 e  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mn foram notados com dez dias após o plantio, no par de folhas cotiledonares, que se apresentou engrouinhado e com pontos necróticos de coloração marrom no limbo foliar e nervuras. Aos 45 dias, a severidade da toxidez de Mn aumentou com as doses adicionadas, principalmente nas plantas micorrizadas, que apresentaram menor crescimento (Figura 1). Nessa época, as plantas do tratamento controle P2 se destacaram em relação às demais, com maior produção de matéria seca, principalmente pela parte aérea. Na maioria dos casos, as plantas micorrizadas apresentaram crescimento igual ou inferior ao das plantas do tratamento controle P1. Aos 90 dias, as plantas micorrizadas alcançaram as plantas do tratamento controle P2 em termos de produção de biomassa pela parte aérea, ao passo que no tratamento controle

P1 a produção de biomassa pelas plantas foi menor em todas as doses de Mn. A produção de biomassa seca de raízes foi menos influenciada pelos tratamentos, mas, de modo geral, de forma semelhante ao que ocorreu para a parte aérea. Quanto à atenuação dos sintomas de toxidez de Mn, observou-se que, aos 90 dias nas plantas do controle P1, os sintomas se manifestaram a partir da dose 10 mg kg<sup>-1</sup>; nas do controle P2, a partir de 20 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que nas micorrizadas somente ocorreram sintomas na dose 40 mg kg<sup>-1</sup>, porém com menor severidade (Figura 2). A foto em detalhe mostra os sintomas da toxidez de Mn no limbo foliar.

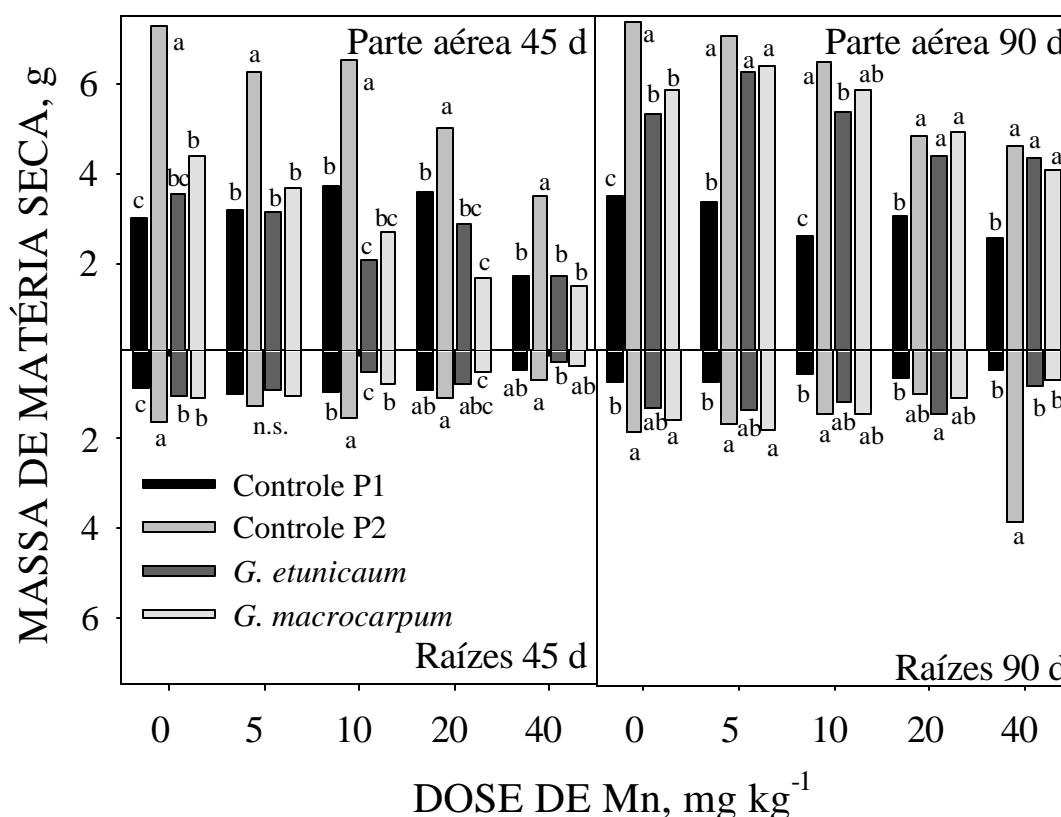


Figura 1 - Produção de massa de matéria seca de parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 e 90 dias, micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ .



Figura 2 - À esquerda, aspecto da manifestação dos sintomas de toxidez de Mn em plantas de soja aos 90 dias, de acordo com os tratamentos de micorrização e de doses de Mn adicionadas ao substrato. Abaixo, aspecto da face adaxial (superior) e abaxial (inferior) de trifólios de soja saudáveis (da esquerda) e lesionados com sintomas de toxidez de Mn (da direita).



A colonização radicular das plantas aos 45 dias nos tratamentos micorrizados foi influenciada somente pelas doses de Mn, sendo que os valores diminuíram com o aumento das doses de Mn (Figura 3). Os valores máximos obtidos foram próximos a 30% nas doses 0 e 5 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que nos tratamentos com 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> os valores não chegaram a 10%. Não houve diferença significativa na taxa de colonização quanto à espécie do FMA, no que se referiu ao aumento da disponibilidade de Mn no substrato. No período seguinte (90 dias), os níveis de colonização atingiram cerca de 40%, sem que houvesse efeito significativo dos tratamentos com FMA ou mesmo das doses de Mn.

O comprimento de micélio externo total (Figura 4) estimado no substrato das plantas colhidas aos 45 dias apresentou maiores valores naqueles dos tratamentos micorrizados, com tendência de diminuição com o aumento das doses de Mn evidente apenas no tratamento com *G. etunicatum*. Aos 90 dias, os valores encontrados no substrato do tratamento controle permaneceram praticamente os mesmos daqueles encontrados na época anterior nos tratamentos correspondentes, porém houve aumento nos tratamentos micorrizados. Nessa época não houve evidência de efeito negativo das doses de Mn sobre essa variável, a qual foi superior a 30 m g<sup>-1</sup> no substrato do tratamento com *G. etunicatum*.

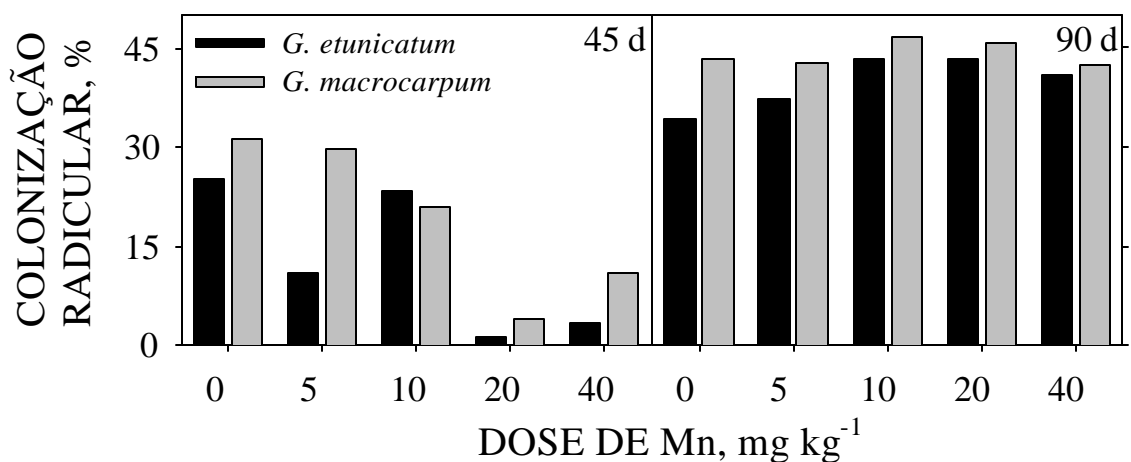


Figura 3 - Percentagem de colonização radicular de plantas de soja por *G. etunicatum* e *G. macrocarpum*, de acordo com doses crescentes de Mn, aos 45 e 90 dias.

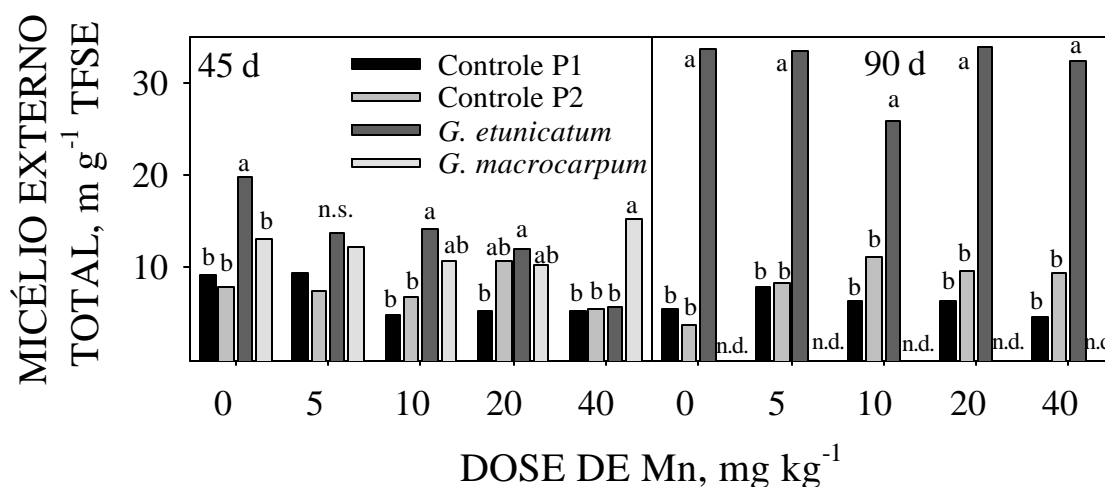


Figura 4 - Estimativa do comprimento de micélio externo total (MET) obtido no substrato em que foram cultivadas plantas de soja micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ . n.s. = não significativo; n.d. = não determinado.

As concentrações de P na parte aérea pouco variaram aos 45 d, tendo sido em geral mais altas nas plantas do tratamento com *G. macrocarpum*, nas doses 0, 5 e 40 mg kg⁻¹ de Mn (Figura 5). Nas raízes, as concentrações foram mais baixas nas plantas do controle P1, com diferenças mais expressivas nas doses 0 e 5 mg kg⁻¹ de Mn. Com o aumento das doses de Mn, as diferenças entre os tratamentos foram menos

evidentes. Aos 90 dias, nas plantas do controle P2, a concentração de P na parte aérea foi menor em relação aos demais tratamentos até a dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, que por sua vez não diferiram entre si. Nas doses de 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, as concentrações de P foram maiores nas plantas micorrizadas, comparando-se aos dois controles não micorrizados, que também não diferiram entre si. Nas raízes houve maiores variações entre os tratamentos, mas em geral tenderam a ser maiores nas plantas micorrizadas, principalmente nos tratamentos com *G. macrocarpum*, à medida que as doses de Mn aumentaram. Ainda aos 90 dias, com exceção do tratamento controle P1, ficou bastante evidente o efeito do aumento das doses de Mn sobre o aumento da concentração de P (equações não apresentadas), possível resultado do menor desenvolvimento das plantas, que causou maior concentração do P nos seus tecidos. Tanto aos 45, quanto aos 90 dias, sempre houve maior concentração de P na parte aérea em relação às raízes, sendo que ambas diminuíram de 45 para 90 d.

Os resultados dos teores de Fe aos 45 dias não apresentaram interação entre os fatores micorrização e doses de Mn, não havendo qualquer efeito sobre os teores na parte aérea (Figura 6), com valores médios próximos a 80 mg kg<sup>-1</sup>. Quanto aos teores nas raízes, houve efeito dos tratamentos de micorrização, sendo que as plantas micorrizadas apresentaram maiores teores que as não micorrizadas, principalmente quando comparados aos das plantas do tratamento controle P1. Enquanto estas apresentaram teor médio de 638 mg kg<sup>-1</sup>, as do tratamento com *G. etunicatum* apresentaram teor médio de 1336 mg kg<sup>-1</sup>, o qual também foi superior ao encontrado no tratamento controle P2. Aos 90 dias também não houve interação entre os tratamentos para os teores de Fe avaliados na parte aérea, mas apenas nas raízes. A concentração de Fe na parte aérea foi maior nas plantas dos tratamentos controle P1 e P2, sendo o maior valor encontrado no tratamento controle P2, 156 mg kg<sup>-1</sup>. Os teores encontrados nas plantas micorrizadas não diferiram entre si e foram significativamente inferiores aos dos dois controles. Para as raízes, os teores variaram entre os tratamentos e não permitiram observar uma tendência geral do efeito da micorrização em cada dose de Mn.

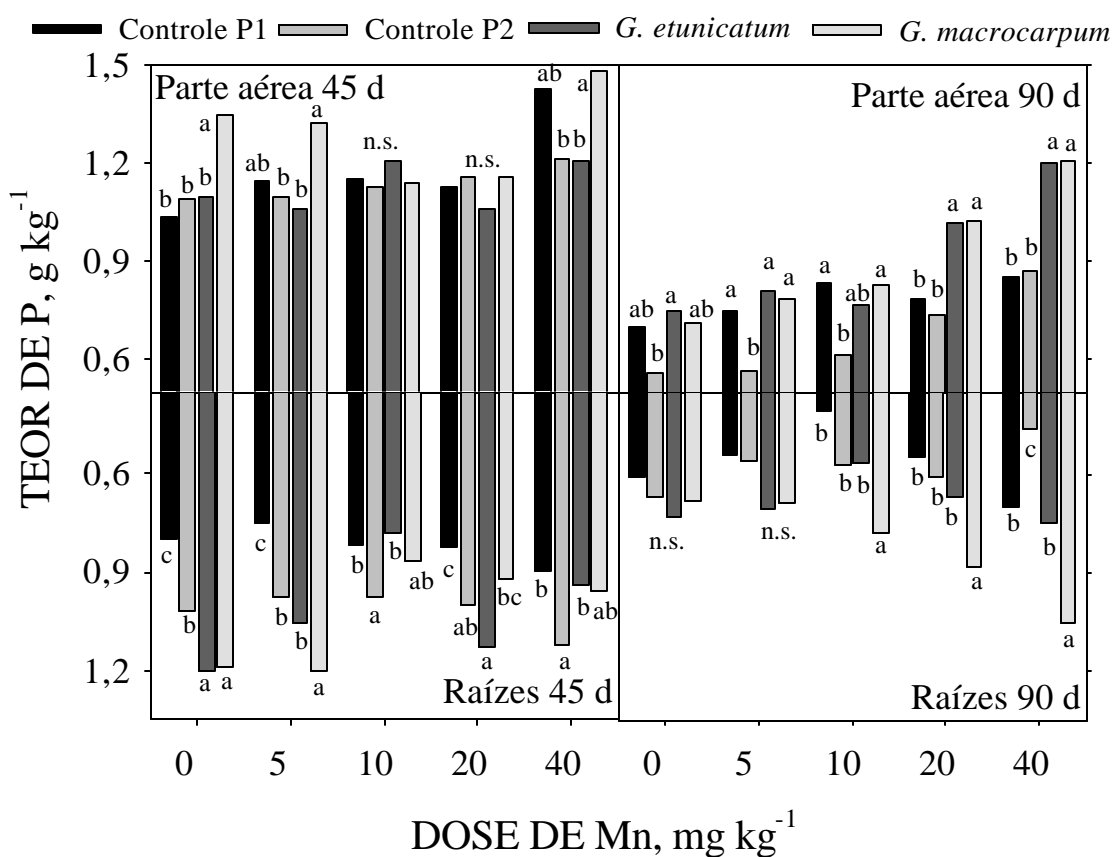


Figura 5 - Concentração de P na parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 e 90 dias, micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

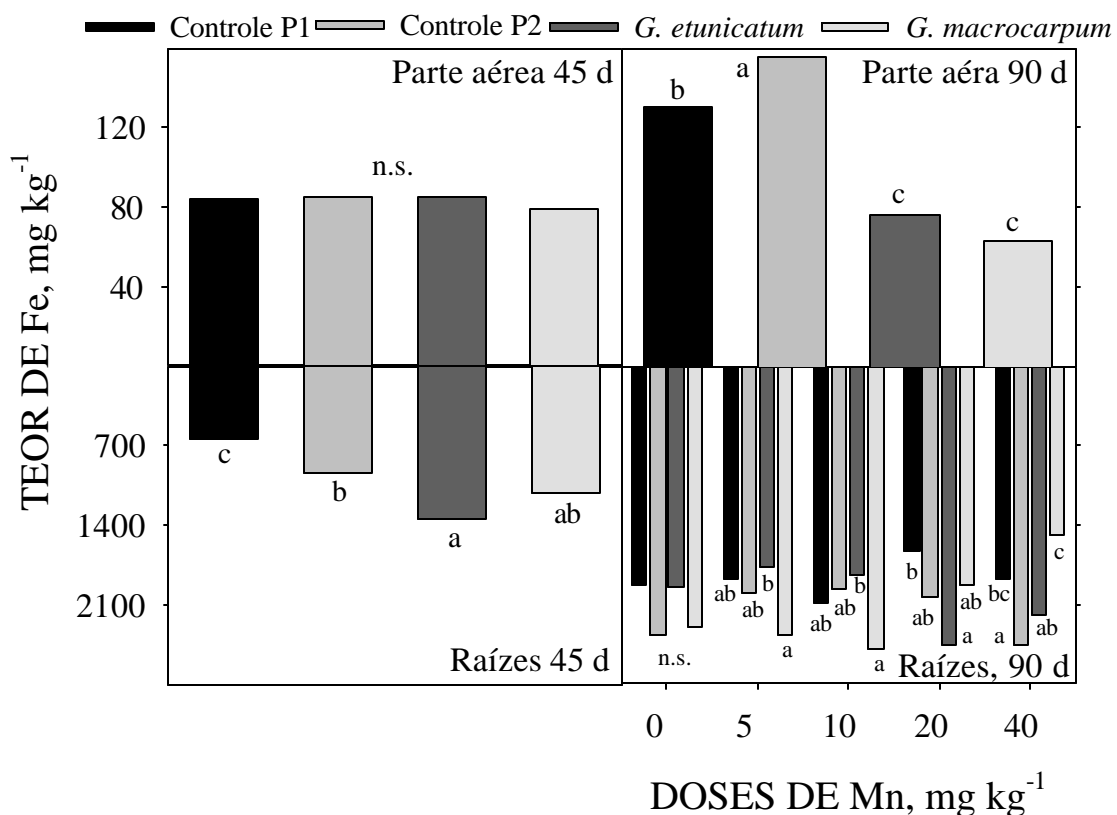


Figura 6 - Concentração de Fe na parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 e 90 dias, micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn, no caso da interação significativa entre os fatores. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, ou entre tratamentos de micorrização na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

A adição de Mn ao substrato resultou em aumentos de Mn na parte aérea e raízes das plantas nas duas épocas de avaliação. Como esse comportamento é previsível, os resultados dos ajustes de regressão não foram apresentados. Aos 45 dias, a interação entre micorrização e doses de Mn foi significativa para os resultados da parte aérea e raízes, mas os efeitos dos tratamentos de micorrização foram pouco evidentes (Figura 7), principalmente na parte aérea, tendo sido significativo apenas na maior dose de Mn, cujos resultados tiveram comportamento semelhante aos encontrados nas raízes, pelo menos para os tratamentos micorrizados. Aos 90 dias não houve interação entre os dois fatores. Nesse caso, as plantas dos tratamentos com FMA, na média das doses de

Mn, apresentaram menor concentração de Mn nos tecidos, tanto da parte aérea, quanto das raízes, em relação às dos tratamentos controle P1 e P2. Na parte aérea, a diferença de concentração entre os tratamentos controle P1 e *G. macrocarpum* foi de 109 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que nas raízes a diferença entre os mesmos tratamentos foi de 85 mg kg<sup>-1</sup>. Embora na parte aérea os teores encontrados nas plantas dos dois tratamentos não micorrizados não diferissem entre si, nas raízes os maiores valores foram encontrados no tratamento controle P1.

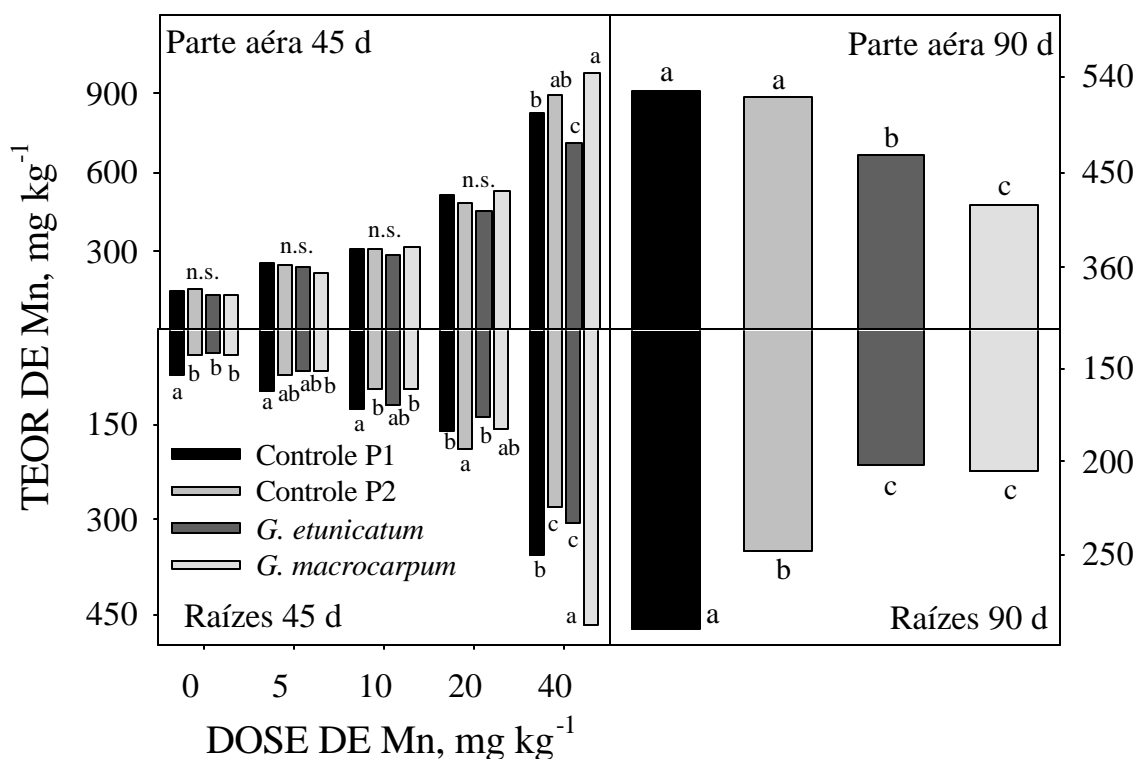


Figura 7 - Concentração de Mn na parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 e 90 dias, micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn, no caso da interação significativa entre os fatores. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, ou entre tratamentos de micorrização na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

Os teores de Si nos tecidos (Figura 8) não foram influenciados pelas doses de Mn, mas apenas pelos tratamentos referentes à micorrização. Aos 45 dias, na

parte aérea, os teores tenderam a ser maiores nas plantas dos tratamentos controle P1 e P2, em relação às plantas micorrizadas. Para o teor de Si nas raízes, não foi possível fazer análise estatística devido à quantidade insuficiente de material para realizar as análises, havendo apenas uma repetição por tratamento. Entretanto, os teores foram maiores em relação à parte aérea. Aos 90 dias, as maiores concentrações predominaram nas plantas do tratamento controle P1, tanto na parte aérea, quanto nas raízes.

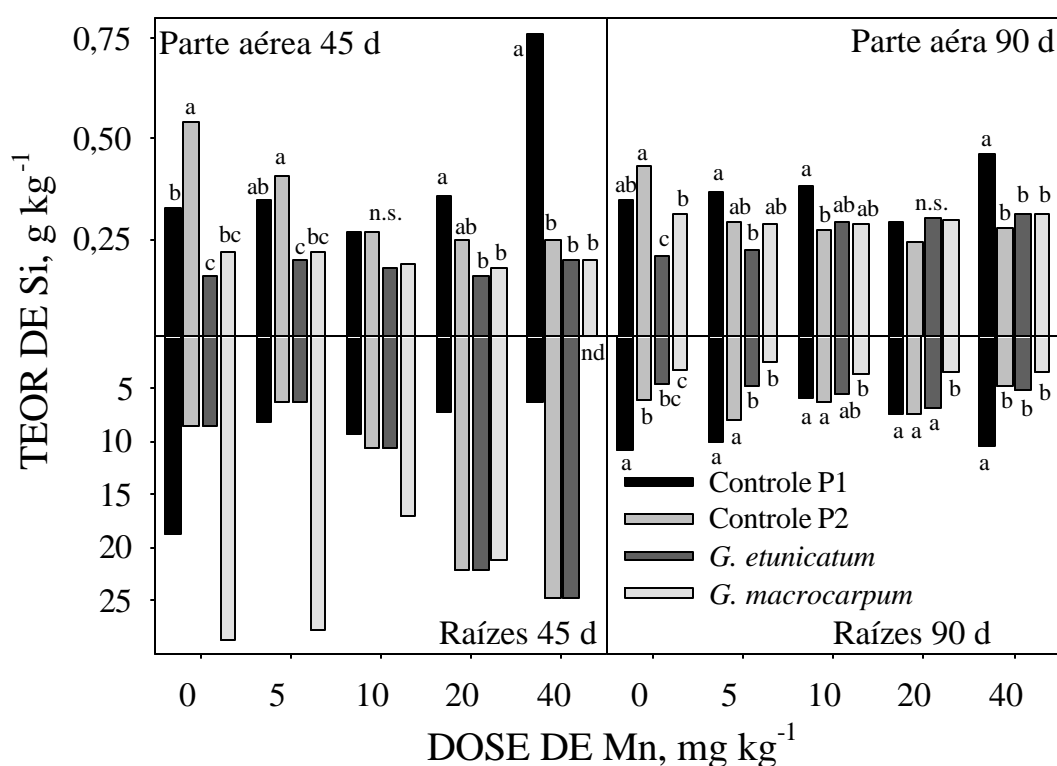


Figura 8 - Concentração de Si na parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 e 90 dias, micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

A estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn no substrato não foi influenciada pelos tratamentos aos 45 dias. Já aos 90 dias, houve efeito de tratamentos sobre a estimativa dos oxidantes e redutores, com interação significativa entre os fatores a  $P > F 0,068$  para

oxidantes (Figura 9). Nesse caso, observou-se no solo rizosférico do tratamento controle P1 menor número de UFC de oxidantes de Mn nas doses 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, não havendo efeito dos tratamentos de micorrização quando não se adicionou Mn ao substrato. No solo rizosférico do tratamento controle P2, os resultados não diferiram dos encontrados no solo rizosférico das plantas micorrizadas. O número de UFC de bactérias redutoras de Mn foi, em geral, dez vezes inferior ao de bactérias oxidantes. Nesse caso somente houve efeito dos tratamentos de micorrização na dose de 20 mg kg<sup>-1</sup> de Mn, quando o solo rizosférico do tratamento controle P2 apresentou número de UFC significativamente mais elevado.

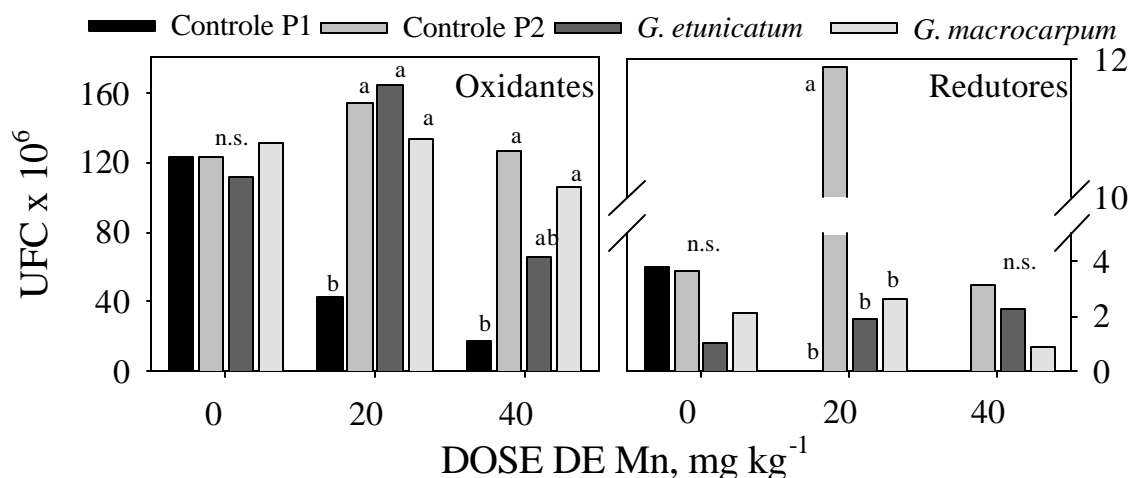


Figura 9 - Estimativa do número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC (x 10<sup>6</sup>) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn por g de substrato em que foram cultivadas plantas de soja micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn, aos 90 dias. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

Os valores de pH no substrato foram influenciados pelos tratamentos de micorrização, em interação com as doses de Mn, nas duas épocas avaliadas (Figura 10). Aos 45 dias, o pH nos substratos dos tratamentos micorrizados, na maioria das vezes, foi ligeiramente maior que os encontrados nos do tratamento controle P2, enquanto os demais tratamentos pouco diferiram entre si. Aos 90 dias houve uma diminuição de pH

em todos os tratamentos em relação à época anterior. Entretanto, em todas as doses de Mn os valores de pH foram maiores no substrato do tratamento controle P1. De modo contrário, no substrato do tratamento controle P2 foram obtidos valores inferiores aos dos tratamentos micorrizados, porém essa diferença diminuiu com o aumento das doses de Mn, chegando à não significância na dose de 40 mg kg<sup>-1</sup>.

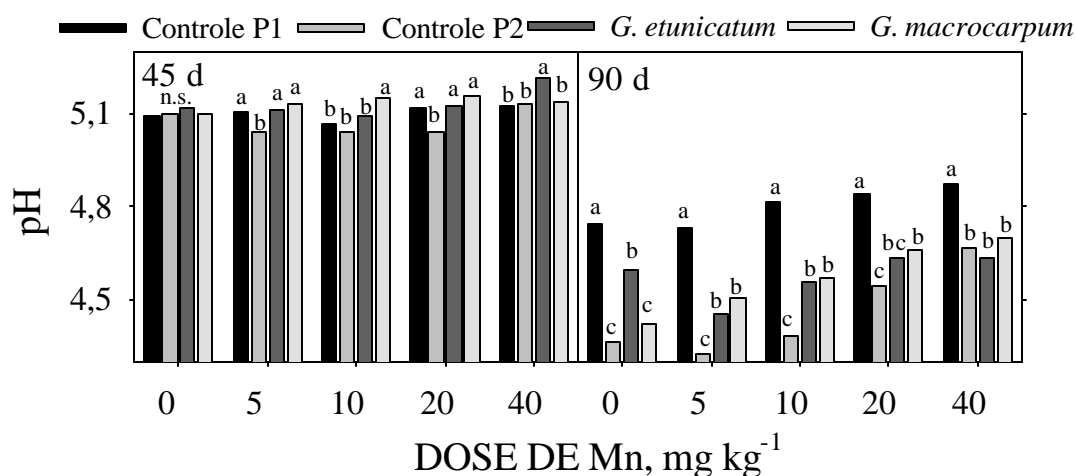


Figura 10 - Valores de pH no substrato em que foram cultivadas plantas de soja micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

A disponibilidade de Fe no substrato foi influenciada pela interação entre os tratamentos tanto aos 45 quanto aos 90 dias (Figura 11). Aos 45 dias, a disponibilidade de Fe foi menor no substrato dos tratamentos controle, em relação aos micorrizados. Por sua vez, no substrato do tratamento controle P1, foram encontrados os menores valores de Fe disponível, significativamente inferiores aos encontrados nos do tratamento controle P2, em todas as doses de Mn. Entre os tratamentos micorrizados, na maioria das vezes, a maior disponibilidade ocorreu no substrato do tratamento com *G. macrocarpum*. Aos 90 dias esse comportamento foi invertido, sendo que a disponibilidade de Fe no substrato dos tratamentos controle P1 e P2 foi maior que as encontradas nos substratos dos tratamentos com os dois fungos micorrízicos. Na

maioria dos casos, não houve diferenças significativas entre os valores obtidos nos substratos com os dois controles ou com os dois FMA.

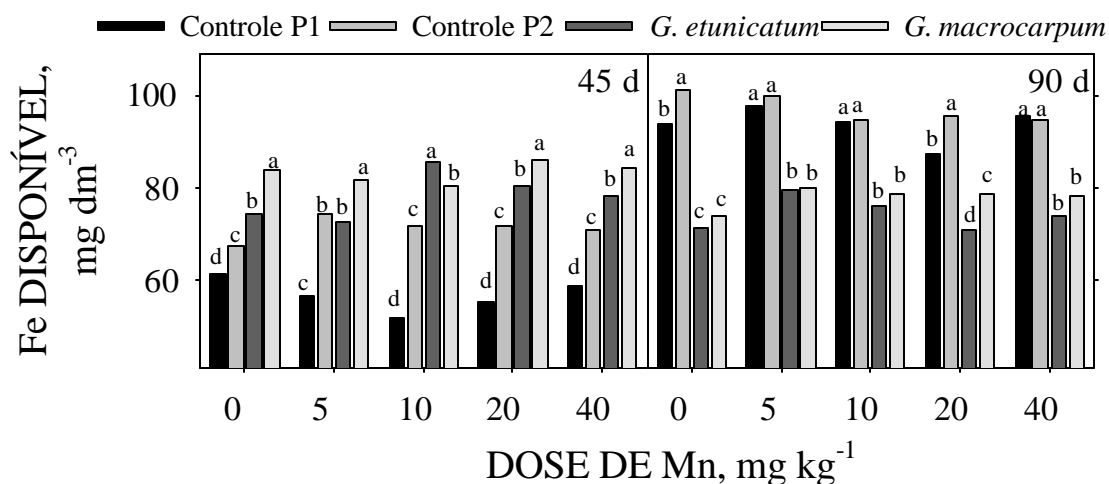


Figura 11 - Fe disponível no substrato em que foram cultivadas plantas de soja micorrizadas com *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

O Mn disponível no substrato, como esperado, aumentou com as doses de Mn adicionado (Figura 12). Aos 45 dias, essa variável foi pouco influenciada pelos tratamentos de micorrização, existindo efeito significativo apenas da maior dose de Mn. Aos 90 dias, embora com diferenças sutis, na maioria das vezes o tratamento controle P2 resultou em menor disponibilidade de Mn no substrato, comparado ao obtido no substrato do tratamento controle P1. A disponibilidade de Mn nos tratamentos com FMA foi intermediária entre os dois tratamentos não micorrizados.

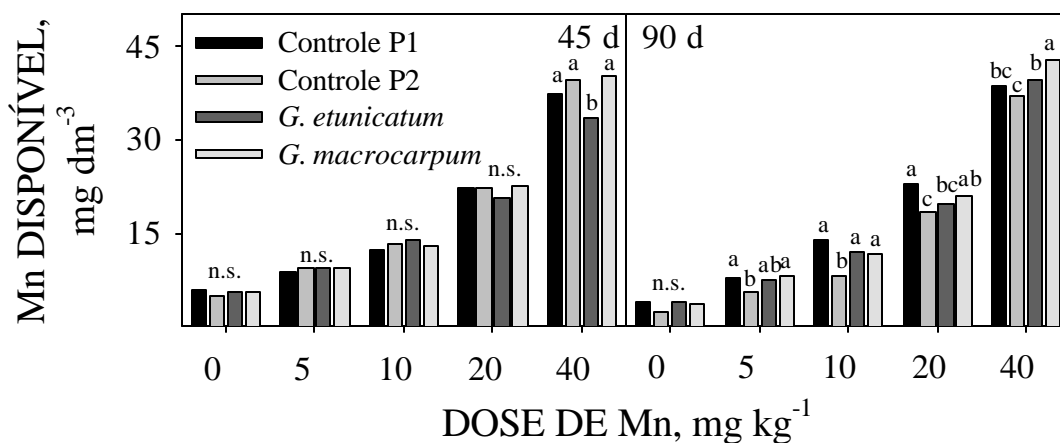


Figura 12 - Mn disponível no substrato em que foram cultivadas plantas de soja colonizadas por *G. etunicatum* ou *G. macrocarpum* e não colonizadas (controle P1 e controle P2), de acordo com doses crescentes de Mn. Letras iguais, comparadas entre tratamentos de micorrização, na mesma dose de Mn, não diferem entre si a  $P < 0,05$  pelo teste *t*. n.s. = não significativo.

As análises de microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X não permitiram distinguir possíveis pontos de deposição de Mn e P nos tecidos das raízes e estabelecer uma relação entre eles (Figura 13). Pontos mais claros na amostra são tidos como de maior densidade eletrônica. Sendo assim, esses pontos foram submetidos à análise com a microssonda, visando revelar a sua composição relativa. Os pontos 1 e 2 na amostra referem-se às áreas com maior densidade eletrônica onde são encontrados elementos mais densos, como os metais. Os pontos 3 e 4 foram amostrados para comparação com os anteriores. Não houve diferença dos resultados das microanálises com relação aos valores encontrados para Fe, Mn, Al e Si. Os elementos de interesse, como o Mn e o P, apresentaram composição relativa semelhantes em todos os pontos analisados, não permitindo concluir sobre reações entre P e Mn no interior da planta.

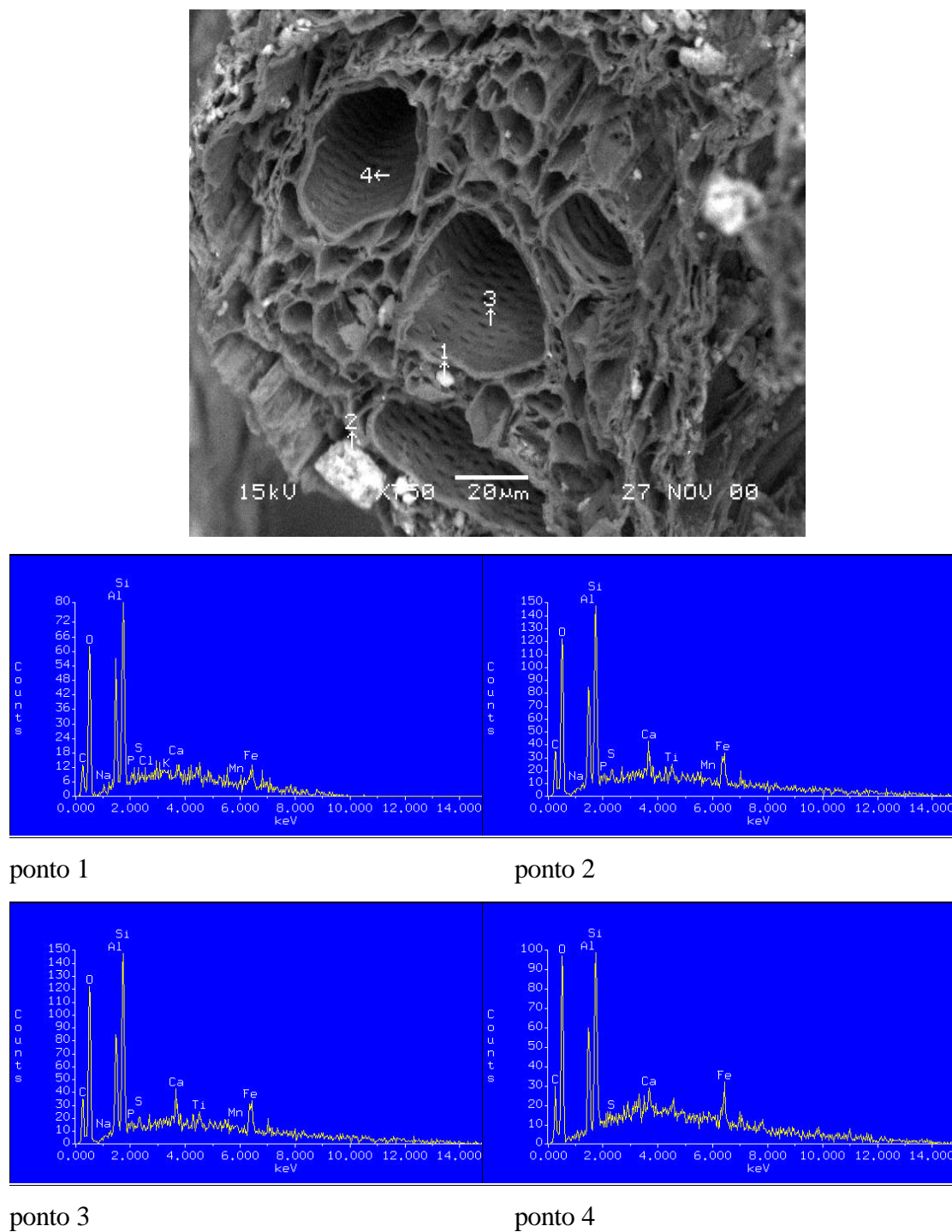


Figura 13 - Aspecto da micrografia eletrônica de varredura (acima) e resultados da microanálise de raios-X (gráficos abaixo) de locais com diferentes densidades eletrônicas (dos pontos 1 a 4) em um corte de raiz de soja colonizada por *G. etunicatum*, cultivada em substrato que recebeu  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mn.

#### 7.4 Discussão

A avaliação das plantas em duas épocas reforçou a importância de que esse procedimento seja feito em fases distintas do desenvolvimento da simbiose. Se fosse considerada apenas a avaliação aos 45 dias, concluir-se-ia que a micorrização das plantas apenas agrava os sintomas da toxidez de Mn, com redução do seu crescimento (Figura 1). Nessa época, as plantas do tratamento controle P2 tinham à sua disposição maior quantidade de P, enquanto as micorrizadas ainda estavam em fase de estabelecimento da simbiose. Sabe-se que, nesta fase, o simbionte demanda grande quantidade de energia do seu hospedeiro, funcionando como um dreno de C (Bethlenfalvay et al., 1982a), o que pode, em alguns casos, resultar em depressão transiente de crescimento, quando comparado às plantas não micorrizadas (Nogueira & Cardoso, 2000). Observou-se que, nesse caso, em algumas situações, as plantas micorrizadas apresentaram crescimento inferior ao das plantas do tratamento controle P1, evidenciando essa depressão transiente de crescimento durante a fase de estabelecimento da simbiose. Na avaliação aos 90 dias, de modo contrário, as plantas micorrizadas recuperaram o crescimento, que em geral foi semelhante ao das plantas do controle P2. Isso se deu porque, após o estabelecimento da simbiose, as plantas micorrizadas passaram a se beneficiar da interação, o que resultou em crescimento semelhante ao das plantas não micorrizadas que receberam uma dose extra de P solúvel no substrato. As plantas do controle P1 se desenvolveram menos que as demais. Com esses resultados, houve condições de se comparar plantas micorrizadas com não micorrizadas de desenvolvimento semelhante e não plantas bem nutridas e melhor desenvolvidas, caso das micorrizadas, versus plantas menos desenvolvidas, como no caso daquelas do controle P1. É fato conhecido que plantas micorrizadas são fisiologicamente distintas daquelas não micorrizadas (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988), o que é ainda mais agravado pelas diferenças do estado nutricional de cada uma, o que reflete na sua fisiologia e crescimento. Com esses resultados, foi possível avaliar se o efeito da micorrização sobre a manifestação dos sintomas de toxidez de Mn foi um fato intrínseco à presença do FMA ou se foi apenas um efeito da maior absorção de P

pelas plantas micorrizadas, causando maior desenvolvimento das plantas melhor nutridas. Plantas micorrizadas, apresentando maior crescimento, poderiam apresentar atenuação da toxidez de Mn pelo simples efeito diluição do nutriente nos seus tecidos. É importante salientar que as plantas do tratamento controle P1 apresentaram sintomas de toxidez de Mn a partir da dose 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mn; as do controle P2 apresentaram sintomas a partir da dose 20 mg kg<sup>-1</sup>, apesar da produção de biomassa semelhante à das plantas micorrizadas; enquanto que as micorrizadas somente apresentaram sintomas de toxidez de Mn na dose 40 mg kg<sup>-1</sup>, ainda assim, menos intensos (Figura 2).

A colonização radicular aos 45 dias diminuiu com o aumento das doses de Mn (Figura 3). Fato semelhante foi observado por Lambais & Cardoso (1988) para a espécie *G. macrocarpum*. Esses autores observaram que a calagem e conseqüente diminuição do Fe e Mn disponíveis no substrato propiciou maior germinação dos esporos do FMA, o que resultou, até certo limite, em maior colonização radicular. Quando se fez a estimativa do comprimento do micélio externo no substrato em que as plantas foram cultivadas (Figura 4), efeito semelhante foi observado no tratamento com *G. etunicatum*, em que o aumento das doses de Mn também resultou em diminuição dessa variável. Por serem variáveis intimamente correlacionadas (Nogueira et al., 1998), influências sobre uma também influenciará a outra. Altas taxas de colonização radicular tendem a resultar em maior quantidade de micélio externo e vice-versa, visto que o micélio externo é uma importante forma de nova colonização das raízes. Apesar da restrição à colonização e à produção de micélio externo aos 45 dias pelo aumento das doses de Mn, esse efeito não mais foi constatado aos 90 dias, indicando que, apesar da restrição inicial nas maiores doses, os fungos conseguiram se adaptar às condições inicialmente restritivas. É possível que o efeito primário do Mn sobre o FMA seja com relação à inibição da germinação dos esporos, o que pode atrasar o processo de formação de micorriza (Koomen et al., 1990).

O aumento da severidade dos sintomas de toxidez de Mn observado nas plantas micorrizadas aos 45 dias pode ter sido decorrente da maior lentidão no estabelecimento da simbiose nas maiores doses de Mn, o que, além de constituir dreno de C às plantas numa condição adversa, retardou a contribuição da simbiose às mesmas.

Na avaliação seguinte, com 90 dias, a taxa de colonização radicular não sofreu influência das doses de Mn, o que refletiu em desenvolvimento semelhante entre as plantas micorrizadas e as do tratamento controle P2 (Figura 2). Nas duas avaliações, tanto as plantas micorrizadas quanto as não micorrizadas sofreram influência negativa das doses de Mn, com redução de seu crescimento. Entretanto, esses efeitos foram menos evidentes nas plantas do tratamento controle P1.

As concentrações de P, Ca, Mn, Fe e Si variaram nos tecidos das plantas, em função dos tratamentos. No caso do P (Figura 5), aos 45 dias, mesmo as plantas do tratamento controle P2, que receberam as maiores doses de P, apresentaram na parte aérea concentrações semelhantes às das plantas do controle P1, sendo que, em apenas algumas doses de Mn as plantas do tratamento com *G. macrocarpum* apresentaram maior concentração. Nas raízes, as plantas micorrizadas apresentaram maior concentração de P nas doses 0 e 5 mg kg<sup>-1</sup> de Mn em relação aos controles, comportamento que tendeu à inversão na medida em que se aumentaram as doses de Mn. Isso possivelmente ocorreu em consequência do efeito negativo do aumento da disponibilidade de Mn sobre a colonização radicular e produção de micélio externo e, conseqüentemente, sobre a contribuição micorrízica na absorção de P. Aos 90 dias, a diminuição da concentração de P nos tecidos, em relação à época anterior, foi possível consequência do efeito diluição devido ao aumento da biomassa das plantas. É interessante notar que, na parte aérea, as plantas do tratamento controle P2 apresentaram menores concentrações de P em relação aos demais tratamentos, mesmo em relação às do tratamento controle P1. Com relação às plantas do controle P1 fica claro que a diferença de concentração para as do controle P2 foi consequência do seu menor crescimento, o que propiciou maior concentração de P nos tecidos analisados. Entretanto, em relação às micorrizadas, não foi essa a causa, visto que as plantas apresentaram biomassas semelhantes, evidenciando a contribuição micorrízica. Isso demonstra que a disponibilidade de P no tratamento controle P2 não foi limitante ao crescimento das plantas e que a micorrização foi equivalente aos 20 mg kg<sup>-1</sup> de P fornecidos a mais no tratamento controle P2. Nesse caso, além de ter sido suficiente para produzir biomassa semelhante, a micorrização ainda propiciou maior concentração de P

nos tecidos do que as observadas nas plantas do tratamento controle P2. É possível que a atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas aos 90 dias nas doses 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> tenha alguma relação com a sua maior concentração de P, enquanto que o fato das plantas do tratamento controle P2 não apresentarem sintomas de toxidez na dose 10 mg kg<sup>-1</sup> como as do tratamento controle P1, pode ter sido um efeito de diluição. No entanto, quando a disponibilidade de Mn foi aumentada (doses 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup>) as plantas do tratamento controle P2 apresentaram sintomas de toxidez, mesmo com crescimento semelhante ao das plantas micorrizadas.

Para o Ca, os resultados foram variáveis e parecem ter sofrido mais os efeitos de diluição em função dos tratamentos (dados não apresentados). Era de se esperar que o aumento da disponibilidade de Mn diminuísse a absorção de Ca por inibição competitiva, visto que ambos são cátions divalentes que competem pelos mesmos sítios de absorção (Marschner, 1995). Sabe-se que um dos fatores responsáveis pela expressão dos sintomas de toxidez de Mn é a deficiência de Ca, a qual está relacionada com a limitação da expansão do limbo foliar (Foy, 1978, 1984). Entretanto, neste trabalho essa relação não foi constatada. De forma semelhante ao que ocorreu com o Ca, os resultados da concentração de Si na parte aérea e raízes das plantas, também não foram conclusivos (Figura 8), parecendo também ter prevalecido os efeitos de diluição. Dessa forma, a hipótese de que o aumento da absorção de Si pelas plantas micorrizadas poderia ter participação na atenuação dos sintomas de toxidez de Mn não pôde ser comprovada. De modo contrário, Nogueira et al. (2000) observaram que plantas micorrizadas apresentaram significativo acúmulo de Si nas raízes, o que coincidiu com atenuação dos sintomas de toxidez de Mn. Esse comportamento pode estar relacionado ao modo como o experimento foi conduzido. Vale lembrar que essas plantas não receberam inoculação com *Bradyrhizobium* e foram conduzidas num período de inverno. Grothge-Lima (1998) observou que, além de diferenças genótípicas, plantas de soja absorveram e translocaram mais Si para a parte aérea na presença de nodulação por *Bradyrhizobium*. Outro fator importante é que o transporte de Si está relacionado com o fluxo de água através da planta pela transpiração (Epstein, 1994), a qual é menor no inverno devido às menores temperaturas. O Si parece ser um elemento de baixa

translocação das raízes para a parte aérea, pelo menos em soja, o que pôde ser constatado pela diferença de sua concentração entre parte aérea e raízes, nas duas épocas, o contrário do que afirmaram Miyake & Takahashi (1985), para os quais o Si em soja é prontamente translocado das raízes para a parte aérea.

O efeito dos tratamentos de micorrização sobre os teores de Mn na parte aérea e raízes das plantas foi bastante evidente aos 90 dias (Figura 7), tendo sido significativamente diminuídos pela presença dos FMA, tanto na parte aérea, quanto nas raízes. Nota-se que a presença dos FMA exerceu um papel fundamental na diminuição da concentração de Mn nos tecidos, sem que este fosse meramente um efeito da diluição pelo maior crescimento das plantas micorrizadas. Essa afirmação é baseada no fato de que as plantas do tratamento controle P2, as quais apresentaram biomassas semelhantes às das plantas micorrizadas, apresentaram maior concentração de Mn nos seus tecidos. Outra observação importante é a de que aos 90 dias, os valores de pH foram menores nos substratos das plantas micorrizadas e do controle P2 (Figura 10) em relação às do controle P1. Sob esse ponto de vista, seria de se esperar maior absorção de Mn, visto que a diminuição do pH aumenta a disponibilidade do Mn, fato que não aconteceu (Figura 12). Outro fator que pode auxiliar a interpretar esses resultados é o número de bactérias oxidantes e redutoras de Mn obtidas na rizosfera das plantas (Figura 9). Nota-se que o número de UFC oxidantes foi maior nos tratamentos micorrizados e controle P2, exceto na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>. A atividade dessas bactérias pode ter contribuído para a menor disponibilidade do Mn na região rizosférica, o que pode não ser detectado quando se analisa a disponibilidade do Mn no substrato como um todo. Neste caso, resta ainda a indagação de por quê, embora o solo rizosférico do tratamento controle P2, apresentasse número de bactérias oxidantes semelhante ao daquele das plantas micorrizadas, ainda assim as plantas apresentaram concentração de Mn significativamente maiores em seus tecidos. Esse fato pode estar relacionado com a proporção entre as comunidades de bactérias oxidantes e redutoras de Mn. Na Figura 9 é apresentado também o número de bactérias redutoras de Mn, evidenciando que na dose de 20 mg kg<sup>-1</sup> de Mn houve maior número de bactérias redutoras na rizosfera das plantas do tratamento controle P2. O resultado da combinação das comunidades microbianas, moduladas pela presença e

ausência dos FMA, pode desempenhar importante papel sobre a disponibilidade desse nutriente às plantas. Alterações na proporção entre bactérias oxidantes e redutoras de Mn, mediadas pela presença e ausência de micorrização, foram observadas por Kothari et al. (1991), os quais afirmam que a disponibilidade do Mn às plantas é mediada pela atividade desses microrganismos e que a proporção de cada comunidade é influenciada pela presença dos fungos micorrízicos, através das alterações quantitativas e qualitativas que causam nos exsudatos radiculares, com forte influência sobre os demais microrganismos que utilizam esses exsudatos na (micor)rizosfera (Lindermann, 1988).

Outro nutriente influenciado, tanto na planta, quanto no substrato, pelos tratamentos de micorrização foi o Fe (Figura 6 e Figura 11). Esse elemento teve sua disponibilidade no substrato diminuída aos 45 dias nos tratamentos controle, mais intensamente no tratamento controle P1, em todas as doses de Mn, o que coincidiu com sua concentração nas raízes nessa mesma época. De modo contrário, aos 90 dias essa situação foi invertida, sendo que nessa época, nos substratos dos tratamentos controle P1 e P2, houve maior disponibilidade de Fe em comparação aos tratamentos micorrizados, o que refletiu de forma semelhante nos teores de Fe da parte aérea. De modo contrário, os valores de pH nessa época foram mais baixos nos tratamentos controle P2 e nos micorrizados (Figura 10), indicando que a disponibilidade do Fe não foi dependente do pH. É possível que, de modo semelhante ao Mn, a disponibilidade do Fe também esteja sujeita à atividade microbiana.

## 7.5 Conclusões

- A atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas não foi apenas decorrente do efeito diluição do nutriente nas plantas mais desenvolvidas;
- Plantas micorrizadas apresentaram atenuação de toxidez de Mn numa mesma concentração no substrato em que plantas de mesma biomassa e fertilizadas com P solúvel já sofrem os sintomas;

- A micorrização propiciou absorção diferenciada de Fe e Mn, o que resultou em menor concentração nos tecidos das plantas;
- A micorrização das plantas influenciou na disponibilidade de Fe e Mn no substrato, cujo efeito não é função da alteração do pH.
- A micorrização alterou a composição da comunidade de bactérias oxidantes e reductoras de Mn na rizosfera.

## **8 ATENUAÇÃO DA TOXIDEZ DE MANGANÊS EM PLANTAS DE SOJA MICORRIZADAS, EM SOLO COM ALTA DISPONIBILIDADE DE MANGANÊS.**

### **Resumo**

Este experimento avaliou as hipóteses do envolvimento de FMA interagindo com microrganismos oxidantes e redutores de Mn, Si e P sobre a manifestação de sintomas de toxidez de Mn em plantas micorrizadas. Utilizou-se um solo argiloso com alto teor de Mn natural, aumentado ainda mais após a autoclavagem. Os tratamentos de micorrização foram controle P1, controle P2, *G.etunicatum* P1 e *G. macrocarpum* P1 em combinação com doses crescentes de Si (0, 10, 20, 30 e 40 mg kg<sup>-1</sup>). A finalidade de dois controles com duas doses de P (P1 = 30 mg kg<sup>-1</sup>; P2 = 45 mg kg<sup>-1</sup>) foi uma tentativa de se obterem plantas não micorrizadas com biomassa semelhante às micorrizadas, para se isolar o efeito diluição na expressão dos sintomas de toxidez de Mn. As plantas do tratamento controle P1 foram severamente injuriadas pelo excesso de Mn durante todo o período do experimento. As do controle P2 sofreram atenuação da toxidez de Mn desde o início do desenvolvimento, enquanto as micorrizadas tiveram atenuação da toxidez na fase final do experimento, a partir de um período após o qual se considera que a micorriza tornou-se eficiente. Apesar da adição extra de P no tratamento controle P2, estas apresentaram concentração semelhante às do tratamento controle P1, apesar de sua maior biomassa. Já as micorrizadas apresentaram concentrações mais elevadas de P que as dos controles P1 e P2. Houve diminuição nas concentrações de Mn nas plantas micorrizadas, fato que foi mais pronunciado para os teores de Fe na parte aérea. De modo contrário ao que ocorreu para a parte aérea, os teores de Fe e Mn no substrato foram aumentados. Houve correlação positiva e

significativa entre UFC de bactérias redutoras de Mn no substrato e disponibilidade de Fe e Mn, enquanto houve correlação negativa entre UFC de bactérias oxidantes de Mn e disponibilidade de Fe e Mn no substrato. Houve aparentemente efeito antagônico entre o número de bactérias redutoras de Mn e as oxidantes. Tais observações demonstram o grau de complexidade entre as interações nutricionais e microbianas que levam à atenuação da toxidez de Mn em plantas micorrizadas. Não houve efeito do Si adicionado ao substrato sobre as variáveis avaliadas, mesmo os teores de Si na parte aérea e sua disponibilidade no solo. Essa observação evidenciou a forte reação de imobilização do Si, ainda mais forte do que ocorre para o P nesses solos.

**Summary: MANGANESE TOXICITY ALLEVIATION IN MYCORRHIZAL SOYBEAN PLANTS IN A SOIL WITH HIGH MANGANESE AVAILABILITY.**

This experiment evaluated the hypothesis that mycorrhiza interacts with manganese reducing and oxidizing microorganisms, silicon and phosphorus on the expression of Mn toxicity in plants. A clay soil with high Mn availability was used and the available Mn increased even more after autoclaving. Two kinds of non-mycorrhizal control plants were installed, one with the same P rate as the mycorrhizal ones (control P1 = 30 mg kg<sup>-1</sup>) and another control with extra P (control P2 = 45 mg kg<sup>-1</sup>). There were two mycorrhizal treatments: *Glomus etunicatum* and *G. macrocarpum*. Mycorrhizal and non-mycorrhizal treatments were combined with the addition of increasing rates of soluble Si in the substrate (0, 10, 20, 30 e 40 mg kg<sup>-1</sup>). The objective of the two non-mycorrhizal controls was to obtain mycorrhizal and non-mycorrhizal plants with equivalent biomasses, in order to eliminate the dilution effect on the Mn toxicity symptom expression. Control P1 plants were strongly injured by Mn excess during the whole growth period. Those from control P2 presented almost no Mn toxicity symptoms from the beginning on, while mycorrhizal plants showed Mn toxicity alleviation only at the end of the experiment, probably after the complete installation of the mycorrhizal symbiosis.

In spite of extra P addition in the control P2 treatment, P concentration was equivalent to that found in the control P1 plants, although having produced greater biomass. Mycorrhizal plants presented higher P concentration comparing to the controls. Mn concentration decreased in mycorrhizal plants, what also occurred with Fe in the shoots. Conversely to what happened in the shoots, the Fe and Mn availabilities in the substrate were increased. There were positive correlations between colony forming units (CFU) of Mn reducing bacteria and Fe and Mn availability in the substrate, while there were negative correlations between CFU of Mn oxidizing bacteria and Fe and Mn availability. Apparently there was an antagonistic effect between Mn reducing and Mn oxidizing bacteria, what delineates a very complex series of microbial and nutritional interactions, which lead to Mn toxicity alleviation in mycorrhizal plants. There was no effect of added Si on the evaluated variables, even on Si concentration in plants and its availability in the substrate. This observation evidences a strong Si immobilization reaction in the soil, even stronger than what happens with phosphorus.

## **8.1 Introdução**

É freqüente a observação de que procedimentos de esterilização do solo aumentam a disponibilidade de Mn. Em experimentos que envolvem estudos com FMA, em que se faz necessária a esterilização do substrato por autoclavagem, para que haja eliminação da comunidade de FMA nativa, os aumentos da disponibilidade de Mn são bastante documentados (Cardoso, 1986; Miyazawa et al., 1993). Como a complexação orgânica é provavelmente o principal mecanismo que controla a solubilidade de Mn no solo, o aquecimento causado pela autoclavagem pode resultar em decomposição térmica dos quelatos orgânicos, com liberação do Mn. Quando se restabelece a comunidade microbiana após a autoclavagem, geralmente ocorre reimmobilização do Mn solubilizado, fato atribuído à produção de novos ligantes orgânicos pela atividade microbiana (Miyazawa et al., 1993). Além disso, atribui-se um efeito direto de alguns microrganismos do solo, atuando como oxidantes do Mn, o que reduz sua

disponibilidade (Ghiorse, 1988). Como os processos de redução de Mn no solo, além de microbianos, também são de origem abiótica (Rengel, 1997), este último continua a ocorrer mesmo após a esterilização, o que pode aumentar sua disponibilidade a níveis tóxicos para as plantas (Uren et al., 1988), uma vez que os microrganismos que atuam no sentido contrário, ou seja, diretamente na oxidação ou na produção de quelatos orgânicos, são eliminados.

A observação de que a reinfestação com FMA de substrato esterilizado resulta em maior desenvolvimento das plantas é normalmente atribuída ao melhor estado nutricional das plantas devido à micorrização, principalmente no que se refere ao P. De fato, a atenuação da toxidez de Mn em plantas de soja micorrizadas, cultivadas em solo com alta disponibilidade natural desse micronutriente foi observada por Cardoso (1986), Bethlenfalvay & Franson (1989), dentre outros. Existe a possibilidade de que o inóculo de FMA utilizado nesses experimentos contenha microrganismos que sejam capazes de se restabelecerem no substrato e reduzirem a severidade da toxicidade de Mn pela sua oxidação (Uren et al., 1988). De modo semelhante, Kothari et al. (1991) observaram que a diminuição das concentrações de Mn em plantas micorrizadas foi relacionada com a diminuição da comunidade microbiana redutora de Mn na rizosfera das plantas, induzida pela micorrização. Outro fato a se considerar é o padrão de recolonização do substrato submetido ao processo de esterilização. Nesse caso, alguns grupos microbianos podem ser favorecidos e se tornarem predominantes, o que pode interferir na disponibilidade do Mn, para mais ou para menos, caso o grupo dominante atue no processo de redução ou de oxidação do Mn, respectivamente (Marschner, 1988). Essa questão torna-se ainda mais complicada quando se considera a presença de FMA como variável adicional. Sabe-se que a micorrizosfera apresenta condições distintas da rizosfera, o que resulta em alterações quantitativas e qualitativas da comunidade microbiana presente (Lindermann, 1988; Paulitz & Linderman, 1989).

Além do fato de que a micorrização pode alterar os padrões de predominância de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na micorrizosfera, os quais atuam sobre a disponibilidade de Mn, outro fator pode estar relacionado com a atenuação da toxidez de Mn em plantas micorrizadas. Trata-se do possível aumento da

absorção de silício (Si) por plantas micorrizadas, à semelhança do que ocorre para P, fato demonstrado anteriormente (Yost & Fox, 1982; Nogueira et al., 2000). Existem vários trabalhos relatando o envolvimento do Si na atenuação da severidade da toxidez de Mn (Williams & Vlamis, 1957; Horst & Marshner, 1978; Horiguchi, 1988; Epstein, 1994), inclusive no que se refere à menor absorção de Mn por plantas que receberam Si na adubação (Ma & Takahashi, 1990a).

Na solução do solo o Si está na forma de ácido monossilícico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , um ácido fraco, a maior parte na forma não dissociada, em virtude de seu alto  $\text{pK}_{a1}$  (9,6), o qual é prontamente absorvido pelas plantas (Wild, 1988). Apesar da baixa dissociação, está sujeito a interagir com o complexo sortivo do solo, o que inclui diversas formas de sílica cristalina e amorfa, silicatos e substâncias não silicosas como óxidos de Fe, Al e Mn (McKeague & Cline, 1963). Ma & Takahashi (1990a) observaram, em um solo argiloso proveniente de rocha basáltica e cinzas vulcânicas (o que denota alta capacidade de adsorção de P), que a adsorção de Si foi proporcional à sua adição ao solo, mas foi significativamente reduzida quando esse solo recebeu altas doses de P solúvel. Isso sugere que os sítios de adsorção de Si poderiam ser os mesmos em que ocorre a adsorção de P.

A fertilização fosfática tem sido relacionada tanto com o aumento quanto com a diminuição da disponibilidade de Mn, fato provavelmente dependente da fonte de P, propriedades do solo e do fertilizante, além da própria planta em estudo. Entretanto, tem-se observado que de modo geral existe uma relação inversa entre P e Mn nos tecidos das plantas (Tisdale et al., 1985). Cardoso (1996) encontrou menores teores de Mn em plantas micorrizadas, que por sua vez apresentaram maiores teores de P. Jones & Fox (1978) sugeriram que a redução do teor de Mn nos tecidos da planta com o aumento das doses de P pode ser o resultado de sua imobilização sobre ou no interior das raízes, uma vez que não foram observados efeitos do P aplicado ao solo sobre a disponibilidade do Mn. Além disso, Foy (1984) preconiza que a adição de P pode reduzir a toxicidade de Mn pela formação de complexos inativos entre esses íons no interior da planta. Essa também pode ser uma das razões pelas quais ocorre atenuação da toxicidade de Mn em

plantas micorrizadas, já que nas interações eficientes, as plantas micorrizadas geralmente apresentam maiores teores de P em seus tecidos.

Esse experimento foi conduzido para avaliar os efeitos do excesso de Mn sobre plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas, em combinação com o fornecimento de doses crescentes de Si. Como tratamentos controle não micorrizados foram utilizados dois níveis de P, sendo o primeiro (P1) igual ao das plantas micorrizadas e o segundo (P2) com uma dose extra de P, visando, neste caso, obter plantas não micorrizadas com produção de biomassa e teores de P semelhantes aos das micorrizadas.

## 8.2 Material e Métodos

O solo utilizado para esse experimento, o mesmo dos experimentos anteriores, classificado como NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico (Embrapa, 1999) [Typic Rhodudalf (Estados Unidos, 1975)], foi obtido da camada 0-20 cm de uma área previamente cultivada com soja. A amostra de solo foi passada por peneira de 4 mm de malha antes da autoclavagem a 121°C por duas horas para eliminação da microbiota nativa, sendo posteriormente analisada quimicamente para fins de fertilidade (Tabela 1). O teor de Mn que era de cerca de 60 mg dm<sup>-3</sup> antes da autoclavagem passou para 660 mg dm<sup>-3</sup> após o processo.

Tabela 1. Características da análise química do substrato após a autoclavagem

pH	M.O.	P	S-SO <sub>4</sub>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	T	V
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		----- mmolc dm <sup>-3</sup> -----							-- % --
6,1	30	21	25	4,3	74	21	0	20	99,3	119,3	83

Após a autoclavagem o solo foi acondicionado em vasos plásticos com 4 kg de capacidade, cada qual constituindo uma unidade experimental. Não houve necessidade de calagem e apenas o K foi fornecido na dose de 24 mg kg<sup>-1</sup> (KCl), visando a elevação do teor disponível para 200 mg dm<sup>-3</sup>. O fósforo foi fornecido em duas doses

conforme os tratamentos: controle P1, controle P2, *G. etunicatum*, *G. macrocarpum* em combinação com as doses de 0, 10, 20, 30 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Si na forma de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O, num esquema fatorial 4x5 (4 tratamentos de micorrização e 5 doses de Si), em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, totalizando 80 unidades experimentais. As doses de fertilizante fosfático foram calculadas com base no teor de P inicialmente disponível de 16 mg kg<sup>-1</sup> (21 mg dm<sup>-3</sup>), para elevar a concentração a 30 mg kg<sup>-1</sup> no caso da dose P1 e para 45 mg kg<sup>-1</sup> no caso da dose P2, na forma de superfosfato triplo moído (< 0,25 mm). Para isso, os vasos dos tratamentos controle P1, *G. etunicatum* e *G. macrocarpum* receberam 311 mg do fertilizante, enquanto os vasos do controle P2 receberam 644 mg. O uso de dois controles com duas doses de P teve a finalidade de se tentar obter plantas não micorrizadas com biomassa e teores de P nos tecidos equivalentes àqueles das plantas micorrizadas. Dessa forma, pode-se isolar o efeito diluição como um dos possíveis fatores relacionados com a atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas, normalmente mais desenvolvidas.

Os fungos micorrízicos foram inoculados pela adição de uma suspensão de cerca de 200 esporos em cada vaso, previamente extraídos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicholson, 1963) de vasos de multiplicação em *Brachiaria decumbens*. A suspensão de esporos foi pipetada em um orifício de 5 cm de profundidade no centro de cada vaso, ao redor do qual cinco sementes de soja da cultivar IAC 8-2 previamente desinfestadas à superfície com solução comercial de hipoclorito de sódio a 25% foram semeadas. Após uma semana as plântulas foram desbastadas, deixando-se apenas uma por vaso, ocasião em que todos os vasos receberam 20 mL de um filtrado obtido do solo original (2 kg de solo agitados em 4 L de água) passado por várias peneiras, sendo a de menor malha com 44 µm, com a finalidade de se restabelecer a comunidade microbiana nativa, exceto FMA.

O fornecimento de N foi feito via fixação biológica, inoculando-se as plântulas em emergência com *Bradyrhizobium elkanii* contido em 2 mL de meio de cultura líquido, após crescimento por cinco dias. O experimento foi mantido em casa-de-vegetação com temperatura controlada (mínima de 20°C e máxima de 35°C). A irrigação foi feita diariamente com água destilada conforme a necessidade.

Aos 80 dias após a emergência, as plantas e o substrato foram colhidos para análise. A parte aérea, após lavagem por duas vezes em água destilada, foi seca a 60°C em estufa com circulação forçada de ar até peso constante, após o que foi moída e submetida à determinação de P (colorimetria do metavanadato), Fe e Mn (fotometria de absorção atômica) a partir do extrato nítrico-perclórico, e também de Si [Bataglia et al. (1978), modificado], substituindo-se a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por uma de HCl de mesma normalidade. As raízes foram removidas do substrato e parte foi amostrada, juntamente com o solo aderido, para avaliação do número de bactérias oxidantes e redutoras de Mn. O remanescente foi lavado sob água de torneira, solução de HCl 0,01 N, duas vezes em água destilada e seco como a parte aérea. Uma alíquota foi reidratada e usada para avaliação da colonização micorrízica (Phillips & Hayman, 1970; Giovannetti & Mosse, 1980), inclusive para os controles não inoculados com fungos micorrízicos. O restante do material foi submetido às mesmas análises que a parte aérea. Amostras do substrato foram secas ao ar e passadas por peneira de 2 mm antes do preparo dos extratos para determinação dos teores de Mn e Fe disponíveis por fotometria de absorção atômica [extração com a solução Mehlich I ( $\text{HCl}$  0,05 +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ ) na proporção de 1:10 substrato/solução, agitados horizontalmente por 15 minutos a 250 rpm e filtrados em papel de filtro faixa azul número 42 (Framex<sup>®</sup>)]. Obtiveram-se também, os valores de pH em solução centimolar de  $\text{CaCl}_2$ , na proporção de 1:2,5 de substrato/solução, bem como os teores de Si disponível (Korndörfer et al., 1999). Para a estimativa do número de bactérias oxidantes de Mn no substrato foi utilizado o meio de Garretsen (Huber & Graham, 1992), com uma concentração de 0,8 g  $\text{L}^{-1}$  de Mn na forma de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . A identificação de colônias de bactérias oxidantes de Mn foi feita pela observação da deposição de Mn oxidado, de coloração marrom-escuro, em colônias que se desenvolviam sobre o meio que continha Mn reduzido, inicialmente de coloração clara. Para a estimativa do número de bactérias redutoras de Mn utilizou-se o meio descrito por Ridge & Rovira (1971), modificado por Marschner et al. (1991). A identificação de colônias redutoras de Mn foi feita pela observação da formação de um halo claro ao redor de algumas colônias de bactérias cultivadas no meio que continha Mn oxidado, inicialmente marrom. Os dois meios de cultura receberam cicloheximida na

concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  com a finalidade de inibir o crescimento fúngico. A diluição das amostras para o plaqueamento foi feita tomando-se amostras de 10g de raízes frescas com solo aderido no momento da colheita do experimento e agitadas em 90 mL de solução salina autoclavada (0,85%) em frascos de erlenmeyer e agitadas horizontalmente por 15 minutos a 270 rpm. A partir desta suspensão, fez-se diluição em série de 1 mL em 9 da mesma solução salina em tubos de ensaio até o fator de  $1.10^{-4}$ , da qual uma alíquota de  $50 \mu\text{L}$  foi espalhada com auxílio de alça de Drigalsky na superfície do meio de cultura em placa de Petri, de modo que a diluição considerada para os cálculos foi de  $5.10^{-6}$ . Foram plaqueadas apenas amostras do substrato de vasos que receberam as concentrações de 0, 20 e  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de Si, compreendendo todos os tratamentos de inoculação, com 5 réplicas para cada repetição. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por cinco dias, quando se procedeu à contagem.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o procedimento GLM do SAS<sup>®</sup> (The Statistical Analysis System) (SAS, 1991), empregando-se o teste *t* de Student a  $P < 0,05$  para a comparação entre os tratamentos de inoculação. Os dados de contagem de colônias de bactérias oxidantes e redutoras de Mn foram previamente submetidos à transformação  $(\text{UFC} + 0,5)^{1/2}$  antes de serem analisados, onde UFC refere-se ao número de unidades formadoras de colônia obtido na média das 5 réplicas. Também foram feitas análises de correlação simples entre algumas variáveis por meio do procedimento CORR, obtendo-se o coeficiente de correlação de Pearson, bem como seu nível de significância.

### 8.3 Resultados

Embora não se tenham obtido medidas do crescimento das plantas ao longo do tempo, é importante ressaltar que as plantas do tratamento controle que receberam a maior dose de P (controle P2) visivelmente apresentaram maior desenvolvimento inicial, com menor manifestação dos sintomas de toxidez de Mn. De modo contrário, as plantas micorrizadas apresentaram desenvolvimento inicial

semelhante ou pior que as do controle P1, as quais foram severamente injuriadas por sintomas de toxidez de Mn. Somente após 40 dias, quando se supõe que a micorriza se tornou eficiente, é que as plantas micorrizadas passaram a ter desenvolvimento igual ou maior que as do tratamento controle P2, com atenuação dos sintomas de toxidez de Mn, principalmente nas partes novas das plantas. Não foi notada qualquer diferença visual entre os tratamentos no que se referiu às doses de Si adicionadas ao substrato.

Os tratamentos de inoculação com FMA foram o fator de maior efeito sobre as variáveis, ao passo que a adição de Si não influenciou a maioria das variáveis analisadas. Apesar de não ter havido efeito das doses de Si sobre os teores de Si na planta, houve interação entre doses de Si e os tratamentos de inoculação ( $P < 0,05$ ) sobre a produção de massa de material seco da parte aérea (MSPA) das plantas (Figura 1). Dentre os tratamentos de inoculação, o controle P1 foi o que resultou na menor produção de massa de material seco pelas plantas, na maioria das doses de Si; os tratamentos controle P2 e *G. etunicatum* resultaram em produções intermediárias de massa pelas plantas de soja. O destaque com maior produção de biomassa foram as plantas micorrizadas com *G. macrocarpum*. Nota-se que a tentativa de se obterem plantas micorrizadas com produção de biomassa semelhante às não micorrizadas pela adição extra de P (controle P2) foi obtida apenas com relação às plantas do tratamento com *G. etunicatum*, que apresentaram crescimento semelhante às do tratamento controle P2. Como era de se esperar, as plantas do tratamento controle P1 apresentaram produção de biomassa significativamente menor na média das doses de Si, ao passo que a maior eficiência micorrízica, verificada pela maior produção de biomassa pela parte aérea, foi obtida nas plantas do tratamento com *G. macrocarpum*, sem, no entanto, diferir significativamente das micorrizadas com *G. etunicatum*.

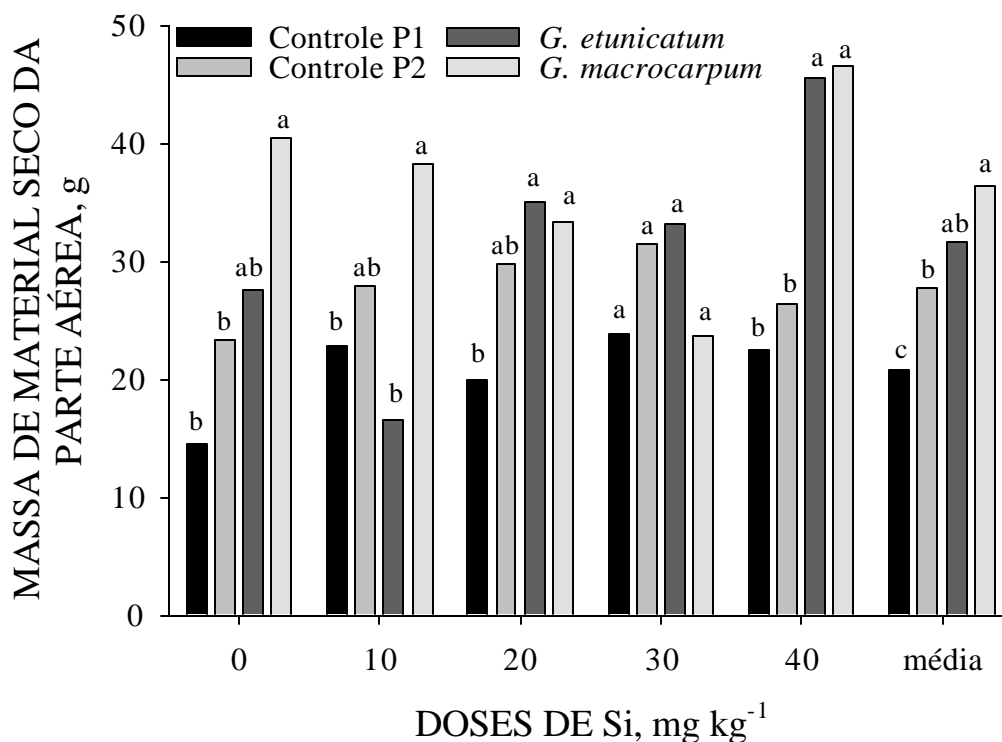


Figura 1 - Massa de material seco da parte aérea de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), cultivadas em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ .

O teor de P no tecido das plantas foi influenciado apenas pelos tratamentos de inoculação, sem interação com as doses de Si (Figura 2). Nesse caso, não se conseguiu a obtenção de plantas controle e micorrizadas com concentrações equivalentes de P, visto que, para a parte aérea, as plantas dos tratamentos controle, mesmo na maior dose de P (P2), apresentaram teores de P de cerca de  $0,65 \text{ mg kg}^{-1}$ , sem diferirem entre si, ao passo que as micorrizadas apresentaram concentração quase do dobro, cerca de  $1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , diferindo significativamente dos valores encontrados nas plantas dos dois controles, mas sem diferirem entre si. Para as concentrações de P nas raízes, o comportamento foi semelhante ao observado para a parte aérea. Embora mais

altos em relação ao encontrado nas plantas dos tratamentos controle P1 e P2, as plantas micorrizadas não apresentaram diferenças tão expressivas quanto às observadas na parte aérea. Em geral, as raízes das plantas dos tratamentos controle apresentaram  $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , ao passo que as micorrizadas apresentaram cerca de  $0,95 \text{ mg kg}^{-1}$ . Não houve diferenças significativas entre os dois controles e os dois tratamentos com FMA.

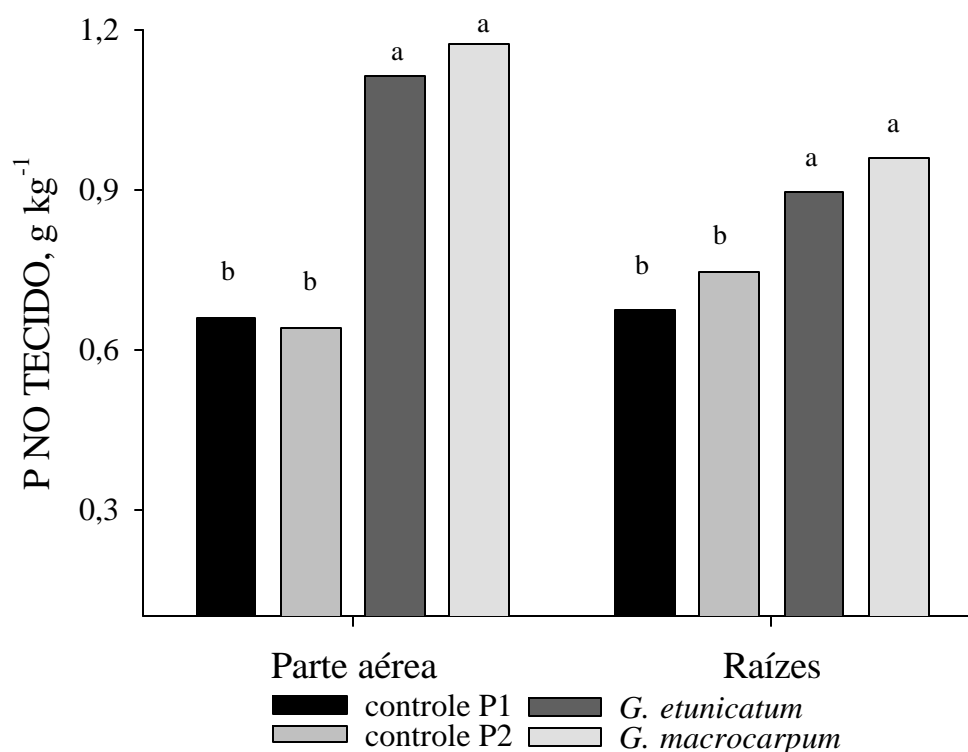


Figura 2 - Concentração de P na parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), cultivadas em substrato com alta disponibilidade natural de Mn. Letras distintas indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

As concentrações de Fe nas raízes também não foram influenciadas pelos tratamentos. Por outro lado, na parte aérea, o comportamento geral foi de diminuição da concentração de Fe nas plantas micorrizadas (Figura 3). O comportamento geral, na média das doses de Si, foi que as plantas dos tratamentos controle P1 e P2 apresentaram os maiores teores de Fe, cerca de  $230 \text{ mg kg}^{-1}$ , na média das doses de Si, sem diferirem

entre si. Já as micorrizadas apresentaram teores de Fe da ordem de  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ , ou seja, cerca de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  menores. Não houve um comportamento claro dos efeitos das doses de Si sobre os teores de Fe em cada tratamento de micorrização, exceto para as plantas do tratamento controle P1, que apresentou diminuição quadrática da concentração de Fe com o aumento das doses de Si no substrato (equações não apresentadas).

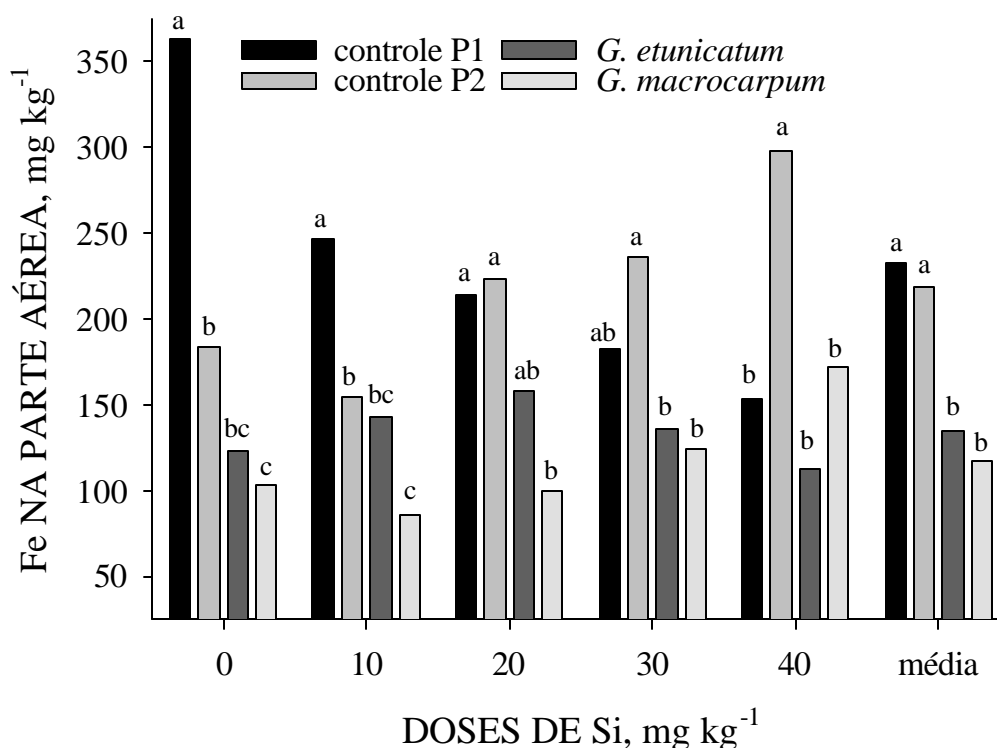


Figura 3 - Teores de Fe na parte aérea de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), cultivadas em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste  $t$ .

Com relação às concentrações de Mn (Figura 4), os efeitos dos tratamentos foram menos expressivos que os observados para o Fe. Não houve interação entre os fatores e apenas efeito dos tratamentos de inoculação para os teores da parte aérea. Nas raízes, o teor médio de Mn foi de  $2722 \text{ mg kg}^{-1}$ . Na parte aérea, os teores

foram diminuídos nas plantas micorrizadas, em comparação às do tratamento controle P2. As plantas do tratamento controle P1 apresentaram teores intermediários, que não diferiram das do controle P2, nem das micorrizadas, que por sua vez também não diferiram entre si. É interessante notar, comparando-se os valores extremos, ou seja, controle P2, com o maior valor ( $3190 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e *G. macrocarpum*, com o menor valor ( $2107 \text{ mg kg}^{-1}$ ), que a diferença de concentração de Mn foi mais de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  para menos na planta micorrizada.

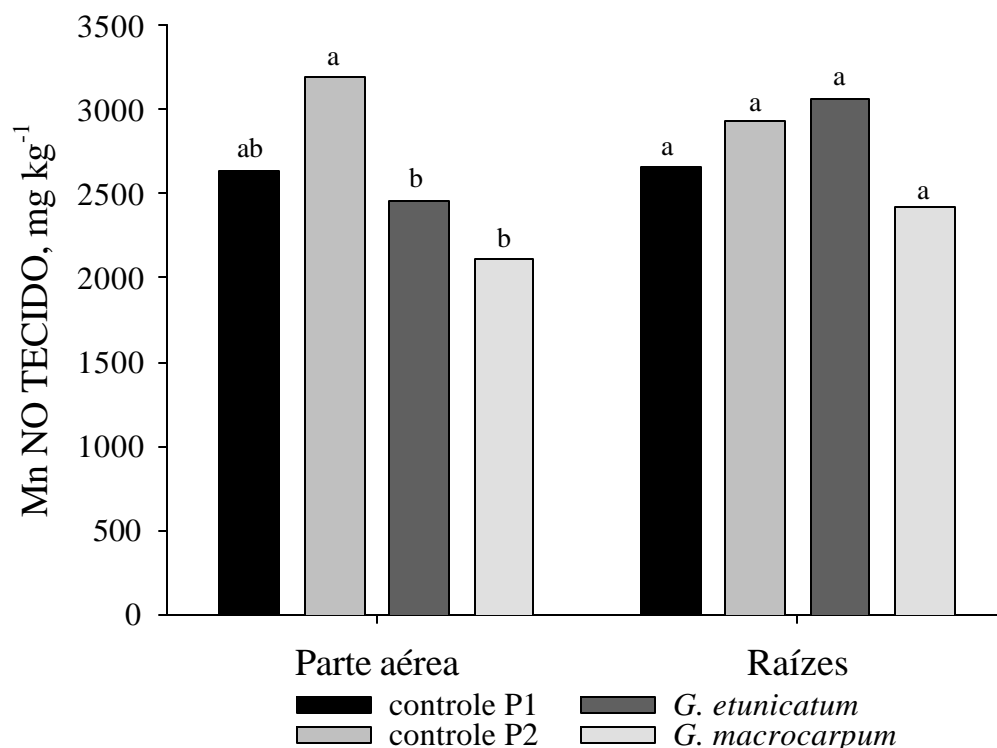


Figura 4 - Concentração de Mn na parte aérea e raízes de plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), cultivadas em substrato com alta disponibilidade natural de Mn. Letras distintas indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

Embora as diferenças entre os valores de pH ( $\text{CaCl}_2$  0,01M) no substrato tivessem sido muito sutis (Figura 5), não mais do que 0,3 unidades de pH entre os valores extremos, estas foram significativas. Em geral, os menores valores de pH foram

encontrados no substrato em que se desenvolveram plantas do tratamento controle P2, enquanto os valores encontrados no substrato dos demais tratamentos não diferiram entre si.

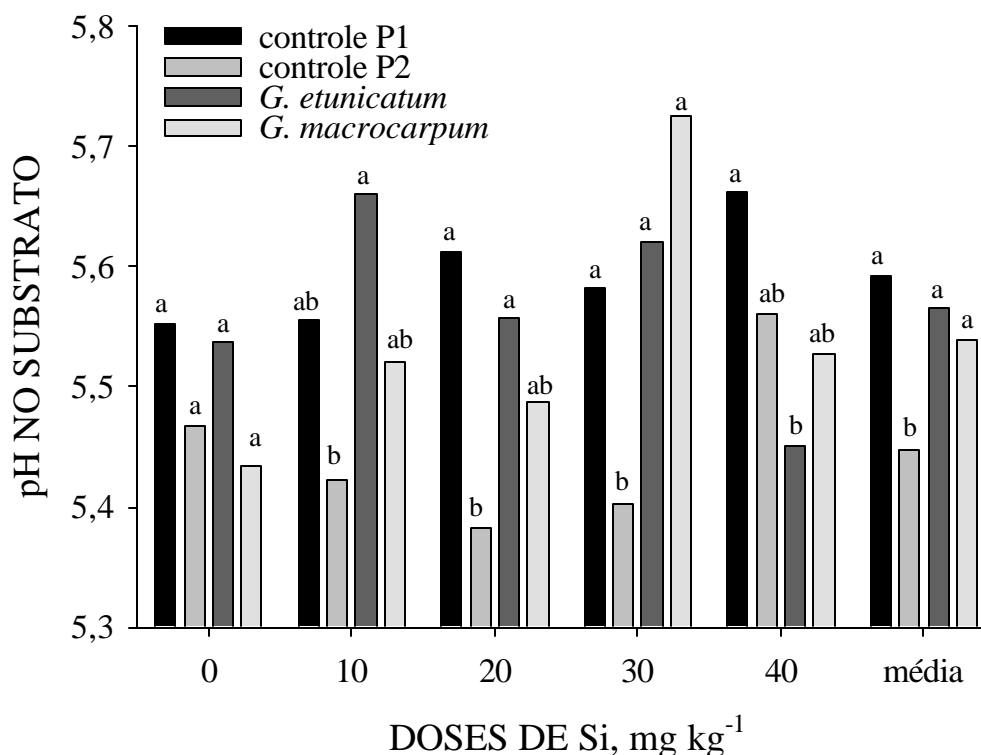


Figura 5 - pH no substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

Houve alterações quanto à disponibilidade de Fe no substrato (Figura 6), sendo que, em geral, os menores valores de Fe disponível foram observados no substrato em que foram cultivadas as plantas do tratamento controle P1, 69 mg dm<sup>-3</sup> em média. Os teores encontrados no substrato das plantas que receberam o tratamento controle P2 foram intermediários, 72 mg dm<sup>-1</sup>, enquanto que no substrato das plantas micorrizadas a disponibilidade de Fe foi significativamente aumentada para 74 mg dm<sup>-3</sup>, na média dos dois tratamentos com FMA, em relação aos dois tratamentos controle (P1 e P2).

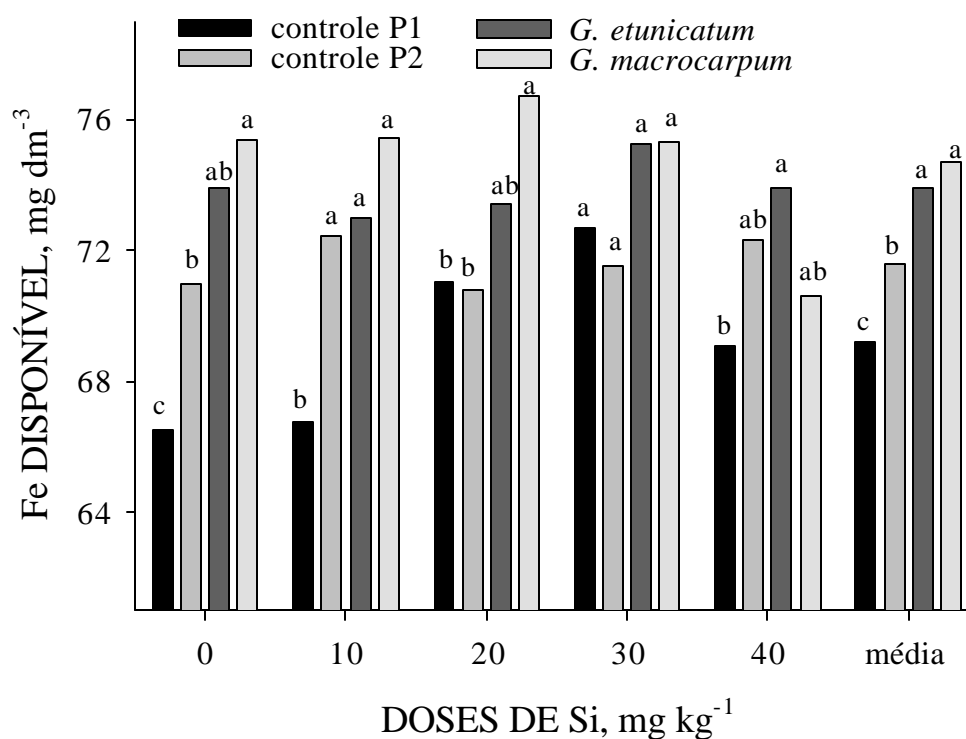


Figura 6 - Fe disponível em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

De forma semelhante ao que ocorreu para o Fe, a disponibilidade de Mn no substrato também foi significativamente aumentada nos tratamentos que receberam inoculação com FMA (Figura 7). Na média das doses de Si, os menores valores de Mn disponível foram encontrados no substrato das plantas controle P1, com  $263 \text{ mg dm}^{-3}$ . A disponibilidade de Mn no substrato das plantas do tratamento controle P2 foi significativamente superior àquela encontrada no substrato das plantas controle P1, sendo de  $309 \text{ mg dm}^{-3}$ . Disponibilidade ainda maior foi observada no substrato das plantas micorrizadas, tendo sido, na média dos dois tratamentos de micorrização, de  $355 \text{ mg dm}^{-3}$ , que não diferiram entre si.

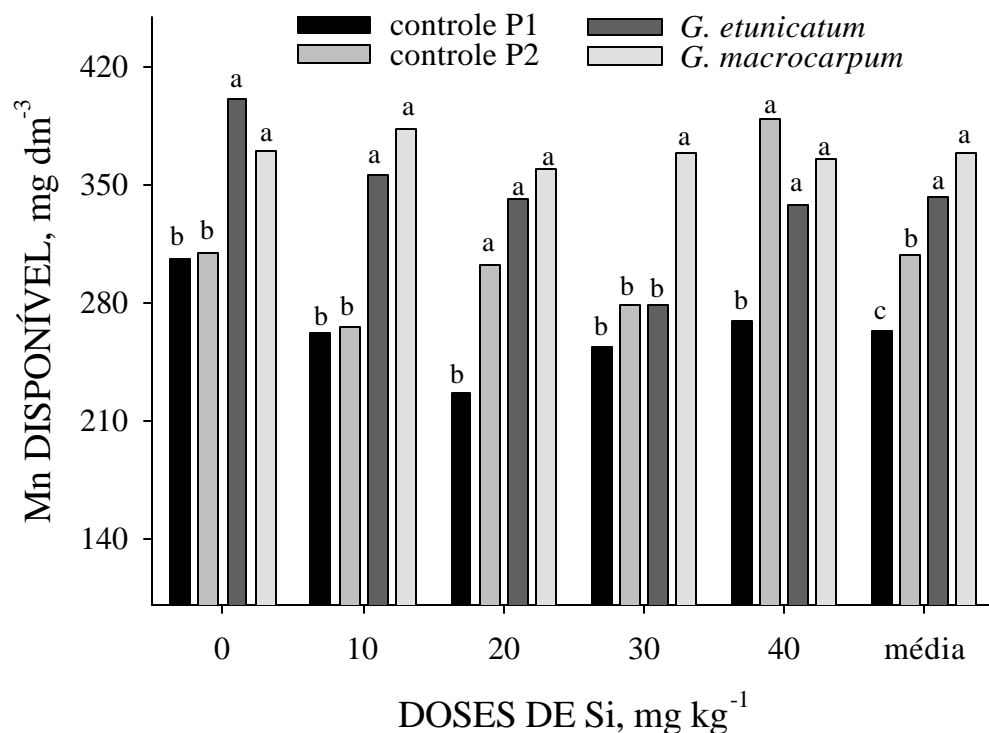


Figura 7 - Mn disponível em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

A disponibilidade de Si no substrato, ao contrário do que se esperava, não sofreu qualquer efeito das doses de Si adicionadas. Os únicos efeitos observados foram com relação aos tratamentos de inoculação de FMA (Figura 8). A disponibilidade tendeu a ser maior no substrato das plantas que receberam o tratamento controle P1, da ordem de  $120 \text{ mg dm}^{-3}$ , e menor nos demais tratamentos, da ordem de  $110 \text{ mg dm}^{-3}$ .

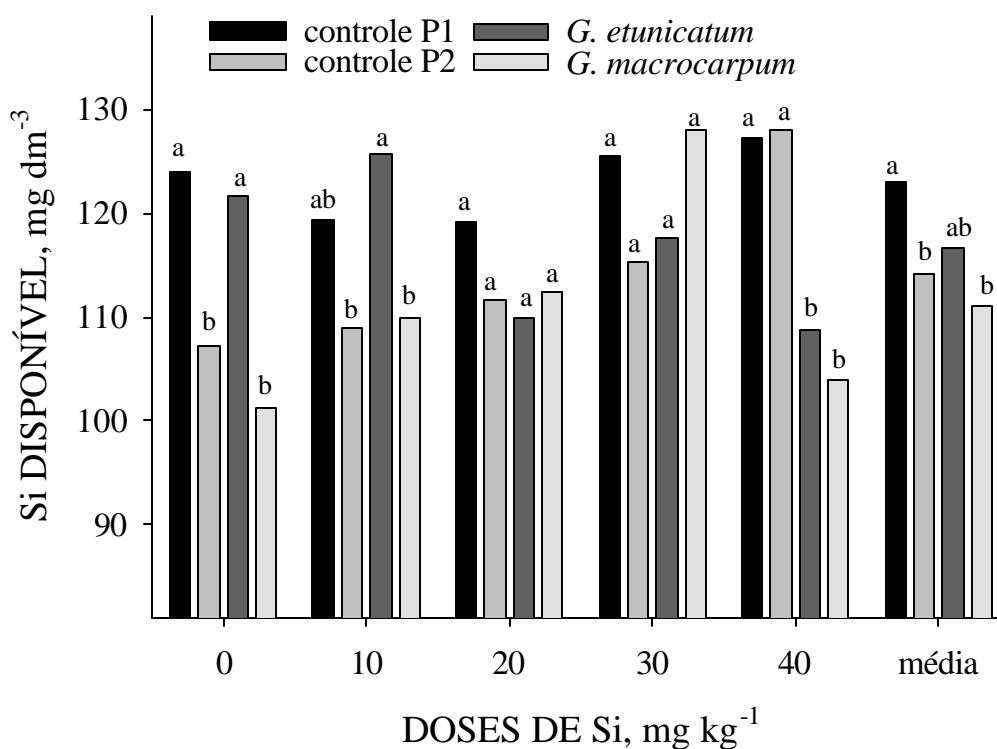


Figura 8 - Si disponível em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

A estimativa do número de bactérias redutoras de Mn por g de raiz fresca mais solo aderido foi significativamente maior nas plantas micorrizadas (Figura 9). Os valores foram, em alguns casos, cem vezes superiores na presença de micorriza, comparando-se aos valores encontrados nas plantas controle P1. Na média das doses de Si, a estimativa do número de UFC de bactérias redutoras de Mn nas raízes das plantas do controle P1 apresentou os menores valores, seguida pelos resultados obtidos nas plantas do tratamento controle P2. Os resultados obtidos das plantas micorrizadas foram significativamente superiores aos dos dois controles. Por sua vez, a micorrização com *G. etunicatum* estimulou ainda mais o número de UFC de redutores de Mn em comparação com a micorrização com *G. macrocarpum*, que diferiram estatisticamente entre si.

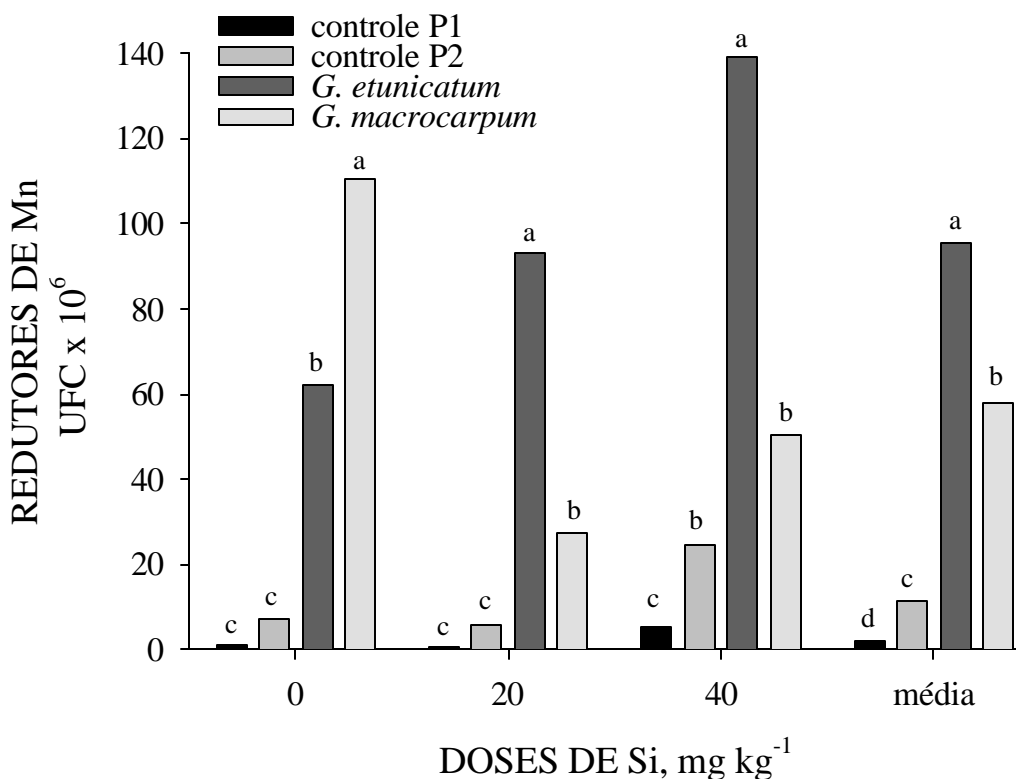


Figura 9 - Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias redutoras de Mn em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

Com relação ao número de UFC de bactérias oxidantes de Mn, o comportamento, embora não tão expressivo, foi inverso ao observado para as redutoras de Mn. Nesse caso, houve maior número de UFC nos tratamentos controle P1 e controle P2, comparando-se aos resultados obtidos de plantas micorrizadas (Figura 10). Em geral, o número de UFC de oxidantes de Mn foi o dobro na rizosfera das plantas controle, comparando-se às plantas com os dois FMA, que por sua vez não diferiram entre si.

Não houve efeito isolado das doses de Si e nenhum tratamento afetou os teores de Si na parte aérea e raízes das plantas, cujas médias foram 2,57 g kg<sup>-1</sup> e 16,85 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Outras variáveis não influenciadas pelos tratamentos foram a

massa de material seco de raízes, com média de 9,31 g por vaso e a colonização radicular, com média de 29,29% nas plantas do tratamento com *G. etunicatum* e 34,77% nas plantas do tratamento com *G. macrocarpum*, sem diferença significativa entre esses valores.

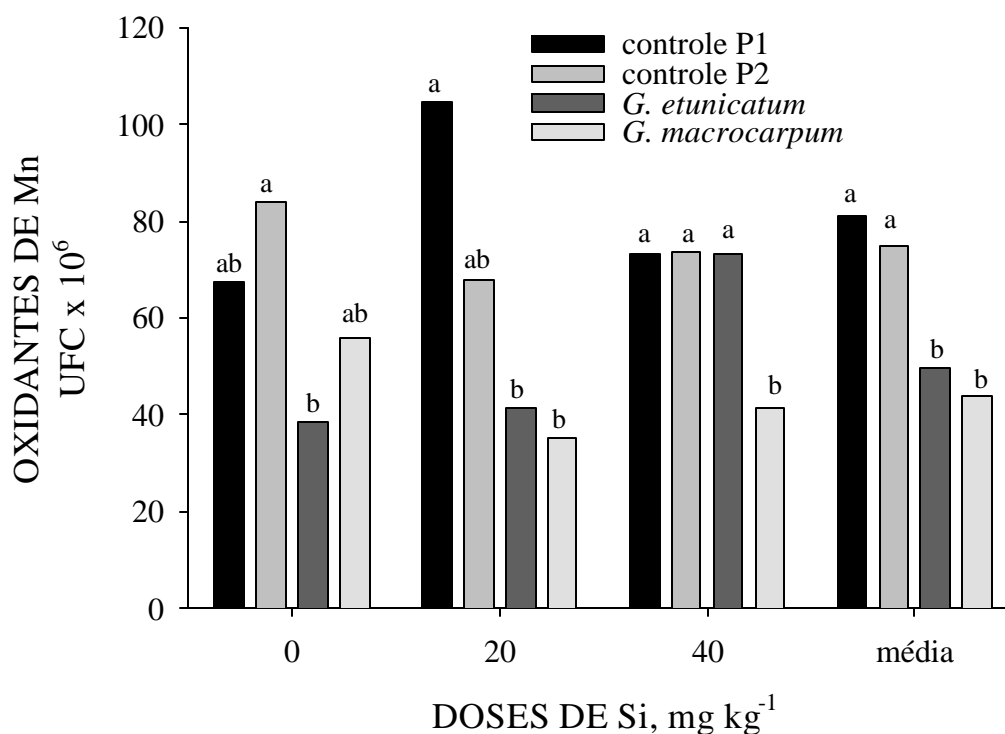


Figura 10 - Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias oxidantes de Mn em substrato com alta disponibilidade natural de Mn, cultivado com plantas de soja micorrizadas (*G. etunicatum* e *G. macrocarpum*) e não micorrizadas (controle P1 e controle P2), que recebeu doses crescentes de Si. Letras distintas na mesma dose de Si indicam diferenças significativas a  $P < 0,05$  pelo teste *t*.

As análises de correlação estabelecidas entre massa de material seco da parte aérea (Figura 11) e algumas variáveis podem auxiliar na interpretação dos resultados. Houve correlação negativa com os teores de Fe na parte aérea ( $r = -0,40$ ), teores de Mn na parte aérea ( $r = -0,55$ ) e raízes ( $r = -0,64$ ), pH no substrato ( $r = -0,57$ ) e Si disponível ( $r = -0,75$ ). De modo contrário, houve correlação positiva com o número

de UFC de bactérias redutoras de Mn ( $r = 0,72$ ). Já a porcentagem de colonização radicular (Figura 12) correlacionou-se negativamente com os teores de Mn na parte aérea ( $r = -0,65$ ), raízes ( $r = -0,62$ ) e pH do substrato ( $r = -0,62$ ), enquanto que houve correlação positiva com a massa de material seco da parte aérea ( $r = 0,65$ ). De modo interessante, a estimativa do número de UFC de bactérias redutoras de Mn isoladas da das raízes mais solo aderido apresentou correlação positiva com a disponibilidade de Fe ( $r = 0,44$ ) e Mn ( $r = 0,51$ ) no substrato, enquanto que o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn apresentou correlação negativa com essas variáveis ( $r = -0,36$  e  $-0,46$ , respectivamente) (Figura 13).

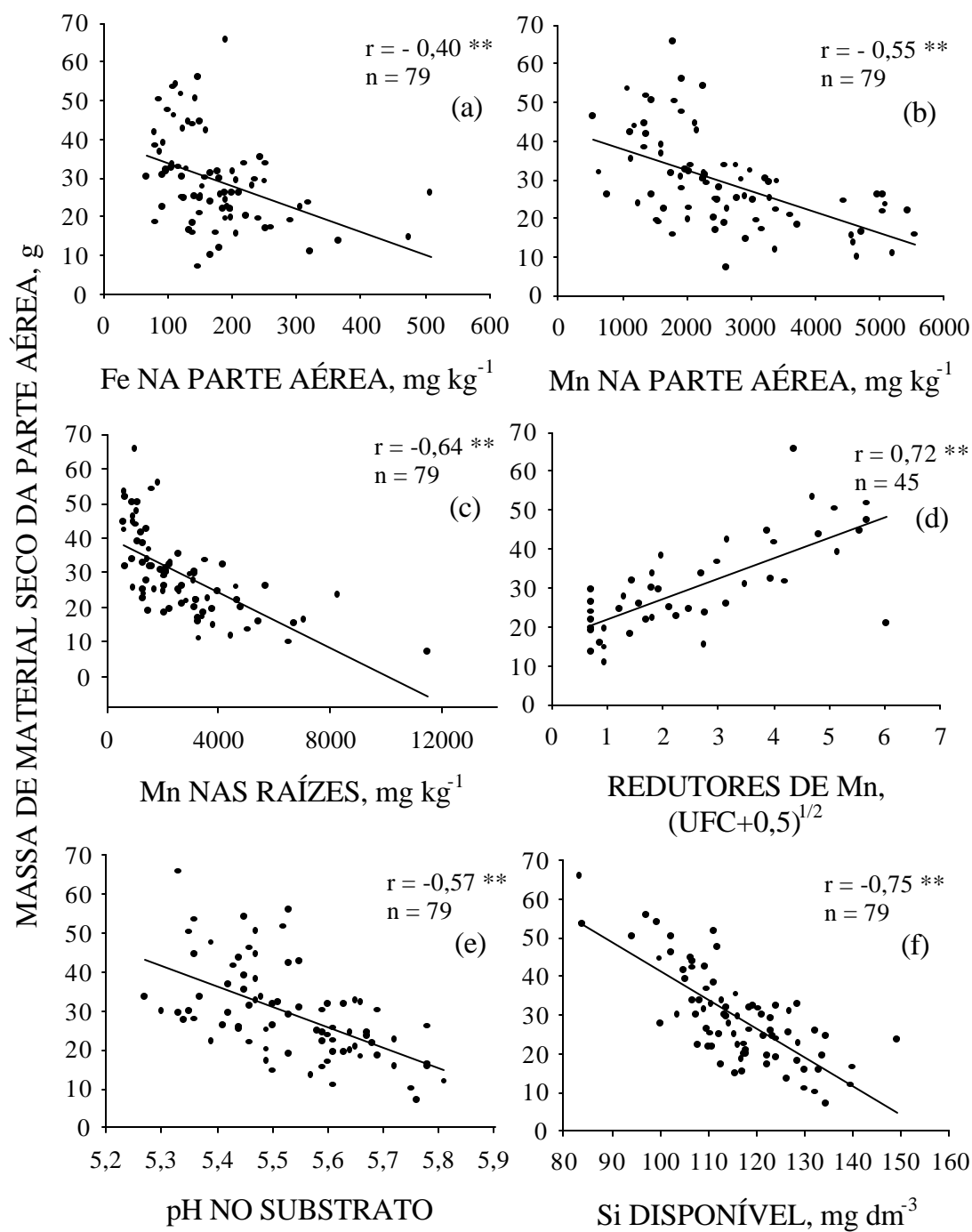


Figura 11 - Correlações simples entre massa de material seco da parte aérea de soja e teores de Fe na parte aérea (a), teores de Mn na parte aérea (b) e raízes (c), bactérias redutoras de Mn no substrato (d), pH no substrato (e) e Si disponível (f).  $** P < 0,01$ .

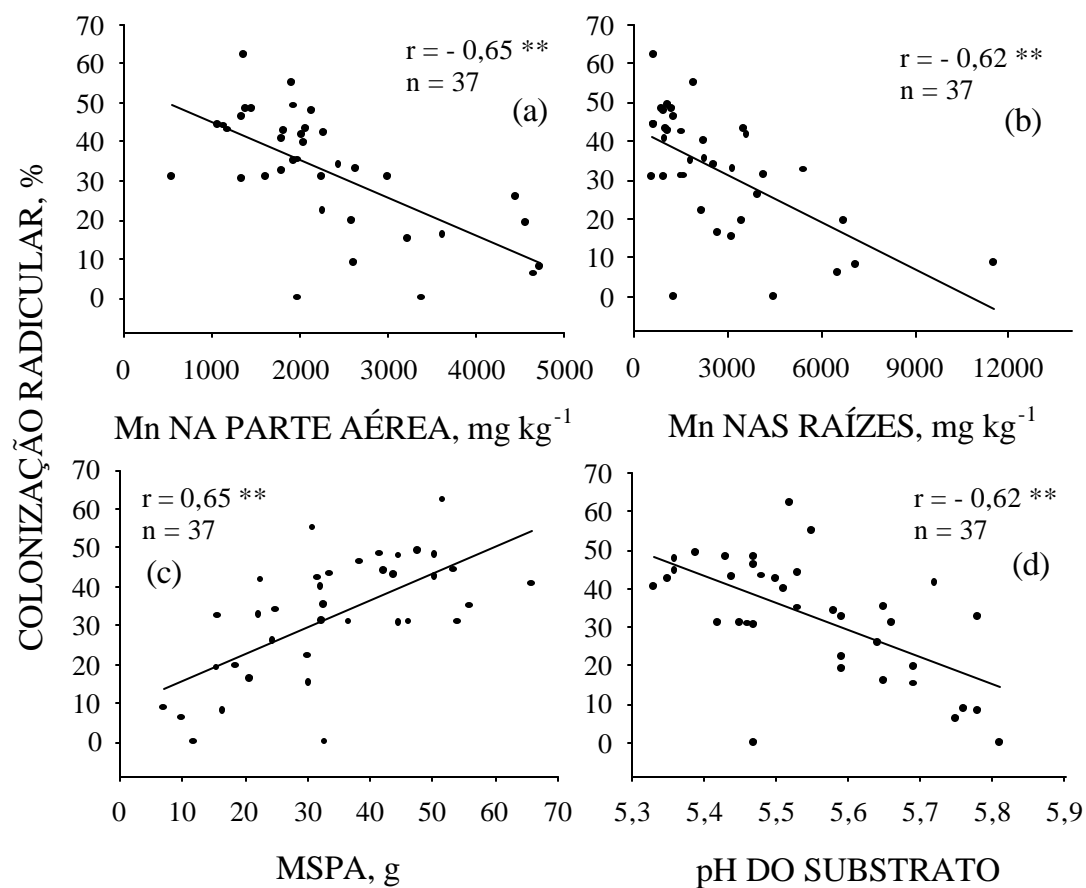


Figura 12 - Correlações simples entre colonização radicular e teores de Mn na parte aérea (a) e raízes (b), massa de material seco da parte aérea (c) e pH do substrato (d).  $** P < 0,01$ .

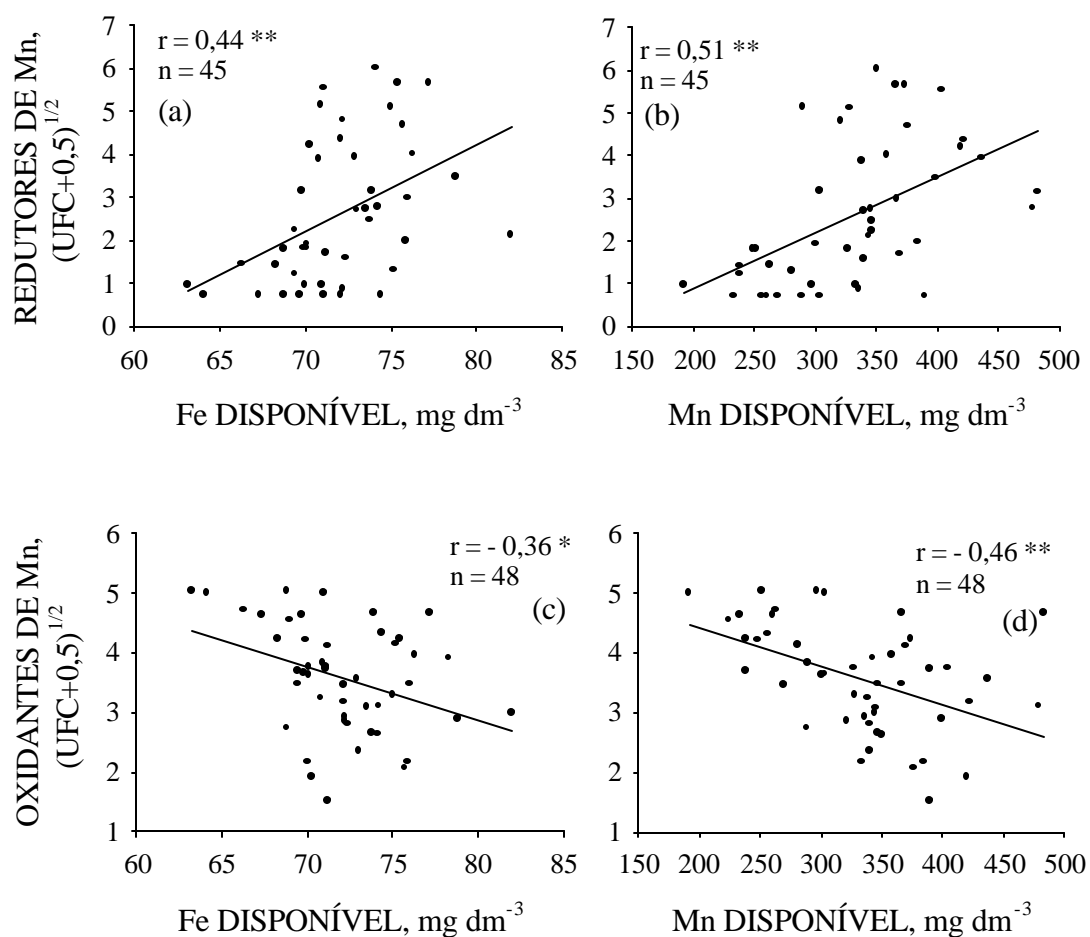


Figura 13 - Correlações simples entre bactérias redutoras de Mn e disponibilidade Fe (a) e Mn (b) no substrato e entre bactérias oxidantes de Mn e disponibilidade de Fe (c) e Mn (d) no substrato.  $^{**} P < 0,01$ ;  $^{*} P < 0,05$ .

#### 8.4 Discussão

Embora as plantas do tratamento controle P2 tivessem apresentado maior desenvolvimento inicial em relação às micorrizadas, no final do experimento elas apresentaram, na média das doses de Si, biomassa semelhante à das plantas micorrizadas com *G. etunicatum* e inferior à das plantas micorrizadas com *G. macrocarpum* (Figura

1), portanto o objetivo de se obterem plantas micorrizadas e não micorrizadas com biomassa semelhante foi apenas parcialmente alcançado. A interação que houve com as doses de Si não pôde ser interpretada, pois não houve uma tendência lógica em função das doses. É de se esperar que esse comportamento seja casual, visto que tanto a disponibilidade de Si no substrato (Figura 8), quanto seu teor nas plantas não foram influenciados pelas doses de Si.

As plantas do tratamento controle P2 e controle P1 apresentaram teores finais de P semelhantes, porém significativamente menores que os encontrados nas plantas micorrizadas (Figura 2). Apesar disso, as plantas do tratamento controle P2 apresentaram atenuação da toxidez de Mn desde o início de seu desenvolvimento. Já as micorrizadas, apesar de inicialmente terem sofrido os efeitos negativos do excesso do Mn, no final do experimento apresentaram recuperação dos prejuízos em termos de produção de biomassa, evidenciando o papel protetor dos FMA em situações de excesso de Mn. Medeiros et al. (1995) observaram que plantas de sorgo micorrizadas apresentaram sintomas mais pronunciados de toxidez de Mn, porém a avaliação do experimento foi feita com apenas 43 dias, tempo que pode não ter sido suficiente para que a planta fosse beneficiada pela simbiose. Já Bethlenfalvay & Franson (1989) observaram que plantas de soja micorrizadas apresentaram menos sintomas de toxidez de Mn, inclusive com diminuição da concentração de Mn na parte aérea e raízes das mesmas. Apesar da atenuação da toxidez de Mn, sua concentração na parte aérea das plantas do tratamento controle P2 foi mais elevada que a observada nas plantas micorrizadas (Figura 4), o que é aparentemente contraditório. Daí surge a especulação de que mecanismos distintos possam estar ocorrendo nas duas situações, ou seja, efeito de diluição nas plantas do controle P2 e inativação do excesso de Mn no tecido das plantas micorrizadas pela maior concentração de P (Jones & Fox, 1978; Foy, 1984). O simples resultado da análise química dos tecidos não permite saber quanto do Mn estava ativo no interior da planta, visto que este expressa o teor total no extrato obtido da digestão ácida, a qual solubiliza qualquer forma de Mn inativo.

Os efeitos dos tratamentos de inoculação com FMA foram mais evidentes para os teores de Fe (Figura 3), que para os de Mn (Figura 4) na parte aérea

das plantas, sendo que os teores de Fe foram significativamente reduzidos nas plantas micorrizadas em comparação aos dois controles sem FMA. Esses dois elementos apresentam comportamento químico muito próximo e, portanto, podem ser afetados de maneira semelhante tanto no solo quanto na planta. Apesar disso, Fe e Mn são relacionados como íons concorrentes, sendo que o excesso de Mn geralmente induz à deficiência de Fe por inibição competitiva (Menten et al., 1981; Mukhopadhyay & Sharma, 1991). No entanto, a correlação entre teores de Fe e Mn na parte aérea foi positiva, embora com coeficiente de correlação ( $r$ ) menor que 0,45 (não apresentada). Correlações entre massa de material seco da parte aérea das plantas e teores de Fe e Mn na parte aérea e Mn nas raízes (Figura 11 a, b, c) foram negativas, possivelmente em consequência do efeito negativo do excesso desses metais sobre o desenvolvimento das plantas.

De modo contrário ao que foi observado para Fe e Mn na parte aérea, ou seja, diminuição do teor nas plantas micorrizadas, no substrato o comportamento foi oposto, com aumentos da disponibilidade do Fe (Figura 6) e do Mn (Figura 7), sem que esse fosse resultado de diminuição do pH (Figura 5). Nos dois casos o aumento da disponibilidade no substrato seguiu a seguinte ordem: controle P1 < controle P2 < *G. etunicatum* = *G. macrocarpum*. Apesar desses aumentos de disponibilidade no substrato, as concentrações na parte aérea foram menores, conforme apresentado anteriormente, o que mais uma vez evidencia a alteração da absorção desses metais em plantas micorrizadas. Embora com baixos coeficientes, foram observadas correlações simples significativas entre a disponibilidade de Fe e Mn e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn (Figura 13). As correlações foram negativas com o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn e positivas com o número de UFC de bactérias redutoras, o que indica o efeito biológico sobre a disponibilidade desses íons. É preciso ressaltar que as determinações de Fe e Mn disponíveis e do número de UFC de redutores e oxidantes foram feitas a partir de uma mesma amostra. Portanto, é preciso ter em mente que dois processos antagônicos atuaram sobre uma mesma variável, um contribuindo para o aumento da disponibilidade de Mn, outro contribuindo para a diminuição, o que pode ter resultado nos baixos

coeficientes de correlação encontrados, embora a tendência tenha sido clara e estatisticamente significativa.

O número de UFC de bactérias redutoras de Mn foi significativamente aumentado no substrato das plantas micorrizadas (Figura 9), justamente o oposto do que foi observado por Kothari et al. (1991). De modo contrário, o número de UFC de oxidantes de Mn foi reduzido no substrato das plantas micorrizadas (Figura 10). Esse estímulo ao número de redutores e redução do número de oxidantes pode estar relacionado com o aumento da disponibilidade de Fe e Mn, corroborando a tendência das correlações discutidas anteriormente (Figura 13). Apesar disso, houve diminuição dos teores de Fe e Mn na parte aérea das plantas micorrizadas, o que revela a complexidade dos fenômenos que regem esse comportamento nas plantas micorrizadas. Houve correlação negativa entre porcentagem de colonização radicular e teores de Mn na parte aérea e raízes (Figuras 12 a, b). Medeiros et al., (1995) também observaram correlação negativa ( $r = -0,55$ ) entre colonização micorrízica e concentração de Mn na parte aérea de sorgo, o que indica que maior colonização radicular está associada com menor concentração de Mn na parte aérea.

Sabe-se que a presença de micorriza pode influenciar de maneira diferenciada as diferentes comunidades microbianas do solo, as quais podem ser estimuladas ou reduzidas na presença de micorriza (Andrade et al., 1998). Além disso, também ocorrem interações entre os mais variados grupos microbianos, além dos FMA. A inibição do número de bactérias oxidantes de Mn na rizosfera das plantas micorrizadas pode ter sido decorrente do maior número de UFC de bactérias redutoras de Mn, a maioria identificada anteriormente como pertencente ao gênero *Streptomyces* (Nogueira et al., 2001). Os estreptomicetos são produtores de grande diversidade de metabólitos secundários, dentre os quais, antibióticos (Madingan et al., 1997). Portanto, não é difícil sugerir que a significativa redução no número de UFC de bactérias oxidantes de Mn, justamente nos tratamentos em que as redutoras foram estimuladas, tenha ocorrido pela inibição pelos estreptomicetos.

Frente a estas observações, resta saber qual relação existe entre o estímulo da comunidade de estreptomicetos e a presença de FMA. Sabe-se que a

rizosfera de plantas micorrizadas é mais ativa em relação às de plantas não micorrizadas, havendo maior produção de exsudatos tanto da micorriza quanto das hifas dos próprios FMA que podem servir de substrato para o crescimento de outros grupos de microrganismos (Lindermann, 1988; Paulitz & Lindermann, 1989; Andrade et al., 1997). Ademais, observou-se correlação positiva e significativa entre produção de MSPA das plantas e número de UFC de redutores de Mn (Figura 11 d), o que sugere que esse grupo de microrganismos foi estimulado na rizosfera das plantas metabolicamente mais ativas em virtude de seu maior crescimento. A significância ecológica de mudanças da comunidade microbiana devido à presença de micorriza é difícil de ser interpretada, mas muitas delas influenciam a nutrição e a produtividade das plantas e por isso precisam ser melhor avaliadas (Meyer & Linderman, 1986b).

Notou-se correlação negativa entre MSPA e pH no substrato (Figura 11 e), MSPA e Si disponível (Figura 11 f), bem como entre colonização radicular e pH do substrato (Figura 12 d). Esse comportamento é possivelmente resultante da maior absorção iônica nas plantas mais desenvolvidas, como as do controle P2. Com o maior desenvolvimento das plantas há em consequência maior absorção iônica, geralmente cátions, os quais são repostos por íons  $H^+$  para a manutenção do equilíbrio elétrico no interior das células, o que resulta na diminuição do pH do substrato (Marschner, 1995). Observando-se as Figuras 1 e 5, essa constatação parece contraditória. As plantas micorrizadas com *G. etunicatum* apresentaram, em geral, crescimento semelhante ao das plantas do controle P2, que por sua vez apresentaram menor crescimento em relação às plantas micorrizadas com *G. macrocarpum*. Apesar do crescimento semelhante ou maior das plantas micorrizadas em relação às do controle P2, o valor de pH no substrato em que as plantas micorrizadas foram cultivadas não diminuiu como observado no substrato do controle P2. Entretanto, as plantas micorrizadas apresentaram praticamente o dobro da concentração de P na parte aérea comparando-se com as plantas do controle P2 (Figura 2). Sendo o P absorvido na forma aniônica, é de se esperar que haja um equilíbrio entre os processos de acidificação e alcalinização na rizosfera das plantas micorrizadas como consequência da maior absorção de P.

Todo o Si adicionado foi fixado pelo substrato, já que a análise dos teores de Si disponível não revelou efeito das doses de Si adicionadas, mas apenas dos tratamentos de micorrização (Figura 8). Nesse caso, os tratamentos que propiciaram maior crescimento das plantas resultaram em diminuição do Si disponível, já que houve correlação negativa entre produção de biomassa pelas plantas e Si disponível no substrato (Figura 11f). Conforme Lima-Filho (1999), os principais drenos de Si no solo incluem a precipitação do Si em solução, formando minerais; a polimerização do ácido silícico; lixiviação; adsorção em óxidos e hidróxidos de Fe e Al; e absorção pelas plantas. Exceto lixiviação, todos esses mecanismos podem ter ocorrido nesse experimento, mas apenas a absorção pelas plantas ficou mais evidente, conforme Figura 11F. De acordo com McKeague & Cline (1963), a velocidade das reações de adsorção de Si ao solo é alta, especialmente na presença de minerais com superfícies altamente adsorventes, como no caso dos óxidos de Fe e Al. Entretanto, os valores encontrados de Si disponível estão coerentes com aqueles encontrados por Rajj & Carmargo (1973).

## 8.5 Conclusões

- A atenuação de toxidez de Mn pode ser obtida tanto pela adição extra de P quanto pela micorrização, mas os mecanismos envolvidos na atenuação parecem ser distintos;
- A disponibilidade de P e Fe está sujeita à atividade de bactérias oxidantes e redutoras;
- O grau de colonização radicular está relacionado inversamente com as concentrações de Mn na parte aérea e raízes das plantas;
- Todo o Si adicionado foi fixado pelo solo, o que não permitiu observar efeitos sobre a atenuação da toxidez de Mn.

## 9 CONCLUSÕES

- A micorrização atenuou a toxidez de Mn, mas nos casos de interação ineficiente entre o fungo e o hospedeiro e nas fases iniciais do estabelecimento da simbiose os sintomas foram agravados;
- A deposição de calose nas folhas foi um sensível indicador da atenuação da toxidez de Mn nas plantas micorrizadas;
- O efeito da micorrização das plantas sobre a alteração da comunidade de bactérias oxidantes e redutoras de Mn e seus efeitos sobre disponibilidade do Mn no substrato foi mais importante no solo argiloso. Praticamente não ocorreu atividade de bactérias redutoras de Mn no solo arenoso, sendo que para as oxidantes a ordem de grandeza foi a mesma nos dois tipos de solo;
- A micorrização resultou em aumento da concentração de Si apenas nas raízes das plantas de um dos experimentos. Não foi possível estabelecer relação entre teores de Si nas plantas micorrizadas e a atenuação dos sintomas de toxidez de Mn. A adição de Si solúvel ao solo argiloso resultou em sua rápida adsorção;
- A atenuação da toxidez de Mn não foi apenas um efeito de diluição causado pelo maior crescimento das plantas micorrizadas, mas por fatores intrínsecos à presença do fungo micorrízico;
- O Fe, assim como o Mn, também sofre alterações quanto a sua disponibilidade no substrato e absorção pelas plantas micorrizadas. Embora a disponibilidade no substrato e a concentração nas raízes geralmente sejam aumentadas na presença de micorriza, na parte aérea as concentrações são menores;
- A disponibilidade de Mn no substrato argiloso pode ser aumentada ou diminuída pela presença de micorriza, mas sua concentração foi sempre menor na parte

aérea e raízes dessas plantas. No solo arenoso a disponibilidade de Mn não é alterada em função da micorrização, mas sua concentração pode ser diminuída na parte aérea dessas plantas;

- No solo argiloso parece haver maior influência de fatores biológicos controlando a disponibilidade e absorção de Mn pelas plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculation type. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.32, p.631-639, 1981.
- ABOUL-NASR, A. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by *Bacillus micoides* on flax. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v. 41, p. 261-270, 1996.
- ALLEN, M.F. Modeling arbuscular mycorrhizal infection: Is % infection an appropriate variable? **Mycorrhiza**, v. 10, p. 255-258, 2001.
- ALTEN, H. von; LINDERMAN, A.; SCHOENBECK, F. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. **Mycorrhiza**, v. 2, p. 167-173, 1993.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMES, R.N.; REID, C.P.P.; INGHAM, E.R. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 96, p. 555-563, 1984.
- ANDRADE, G.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, v. 202, p. 79-87, 1998.
- ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G. et al. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 192, p. 71-79, 1997.

- ANDRADE, G.; AZCÓN, R.; BETHLENFALVAY, G.J. A rhizobacterium modifies plant and soil responses to the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied Soil Ecology**, v. 2, p. 195-202, 1995.
- ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap. 14, p. 351-367.
- ARINES, J.; VILARIÑO, A. Use of nutrient: phosphorus ratios to evaluate the effects of vesicular arbuscular mycorrhiza on nutrient uptake in unsterilized soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 8, p 293-297, 1989.
- ARINES, J.; PORTO, M.E.; VILARIÑO, A. Effect of manganese on vesicular-arbuscular mycorrhizal development in red clover plants and on soil Mn oxidizing bacteria. **Mycorrhiza**, v. 1, p. 127-131, 1992.
- ARINES, J.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. **New Phytologist**, v. 112, p. 215-219, 1989.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular micorrizas. **Transactions of British Mycological Society**, v. 84, p. 536-537, 1985.
- BATAGLIA, O.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C.; GALLO, J.R. **Análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1978. 35 p. (IAC. Circular, 87).
- BETHLENFALVAY, G.J.; FRANSON, R.L. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 12, n. 8, p 953-970, 1989.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; PACOVSKY, R.S. Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. **New Phytologist**, v.90, p. 537-543, 1982a.

- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G.; STAFFORD, E. Interactions between nitrogen fixation, mycorrhizal colonization, and host-plant growth in the *Phaseolus-Rhizobium-Glomus* symbiosis. **Plant Physiology**, v. 70, p. 446-450, 1982b.
- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. et al. Mycotrophic growth and mutualistic development of host plant and fungal endophyte in an endomycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 68, n. 9, p. 43-54, 1982c.
- BLOEM, J.; BOLHUIS, P.R.; VENINGA, M.R. et al. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, R. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1995. p. 162-173.
- BOOGERD, F.C.; VRIND, J.P.M. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 489-494, 1987.
- BROMFIELD, S.M. Bacterial oxidation of manganous ions as affected by organic substrate concentration and composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 6, p. 383-392, 1974.
- BROMFIELD, S.M. The effect of manganese-oxidizing bacteria and pH on the availability of manganous ions and manganese oxides to oats in nutrient solutions. **Plant and Soil**, v. 49, p. 23-39, 1978.
- BROMFIELD, S.M.; SKERMAN, V.B.D. Biological oxidation of manganese in soils. **Soil Science**, v. 69, p. 337-347, 1950.
- CAMARGO, C.E.O. Melhoramento do trigo. III. Evidência de controle genético na tolerância ao manganês e alumínio tóxico em trigo. **Bragantia**, v. 42, p. 91-103, 1983.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fósforo-de-rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 9, p. 125-130, 1985.
- CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fósforo de rocha, em função do tipo de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p. 17-23, 1986.

- CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.3, p. 33-40.
- CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCÓN-AGUILAR, C; BAREA, J.M. (Ed.). Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAS, 4., Granada, 1994. **Proceedings**. Luxemburg: European Commission Report, 1996. p. 304-306.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.4, p. 41-58.
- CHÉRIF, M.; ASSELIN, A. BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 84, p. 236-243, 1994a.
- CHÉRIF, M.; MENZIES, J.G.; EHHRET, D.L. et al. Yield of cucumber infected with *Pythium aphanidermatum* when grown with soluble silicon. **HortScience**, v.29, p. 896-897, 1994b.
- CLARKSON, D.T. Factors affecting mineral nutrients acquisition by plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 77-115, 1985.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M; ARAUJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. cap.20, p.383-418.
- COLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro I. efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, p. 199-205, 1986.
- CRAWFORD, D.L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKY, M. (Ed.) **Actinomyces in biotechnology**, 1988. p. 433-459.

- DOUKA, C.E. Kinetics of manganese oxidation by cell-free extracts of bacteria isolated from manganese concretions from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.74-80, 1980.
- DUBININA, G.A. Functional role of bivalent iron and manganese oxidation in *Leptothrix pseudochraceae*. **Microbiology USSR**, v. 47, p. 631-636, 1979a.
- DUBININA, G.A. Mechanism of the oxidation of divalent iron and manganese by iron bacteria growing at a natural pH of the medium. **Microbiology USSR**, v. 47, p. 471-478, 1979b.
- ELLIOTT, C.L.; SNYDER, G.H. Autoclave-induced digestion for the colorimetric determination of silicon in rice straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1118-1119, 1991.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Produção de Informações, 1999. 412 p.
- EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 11-17, 1994.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Soil taxonomy**: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Washington, 1975. 745 p. (USDA. Agriculture Handbook, 436).
- FERNANDES, A.B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L. et al. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 11, p.101-108, 1987.
- FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; FORTIN, J.A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New Phytologist**, v. 141, p. 525-533, 1999.
- FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soils. In: ADAMS, F. (Ed). **Soil acidity and liming**. 2.ed. Madison: American Society of Agronomy, 1984. p. 57-97.

- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 511-566, 1978.
- FOY, C.D.; FLEMING, A.L.; SCHWARTZ, J.W. Opposite aluminium and manganese tolerances of two wheat varieties. **Agronomy Journal**, v. 65, p. 123-126, 1973.
- FRY, S.C. **The growing plant cell wall**: chemical and metabolic analysis. London: Longman Society of Technology, 1988. 472 p.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, p. 235-244, 1963.
- GHIORSE, W.C. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.38, p. 515-550, 1984.
- GHIORSE, W.C. The biology of manganese transforming microorganisms in soils. In: GRAHAM, R.D.; HANNAHAM, R.J., UREN, N.C (Ed.). **Manganese in soil and plants**. Boston: Kluwer Academic, 1988. cap.5, p. 75-85.
- GILBERT, E.S.; CROWLEY, D.E. Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenils in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 489-494, 1998.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GODO, G.H.; REISENAUER, H.M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Science Society of America Journal**, v. 45, p. 993-995, 1980.
- GRAHAM, J.; LEONARD, R.; MENGE, J.A. Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus-inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, v. 68, p. 648-652, 1981.
- GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G.; MENGE, J.A. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. **New Phytologist**, v. 91, p. 183-189, 1982.

- GROTHGE-LIMA, M.T. Interação cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), nodulação (*Bradyrhizobium japonicum*) e silício em soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]. Piracicaba, 1988. 58 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- HABTE, M.; SOEDARJO, M. Response of *Acacia mangium* to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in an oxisol. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 155-161, 1996.
- HARDIE, K. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **New Phytologist**, v. 101, p. 677-684, 1985.
- HARRIS, D.; PACOVSKY, R.S.; PAUL, E.A. Carbon economy of soybean-*Rhizobium-Glomus* associations. **New Phytologist**, v. 101, p. 427-440, 1985.
- HAYATSU, M.; HIRANO, M.; NAGATA, T. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. strain RC100. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 1015-1019, 1999.
- HAYMAN, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, v. 73, p. 71-80, 1974.
- HEENAN, D.P.; CAMPBELL, C.; Soybean nitrate reductase activity influenced by Mn nutrition. **Plant Cell Physiology**, v. 21, p. 731-736, 1981.
- HEGGO, A.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 865-869, 1990.
- HEINTZE, J.G. Manganese phosphate reactions in aqueous systems and the effects of application of monocalcium phosphate on the availability of manganese to oats in alkaline fan soil. **Plant and Soil**, v. 24, p. 407-423, 1968.
- HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. II. Deposition of oxidized manganese in plant tissues. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 33, p. 595-606, 1987.

- HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 34, p. 65-73, 1988.
- HORST, W.J. The physiology of manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAHAM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.) **Manganese in soil and plants**. Boston: Kluwer Academic, 1988. cap.12, p. 175-188.
- HORST, W.J.; MARSCHNER, H. Effect of silicon on manganese tolerance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 50, p. 287-303, 1978.
- HUBER, D.M.; GRAHAM, R.D. Techniques for studying nutrient disease interactions. In: SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Ed.) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Saint Paul: APS Press, 1992. p. 204-214.
- HUBER, D.M.; McCAY-BUIS, T.S. A multiple component analysis of the take-all disease of cereals. **Plant Disease**, v. 77, p. 434-447, 1993.
- HUBER, D.M.; WILHELM, N.S. The role of manganese in disease resistance. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.) **Manganese in soil and plants**. Boston: Kluwer Academic, 1988. cap.11, p. 155-174.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. et al. Fixação biológica de nitrogênio em soja. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília:Embrapa, SPI. 1994. p. 9-90.
- JONES, J.P.; FOX, R.L. Phosphorus nutrition of plants influenced by manganese and aluminum uptake from an oxisol. **Soil Science**, v. 126, p. 230-236, 1978.
- KATAOKA, M.; UEDA, K.; KUDO, T. et al. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, p. 249-255, 1997.
- KAUSS, H. Fluorometric measurement of callose and other 1,3- $\beta$ -Glucans. In: LINKENS, H.F.; JACKSON, J.F (Ed.) **Modern methods of plant analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p. 127-137.

- KLUTHCOUSKI, J; NELSON, L.E. Variations in the manganese concentrations in soybean trifoliate. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 10, p. 1299-1310, 1979.
- KOOMEN, I.; McGRATH, S.P.; GILLER, I. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 871-873, 1990.
- KORNDÖRFER, G.H.; COELHO, N.M.; SNYDER, G.H.; MIZUTANI, C.T. Avaliação de métodos de extração de silício em solos cultivados com arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p.101-106, 1999.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytologist**, v. 116, p. 637-645, 1990.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 117, p. 649-655, 1991.
- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 12, p. 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. **Plant and Soil**, v. 129, p. 283-289, 1990.
- LI, X.L.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. **Plant and Soil**, v. 136, p. 41-48, 1991.
- LIMA-FILHO, O.F.; GROTHGE-LIMA, M.T.; TSAI, S.M. **O silício na agricultura**. Piracicaba: Potafós, 1999. p. 1-7 (Informações Agronômicas, 87).

- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rizosphere microflora: the micorrizosphere effect. **Phytopatology**, v. 78, p. 366-371, 1988.
- LINDERMAN, R.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: BETHLENFALFAY, G.; LINDERMAN, R.G. (Ed.) **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. cap. 3, p. 45-70.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.
- LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, S. et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 554-568, 1998.
- LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, 129, p. 1-10, 1990.
- MA, J.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth and phosphorus uptake of rice. **Plant and Soil**, v. 126, p. 115-119, 1990a.
- MA, J.; TAKAHASHI, E. The effect of silicic acid in a P-deficient soil. **Plant and Soil**, v. 126. p. 121-125, 1990b.
- MA, J.; TAKAHASHI, E. Interaction between calcium and silicon in water-cultured rice plants. **Plant and Soil**, v. 148, p. 107-113, 1993.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 1980. 251 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.
- MAMO, T.; KILLHAM, K.S. Effect of soil liming and vesicular-arbuscular-mycorrhizal inoculation on the growth and micronutrient content of the teff plant. **Plant and Soil**, v. 102, p. 257-259, 1987.
- MANDINGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p.

- MARSCHNER, H. Mechanism of manganese acquisition by roots from soils. In: GRAHAM, R.D.; HANNAN, R.J.; UREN, N.C. (Ed.) **Manganese in Soil and Plants**. Boston: Kluwer Academic, 1988. cap. 13, p.191-204.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 159, p.89-102, 1994.
- MARSCHNER, P.; ASCHER, J.S.; GRAHAM, R.D. Effect of manganese-reducing rhizosphere bacteria on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and on manganese uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, p. 33-38, 1991.
- MARSCHNER, H.; OBERLE, H.; CAKMAK, I. et al. Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. **Plant and Soil**, v. 124, p. 211-219, 1990.
- McGEE, P.A. Alteractions of growth of *Solanum opacum* and *Plantago drumondii* and inhibition of regrowth of hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi from dried root pieces by manganese. **Plant and Soil**, v. 101, p. 227-233, 1987.
- McKEAGUE, J.A.; CLINE, M.G. Silica in soil solutions. II. The adsorption of monosilicic acid by soil and by other substances. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 43, p. 83-95, 1963.
- MEDEIROS, C.A.B.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R. Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, v. 18, p. 201-217, 1995.
- MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas I. Método empregado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 53-58, 1999.
- MEMON, A.R.; CHINO, M.; HARA, K. et al. Microdistribution of manganese in the leaf tissues of different plant species as revealed by X-ray microanalyzer. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 225-232, 1981.

- MENTEN, J.O.M.; MALAVOLTA, E.; SABINO, J.C. et al. Anomalia do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) semelhante à virose, causada por toxidez de manganês. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 179-185, 1981.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, p. 185-190, 1986a.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, p. 191-196, 1986b.
- MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth of soybean plants in a solution culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 31, p. 625-636, 1985.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MARTIN-NETO, L. Provável mecanismo de liberação de manganês no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 725-731, 1993.
- MOHAMMAD, M.J.; PAN, W.L.; KENNEDY, A.C. Wheat responses to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal inoculation of soils from eroded toposequence. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, p.1086-1090, 1995.
- MUKHOPADHYAY, M.J.; SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **The Botanical Review**, v. 57, p. 117-149, 1991.
- NAVARRO, R.B. Níveis de manganês na germinação de esporos e estabelecimento de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja (*Glycine max* L. (Merril)). Piracicaba, 1989. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- NEALSON, K.H.; TEBO, B.M.; ROSSON, R.A. Occurrence and mechanisms of microbial oxidation of manganese. **Advances in Applied Microbiology**, v.33, p. 279-318, 1988.
- NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF. 1996. p. 135-174.

- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 329-338, 2000.
- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; HAMPP, R. Induced changes on mycorrhizal soybean metabolism under manganese stress (compact disc). In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 25., Santa Maria, 2000. **FERTBIO 2000**: trabalhos. Santa Maria: SBCS/SBM, 2000.
- NOGUEIRA, M.A.; PACOVSKY, R.S.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e sua relação com a eficiência simbiótica. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 24., Caxambu, 1998. **Resumos**. Caxambu: SBCS, 1998. p. 806.
- NOGUEIRA, M.A.; PACOVSKY, R.S.; CARDOSO, E.J.B.N. Alteração da eficiência micorrízica em soja em função do substrato de cultivo (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., Brasília, 1999. Brasília: SBCS/EMBRAPA, 1999.
- NOGUEIRA, M.A.; NEHLS, U.; CARDOSO, E.J.B.N. et al. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de Mn por soja e identificação de bactérias redutoras e oxidantes de Mn. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., Londrina, 2001. **Resumos**. Londrina: SBCS, 2001. p. 81.
- PACOVSKY, R.S. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans, **Plant and Soil**, v. 95, p. 379-388, 1986.
- PACOVSKY, R.S.; FULLER, G. Mineral and lipid composition of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 733-746, 1988.
- PACOVSKY, R. S.; FULLER, G.; PAUL, E.A. Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in sorghum. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, p. 525-531, 1985.
- PARALES, R.E.; DITTY, J.L.; HARWOOD, C.S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and

- trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4098-4104, 2000.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; HOSHIKA, E. Crescimento, nutrição e produção de soja inoculada com populações de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p. 151-156, 1990.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H.et al. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 12, p.25-31, 1988.
- PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 113, p. 37-45, 1989.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, A.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.
- POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v.5, p. 119-124, 1994.
- QUAGGIO, J.A.; MASCARENHAS, H.A.A.; BATAGLIA, O.C. Resposta da soja à aplicação de doses crescentes de calcário em Latossolo roxo distrófico de cerrado. II. Efeito residual. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 6, p. 113-118, 1982.
- RAIJ, B. van; CAMARGO, O.A. Sílica solúvel em solos. **Bragantia**, v.32, p. 223-236, 1973.
- RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 31 p. (IAC. Boletim Técnico, 81).

- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 285 p. (IAC. Boletim Técnico, 100).
- RAMOS, C.P.; FOSTER, G.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: Description of a *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 46-53, 1997.
- RENGEL, Z. Root exudation and microflora populations in rizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. **Plant and Soil**, v. 196, p. 255-260, 1997.
- RENGEL, Z.; GUTTERIDGE, R.; HIRSCH, P. et al. Plant genotype, micronutrient fertilization and take-all infection influence bacterial populations in the rhizosphere of wheat. **Plant and Soil**, v. 183, p. 269-277, 1996.
- RIDGE, E.H.; ROVIRA, A.D. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. **New Phytologist**, v. 70, p. 1017-1026, 1971.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMUELS, L.; GLASS, A.D.M.; EHRET, D.L. et al. Mobility and deposition of silicon in cucumber plants. **Plant and Cell Environment**, v. 14, p. 485-492, 1991.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.
- SAS INSTITUTE. **Procedure guide for personal computers**. Release 6.11. 5ed. Cary, 1991.
- SCHENK, S.; DECKER, K. Horizontal gene transfer involved in the convergent evolution of the plasmid-encoded enantioselective 6-hydroxynicotine oxidases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 178-186, 1999.

- SCHUBERT, A.; MARZACHI, C.; MAZZITELLI, M. et al. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol & Schenck. **New Phytologist**, v. 107, p. 183-190, 1987.
- SISTANI, K.R.; SAVANT, N.K.; REDDY, K.C. Effect of rice hull ash silicon on rice seedling growth. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 195-201, 1997.
- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n. 39, p. 221-244, 1988.
- SPARROW, L.A.; UREN, N.C. Oxidation and reduction of Mn in acidic soils: effect of temperature and soil pH. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 143-148, 1987.
- STACKEBRANDT, E.; WITT, D.; KEMMERLING, C. et al. Designation of streptomycetes 16S and 23S rRNA-based target region of oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1468-1477, 1991.
- SYLVIA, D. M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 39-43, 1988.
- SYLVIA, D. M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Methods in Microbiology**, v. 24, p. 54-65, 1992.
- SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. cap. 5, p. 101-124.
- TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 476-479, 1996.
- TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers**. 4.ed. New York: Macmillan, 1985. 754 p.

- TRINDADE, A.V.; VILDOSO, C.I.A.; MUCHOVEJ, R.M. et al. Interação de composto de lixo urbano e fungos micorrízicos na nutrição e crescimento do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 20, p. 199-208, 1996.
- UREN, N.C.; ASHER, C.J.; LONGNECKER, N.E. Techniques for research on manganese in soil-plant systems. In: GRAHAM, R.D.; HANNAN, R.J.; UREN, N.C. (Ed.) **Manganese in Soil and Plants**. Boston: Kluwer Academic, 1988. cap. 20, p. 309-328.
- VALLAEYS, T.; ALBINO, L.; SOULAS, G. et al. Isolation and characterization of a stable 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacterium, *Variovorax paradoxus*, using chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1073-1076, 1998.
- WILD, A. **Russel's soil conditions and plant growth** 11.ed. London: Longman, 1988. 991 p.
- WILHELM, D.M.; GRAHAM, R.D. ROVIRA, A.D. Control of Mn status and infection rate by genotype of both host and pathogen in the wheat take-all interaction. **Plant and Soil**, v. 123, p. 267-275, 1990.
- WILLIAMS, D.E.; VLAMIS, J. The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solutions. **Plant Physiology**, p. 404-409, 1957.
- WISSEMEIER, A.H.; HORST, W.J. Callose deposition in leaves of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) as a sensitive response to high Mn supply. **Plant and Soil**, v. 102, p. 283-286, 1987.
- WISSEMEIER, A.H.; HORST, W.J. Simplified methods for screening cowpea cultivars for manganese leaf-tissue tolerance. **Crop Science**, v. 31, p. 435-439, 1991.
- WISSEMEIER, A.H.; HORST, W.J. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Plant and Soil**, v. 143, p. 299-309, 1992.

- WISSEMEIER, A.H.; DIENING, A. HERGENRÖDER, A. et al. Callose formation as parameter for assessing genotypical plant tolerance of aluminium and manganese. **Plant and Soil**, v. 146, p. 67-75, 1992.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.
- YOST, R.S.; FOX, R.L. Influence of mycorrhizae on the mineral contents of cowpea and soybean grown in an oxisol. **Agronomy Journal**, v. 74, p.475-481, 1982.