

DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
EM TRÊS ESPÉCIES DE PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS SOB NÍVEIS DE
FÓSFORO

VÂNIA FELIPE FREIRE GOMES

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA
CARDOSO

Tese apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, da 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
Abril- 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Gomes, Vânia Felipe Freire

Desenvolvimento de fungos micorrizicos arbusculares em três espécies de porta-enxertos citricos sob níveis de fósforo / Vânia Felipe Freire Gomes. - - Piracicaba, 1997.

89 p. : il.

Tese (doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Adubação fosfatada 2. Fósforo 3. Fruta cítrica 4. Fungo micorrizico 5. Micorriza 6. Nutrição vegetal 7. Porta-enxerto I. Título

CDD 634.3

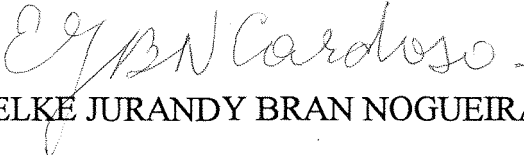
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EM TRÊS ESPÉCIES DE PORTA-ENXERTOS
CÍTRICOS SOB NÍVEIS DE FÓSFORO

VÂNIA FELIPE FREIRE GOMES

Aprovada em: 24 de Junho de 1997

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso	(ESALQ/USP)
Prof. Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello	(ESALQ/USP)
Profa. Dra. Siu Mui Tsai	(CENA/USP)
Prof. Dr. Raymond S. Pacovsky	(U.S.D.A./A.R.S.)
Prof. Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho	(IAC/Cordeirópolis)


Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

Orientadora

Ao meu esposo João Gomes Neto pelo incentivo,
dedicação e compreensão;

Aos meus filhos Andréa Cristina e Thiago, razão e
estímulo maior da minha vida.

DEDICO

À minha avó “Joana”
por tudo que me fez e pela falta que me faz.
 (“in memoriam”)

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida;

À Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Centro de Ciências Agrárias - CCA e do Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pela bolsa de estudos concedida;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, especialmente à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas na pessoa do seu coordenador, Professor Dr. Francisco Antonio Monteiro, pela oportunidade e atenção dispensadas durante o curso;

À Professora Dra. Elke J. B. N. Cardoso pela orientação e apoio, indispensáveis à realização deste trabalho;

Ao Dr. Raymond S. Pacovsky, pela revisão dos originais e pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Márcio Lambais pelo convívio e amizade;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Denise L. C. Mescolotti e Luiz Fernando Baldesin, pela colaboração, apoio e amizade dispensadas durante todo o decorrer da pesquisa;

Aos colegas de curso e companheiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ, em especial ao Eng^o. Agrônomo Rogério Melloni, pela colaboração e amizade;

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

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Porta-enxertos cítricos.....	03
2.2. Associação micorrízica arbuscular.....	05
2.3. O endófito.....	07
2.4. A dependência micorrízica.....	09
2.5. A depressão do crescimento da planta, induzida por colonização com fungos micorrízicos arbusculares.....	12
2.6. Efeito do fósforo na associação micorrízica.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Instalação do experimento.....	18
3.1.1. Substrato utilizado.....	18
3.1.2. Delineamento experimental.....	21
3.1.3. Sementeira.....	21
3.1.4. Espécies utilizadas como porta-enxerto.....	22
3.1.5. Inóculo.....	22
3.2. Colheita e avaliação do experimento.....	23
3.2.1. Massa do material seco da da parte aérea da planta.....	24
3.2.2. Altura das plantas.....	24
3.2.3. Diâmetro do caule.....	24

3.2.4. Conteúdo de nutrientes foliares.....	24
3.2.5. Conteúdo de fósforo disponível no solo.....	25
3.2.6. Colonização micorrízica arbuscular radicular.....	26
3.2.7. Comprimento do micélio externo ativo.....	26
3.2.8. Comprimento do micélio externo total.....	26
3.2.9. Análise estatística do experimento.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Matéria seca total da parte aérea.....	28
4.2. Altura das plantas.....	34
4.3. Diâmetro do caule das plantas.....	36
4.4. Colonização micorrízica arbuscular radicular.....	41
4.5. Comprimento do micélio externo ativo.....	44
4.6. Comprimento do micélio externo total.....	47
4.7. Quantidades de nutrientes totais no material foliar seco.....	50
4.7.1. Macronutrientes.....	50
4.7.2. Micronutrientes.....	63
4.8. Teor de fósforo disponível no solo.....	73
5. CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM TRÊS ESPÉCIES DE PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS SOB NÍVEIS DE FÓSFORO

Candidata: Vânia Felipe Freire Gomes

Orientadora: Elke J. B. N. Cardoso

RESUMO

Com a finalidade de verificar a relação entre a biomassa intra e extrarradicular dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) sobre o crescimento de porta-enxertos cítricos com 9 meses de idade, crescidos em substratos que receberam 5 doses de fertilizante fosfatado, foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação com delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3x3: 5 doses de P, (0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹ de P), três espécies utilizadas como porta-enxertos cítricos (tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”) e 2 espécies de FMA (*Glomus intraradices* e *Glomus clarum*) e um controle sem FMA, com 4 repetições por tratamento, perfazendo um total de 180 vasos.

A altura da parte aérea e o diâmetro do caule foram avaliados mensalmente. Seis meses após o transplante, as plantas foram colhidas e foram medidas a massa do material seco da parte aérea, a colonização radicular MA, o comprimento do micélio externo ativo e total, o teor de P disponível no solo pós-colheita e os macro e micronutrientes absorvidos pelas plantas.

Em doses baixas de P, a inoculação com fungos MA promoveu um incremento na altura, massa do material seco da parte aérea e diâmetro do caule, que foram reduzidos significativamente quase 20% a partir da dose 600 mg kg⁻¹

de P, sendo que essa redução foi mais pronunciada nas plantas inoculadas com o fungo MA *G. intraradices*.

Para uma aplicação de P em doses acima de 200 mg kg⁻¹, verificaram-se aumentos no comprimento do micélio externo total e reduções significativas no comprimento do micélio externo ativo. Esse fato pode ser uma das causas da redução no crescimento das plantas micorrizadas e cultivadas em substratos com elevados teores de P disponível. Esse processo pode ser explicado por uma drenagem de carbono exercida pelo micélio extrarradicular dos fungos MA, sobre os fotoassimilados da planta hospedeira, sem que contudo ocorra um benefício para a planta com relação ao aporte de nutrientes.

A partir da dose de 600 mg kg⁻¹ de P no substrato não houve colonização radicular micorrízica interna significativa, em nenhuma das espécies utilizadas como porta-enxertos estudadas e, a absorção dos macro e micronutrientes foi reduzida. Em doses baixas de P, *G. intraradices* foi o fungo que promoveu a maior colonização das raízes, quando associado à tangerineira “Cleópatra”. Em doses elevadas de P, o referido porta-enxerto foi o mais suscetível à redução no crescimento.

No substrato sem adição de P, a laranjeira “Caipira” na presença de *G. clarum* foi a combinação que mais absorveu os nutrientes disponíveis, enquanto que o limoeiro “Cravo” destacou-se em todas as doses de P.

Na presença de *G. intraradices*, não ocorreu antagonismo na absorção de P e Zn, mas pode ser observada uma menor absorção de Mn.

Os resultados deste trabalho reforçam a teoria de que o dreno excessivo de carbono exercido pelo micélio extrarradicular dos FMA sobre os fotoassimilados, em detrimento da planta hospedeira, seja talvez um dos mecanismos responsáveis pela redução no crescimento das espécies utilizadas como porta-enxertos cítricos cultivados em elevadas doses de P e na presença de fungos MA.

PHOSPHORUS LEVELS, ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND GROWTH OF THREE SPECIES USED LIKE ROOTSTOCKS

Candidate: Vânia Felipe Freire Gomes

Adviser: Elke J. B. N. Cardoso

SUMMARY

The relationship between the biomass of intraradical and extraradical hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth of citrus rootstocks under five levels of phosphate fertilizer was examined. This experiment was conducted under greenhouse conditions, with a completely randomized factorial design (5x3x3) with four replications per treatment. The factors were: five levels of P (0, 200, 400, 600 and 800 mg kg⁻¹), three citrus species used like rootstocks (*Citrus reshni*, *C. sinensis* and *C. limonia*), and three inoculation treatments: either, two species of AMF (*Glomus intraradices* and *Glomus clarum*) or a control without any AMF were used. A total of 180 plants were used in this experiment. The three citrus rootstocks were selected since they are from different types of citrus. *Citrus reshni* produces tangerines, while *C. sinensis* produces oranges and *C. limonia* produces lemons.

Plant height and diameter were measured and after 6 months plants were harvested. At that time, the dry mass, root colonization, and total active extraradical mycelium were quantified. In addition, soil available P after harvest, as well as the macronutrient and micronutrients absorbed by plants, were measured.

Plant height, dry mass and diameter that initially had been increased at low levels of P by AMF, were significantly reduced (approximately 20%) at levels over 600 mg P kg⁻¹, especially in citrus inoculated with *G. intraradices*. In the same way, the addition of P in levels over of 200 mg P kg⁻¹, increased significantly the total extraradical mycelium and reduced the active extraradical mycelium. This changes in AMF may be a cause of growth depression in mycorrhizal plants cultivated at high levels of the available P. This process may be attributed to carbon transfer from host to AMF without the relative benefit in plant nutrient uptake.

In P levels over 400 mg P kg⁻¹ there was no significant internal root colonization in any of the citrus species used like rootstocks. In addition, reductions in macronutrient and micronutrients uptake by the host were verified. At low levels of P, *G. intraradices* was the fungus with the greatest root colonization in *C. reshni* (tangerine) and at high levels of P, this fungus caused the greatest growth depression of this rootstock.

In the substrate without P, *C. sinensis* associated with *G. clarum* proved to be the best association at absorbing available nutrients. While *C. limonia*, (lemon) at all levels of P, was the citrus species used like rootstock that had the greatest nutrients uptake.

Host's growth in association with *G. intraradices* did not show any antagonistic effects between P and Zn uptake, and this fungus was responsible for lower Mn uptake, when associated with all three citrus rootstocks.

1. INTRODUÇÃO

As plantas cítricas, originárias da China, são propagadas em todas as partes do mundo que oferecem possibilidades para o seu cultivo com sucesso.

Introduzidas no Continente Americano, elas encontraram no Brasil e, em especial no Estado de São Paulo, as condições ideais de solo, clima e tecnologia para o seu cultivo, transformando o nosso país no maior produtor de citros e exportador de suco cítrico concentrado e congelado do mundo. O Estado de São Paulo representa 80% da produção de citros do Brasil.

A qualidade da muda cítrica é um dos fatores mais importantes na implantação de um pomar comercial, principalmente devido ao caráter perene da cultura. Estudos nutricionais com mudas de citros revelaram que, para a obtenção de porta-enxertos vigorosos são necessárias adubações elevadas e corretas, principalmente com P, já que esse nutriente exerce funções estruturais, de armazenamento e fornecimento de energia, de vital importância para as plantas cítricas. Como a grande maioria dos solos agricultáveis brasileiros é pobre em P e têm alto poder de fixação desse nutriente, é importante aumentar o aproveitamento de P pelas plantas e, atualmente, uma das técnicas que vem sendo estudada para isso, é a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares.

Estudos microbiológicos com plantas cítricas revelaram sua profunda dependência das associações micorrízicas arbusculares, especialmente em solos com baixa fertilidade. Um dos fatores decisivos para essa dependência é,

sem dúvida, o sistema radicular reduzido dos citros, extremamente deficiente em pelos absorventes.

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas que ocorrem entre as raízes das plantas e alguns fungos do solo, sua importância está vinculada principalmente à sua capacidade de aumentar a assimilação de nutrientes pelo sistema radicular da planta hospedeira, especialmente aqueles nutrientes com baixa mobilidade no solo.

Os benefícios relativos à colonização micorrízica arbuscular (MA) todavia decrescem geralmente, à medida que a disponibilidade do fósforo para a planta aumenta. A colonização então é inibida, e o crescimento da planta não é favorecido, podendo até ser reduzido pela micorrização. Pesquisas têm demonstrado que, porta-enxertos cítricos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares e cultivados sob elevados níveis de P, apresentam um efeito depressivo no crescimento.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as causas e os possíveis mecanismos que determinam o efeito de redução no crescimento de plantas cítricas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares, quando cultivadas em presença de doses elevadas de fertilizantes fosfatados. Uma das hipóteses levantadas como possível causa da redução no crescimento de citros, nessas condições, é o excessivo dreno de carbono, exercido pelo micélio dos fungos micorrízicos arbusculares sobre os fotoassimilados da planta hospedeira, sem que ocorra um benefício para a planta, em relação ao aporte de nutrientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Porta-enxertos cítricos

As plantas cítricas possuem sistemas radiculares altamente exigente em oxigênio, adaptando-se melhor aos solos sílico-argilosos, argilo-silicosos e arenosos, conforme recomenda Malavolta *et al.* (1974).

As plantas cítricas são propagadas, principalmente, a partir de mudas enxertadas e é da qualidade destas, que depende a produtividade dos pomares. Estudos visando a redução do período necessário para a produção de muda cítrica com alta qualidade têm sido relacionados com a inoculação de fungos MA. Cardoso *et al.* (1986) observaram que a inoculação de fungos MA selecionados em mudas cítricas cultivadas em substrato esterilizado pode economizar grande parte do adubo fosfático, necessário à produção das mudas não micorrízicas, obtendo-se plantas em ponto de enxertia, oito meses após a semeadura.

No trabalho acima citado, foram utilizados três porta-enxertos: a tangerineira “Cleópatra”, a laranjeira “Caipira” e o limoeiro “Cravo”. Para Pompeu Junior (1991) o limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* (L.) Osbeck) é o porta-enxerto mais utilizado pelos citricultores brasileiros, devido as suas qualidades de precocidade, produção elevada e constante, apesar de sua suscetibilidade à virose tristeza dos citros e ao declínio dos citros, que foram responsáveis por grandes crises na citricultura nacional. Atualmente, a Clorose Variegada dos Citros (CVC)

que, a exemplo das outras duas, tende a dizimar os pomares de citros é causada por uma bactéria (*Xylella fastidiosa*) transmitida por um inseto, está sendo motivo de pesquisas em diversas áreas agronômicas, inclusive na microbiologia do solo, no sentido de encontrar-se soluções alternativas que possam auxiliar na resolução dessa questão.

Segundo Teófilo Sobrinho (1972) o limoeiro “Cravo” é uma planta de porte médio, sendo bastante produtiva, apresentando folhas de tamanho médio, com pecíolo alado e superfície do limbo ondulada, de coloração verde-claro e espinhos curtos.

A tangerineira “Cleópatra” (*Citrus reshni* Hort. ex. Tanaka) é uma planta de porte grande, muito produtiva, sem espinhos, folhas pequenas, com pecíolo não alado e superfície do limbo lisa. As sementes são de tamanho pequeno a médio, em número de vinte a trinta por fruto, sendo poliembriônicas e com um bom poder germinativo. Muito mais resistente a doenças como a gomose e a verrugose, as plântulas apresentam um bom desenvolvimento no viveiro, tendo sido muito utilizadas como porta-enxerto na Flórida, Argentina, Filipinas e China (Salibe, 1974).

A laranjeira “Caipira” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), é uma planta que possui porte de médio a grande, com folhas de tamanho pequeno a médio, pecíolo médio a grande; margens inteiras de cor verde escuro, possuindo frutos de tamanho médio, com casca lisa, ricos em suco, coloração alaranjada intensa e sabor característico. No Brasil, foi cultivada inicialmente, visando substituir a laranjeira-pera, com baixa tolerância ao vírus da tristeza, sendo atualmente uma das opções alternativas que pode ser utilizadas pelos citricultores brasileiros.

2.2. Associação micorrízica arbuscular

As micorrizas compreendem associações mutualísticas simbióticas entre fungos do solo e radículas das plantas, nas quais os membros se beneficiam igualmente da interação (Zambolim & Siqueira, 1985).

O termo micorriza foi inicialmente utilizado pelo pesquisador alemão Frank em 1885, que postulou que os fungos, quando colonizavam raízes, exerciam a função de pelos absorventes, aumentando a absorção dos nutrientes e água do solo e, ainda, translocando-os para a planta (Meyer, 1973).

A importância dos fungos formadores das micorrizas arbusculares como simbiontes, deve-se à sua capacidade em aumentar a assimilação de diversos nutrientes, notadamente o fósforo, pelo sistema radicular da planta hospedeira (Fonseca *et al.*, 1994). Esse aumento na absorção de fósforo, e de outros nutrientes pelas plantas deve-se a um aumento na área de absorção, proporcionado pelas hifas do fungo micorrízico. Estima-se que com hifas de 2mm de comprimento e 25 μ m de diâmetro, a absorção é ampliada sessenta vezes, se a difusão for o fator limitante, na absorção (Bielecki, 1973).

A influência das associações micorrízicas arbusculares sobre a nutrição mineral da planta hospedeira pode ocorrer diretamente por aumentar o crescimento da planta, como resultado da maior absorção de nutrientes pelas estruturas dos fungos MA ou, indiretamente, por modificar as taxas de transpiração e a composição da microbiota da rizosfera. Para condições controladas Marschner & Dell (1994) encontraram que o micélio externo dos fungos MA, pode fornecer cerca de 80% do P, 25% do N e do Zn e 60% do Cu que a planta absorve.

Os efeitos sobre a absorção dos nutrientes são portanto os mais evidentes e consistentes dos efeitos das micorrizas sobre o crescimento e a produção das plantas e resultam principalmente da ação direta do fungo na

absorção de nutrientes, especialmente aqueles nutrientes relativamente imóveis, em especial o fósforo, o zinco e o cobre. Indiretamente, apresenta efeitos na mineralização e/ou solubilização de nutrientes da rizosfera, modificações na translocação, partição e eficiência de uso de nutrientes absorvidos pelas raízes ou micorrizas (Siqueira & Franco, 1988), além da otimização da fixação biológica do nitrogênio, aumentando a nodulação resultante do incremento na nutrição do fósforo, cobre, zinco, enxofre e outros nutrientes requeridos pelas plantas em quantidades mais elevadas, quando o processo de fixação de N₂ pela presença de *Rhizobium* está ativo (Lopes *et al.*, 1983).

Embora sejam de ocorrência generalizada na maioria das plantas superiores, as associações micorrízicas arbusculares não se instalam em algumas plantas como as Crucíferas e Chenopodiáceas, por razões ainda não completamente estabelecidas. Duc *et al.* (1989), estudando genética de plantas, descobriram mutantes de resistência genética à colonização pelos fungos formadores das micorrizas arbusculares em duas espécies de leguminosas.

As associações micorrízicas arbusculares são constituídas estruturalmente pelas raízes da planta hospedeira, pelas hifas externas do fungo que se estendem através da rizosfera e dos esporos e as estruturas do fungo no interior das raízes (arbúsculos e vesículas), que são oriundos de modificações do micélio (Lopes *et al.*, 1983).

Os métodos utilizados para constatar e quantificar a ocorrência dos fungos MA nas raízes baseiam-se na proporção de tecido do hospedeiro ocupado pelo fungo, o que pode ser observado em raízes coloridas pelo método de Phillips & Hayman (1970) que, mesmo diante de algumas adaptações, continua sendo o mais utilizado e serve de princípio básico para os demais métodos de coloração que estão sendo desenvolvidos e aprimorados; como os métodos de Read & Hodsgson (1976), Hepper (1977); Kormanik & McGraw (1982) entre outros.

2.3. O endófito

Os fungos formadores de micorrizas arbusculares estão distribuídos nos solos por todo o mundo. Eles formam associação micorrízica com a maioria das espécies de plantas e apresentam pequena especificidade com o hospedeiro.

Miranda *et al.* (1981), estudando a ocorrência dos fungos micorrízicos arbusculares em solos de cerrado no Distrito Federal, observou que eles ocorrem naturalmente no solo e que sua multiplicação, assim como o provável benefício da associação micorrízica na absorção de fósforo pelas plantas, estariam vinculados às condições adequadas de manejo e uso do solo. A constatação da presença dos fungos micorrízicos arbusculares no interior do córtex radicular apresenta uma certa dificuldade, uma vez que o fungo praticamente não causa alterações macroscópicas nas raízes e, além disso, sendo simbiote obrigatório, ele não cresce em meios de cultura. As estruturas internas à raiz constituem a fase intramatricial desses fungos, que é composta por hifas intra e intercelulares, arbúsculos e vesículas (Bonfante-Fasolo, 1984).

Para se constatar a ocorrência da colonização interna, as raízes têm que ser devidamente clarificadas, coradas (Phillips & Hayman, 1970) e observadas microscopicamente. A colonização externa através do desenvolvimento micelial extrarradicular, é de fundamental importância na determinação da capacidade dos fungos micorrízicos arbusculares em promoverem o aumento do crescimento das plantas. Todavia, além de se conhecer o comprimento total do micélio externo, é importante pesquisar-se a atividade desse micélio, uma vez que a absorção do P do solo é um processo ativo. As técnicas utilizadas para se estudar a sua distribuição e sua quantificação no solo ainda estão sendo aprimoradas (Sylvia 1992; Vilariño *et al.*, 1993; Cardoso Filho, 1994; Melloni, 1996).

A identificação dos fungos micorrízicos no solo é baseada na morfologia das estruturas fúngicas encontradas no solo, onde ocorre a fase extramatricial dos fungos, composta por esporos, esporocarpos e hifas. Essas estruturas podem ser extraídas do solo, através de peneiramento por via úmida, seguido pela centrifugação em sacarose (Gerdemann & Nicolson, 1963; Jenkins, 1964) e posterior observação microscópica do material retido nas peneiras. A classificação taxonômica das espécies é feita, principalmente com base nas características morfológicas dos esporos do fungo (Morton & Benny, 1990).

A afinidade entre a planta hospedeira e o endófito é o fator decisivo para o sucesso da associação. Segundo Graham *et al.* (1982), a magnitude do estímulo de crescimento produzido pelos fungos micorrízicos arbusculares está relacionada com a dependência micorrízica da planta hospedeira, que é determinada, em parte, pela eficiência do fungo simbiote.

Embora a literatura cite frequentemente a falta de especificidade entre os fungos MA e os hospedeiros, tem-se que admitir uma certa diferença de afinidade entre os porta-enxertos de citros e as espécies de fungos micorrízicos arbusculares, que tem sido observada em diversas condições de solo. Oliveira & Jesus (1987), trabalhando com dois tipos diferentes de porta-enxertos cítricos, observaram que a utilização de um solo natural em relação a um solo estéril, ambos sem adubação fosfatada, ocasionou a diminuição na resposta de crescimento de ambos os porta-enxertos, quando inoculados com fungos MA, sendo essa redução no crescimento mais acentuada no limoeiro “Cravo”, quando inoculado com *Glomus intraradices*, indicando que esse fungo, em associação com aquele porta-enxerto, não se apresenta como bom competidor com a microflora do solo. Supõe-se que, os microrganismos do solo influenciam a colonização das raízes pelos endófitos micorrízicos, pois sabe-se que, a inoculação de fungos MA só traz benefícios às plantas, se os mesmos forem mais eficientes que os endófitos nativos e, se conseguirem superar a ação de

organismos hiperparasitas e saprófitas do solo (Abbott & Robson, 1981; Cardoso *et al.*, 1986).

Apesar do efeito menor proporcionado pelo endófito selecionado, quando inoculado no solo natural, existem espécies que, mesmo introduzidas no solo não esterilizado apresentam elevada eficiência, Manjunath *et al.* (1983) observaram que a inoculação com *Glomus fasciculatum*, em espécies cítricas cultivadas em solos não esterilizados foi benéfica, mesmo na presença de endófitos nativos. Todavia, a maioria dos estudos sobre os efeitos da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e a adubação com P em citros, foram realizados em sementeira, não se conhecendo os efeitos dessas associações em campo, onde ocorre competição por nutrientes com fungos micorrízicos nativos e outros microrganismos do solo (Souza *et al.*, 1991).

A persistência do endófito micorrízico no solo depende das condições climáticas e edáficas do local. A formação da associação micorrízica, em condições não adequadas de umidade, luminosidade, temperatura ou elevados teores de nutrientes disponíveis pode resultar no estabelecimento de uma relação parasítica, com sérios prejuízos para a planta hospedeira (Bowen, 1980).

2.4. A dependência micorrízica

A dependência micorrízica (MD) é definida por Gerdemann (1975) como o grau em que a planta é dependente da condição micorrízica, para produzir e atingir o máximo de seu desenvolvimento, em um dado nível de fertilidade do solo.

O grau de dependência varia com as espécies vegetais e com as condições do meio ambiente, mais comumente com o clima e solo. Algumas plantas que se associam com fungos micorrízicos arbusculares são aparentemente micotróficas facultativas. Aumentando-se o nível de fertilidade do solo, a

dependência micorrízica decresce até que, chega-se a um ponto em que a planta torna-se imune à colonização (Zambolim & Siqueira, 1985). Essa afirmação, todavia, contradiz o efeito algumas vezes considerado parasítico dos fungos micorrízicos, demonstrado por alguns trabalhos citados por Lopes *et al.* (1983) que estudaram as associações micorrízicas em condições de solo devidamente adubado e corrigido.

O micotrofismo de uma determinada espécie vegetal constitui um fator importante na resposta à inoculação e está relacionada com a morfologia de seu sistema radicular. Plantas com raízes grossas, pouco ramificadas e com poucos pelos radiculares, por exemplo, apresentam elevada dependência micorrízica para atingir um desenvolvimento satisfatório. Estas espécies incluem a cebola, mandioca, videira, o cafeeiro e citros, entre outras de interesse econômico e ecológico (Mosse, 1981; Lopes *et al.*, 1983).

Respostas satisfatórias em termos de desenvolvimento de plantas, têm sido obtidas em solos fumigados e inoculados com fungos micorrízicos arbusculares. Notadamente quando se utilizam plantas dependentes da condição micorrízica, a inoculação torna-se indispensável para lhes garantir um bom desenvolvimento (Hayman & Mosse, 1981; Menge, 1983).

A esterilização do solo que geralmente beneficia o desenvolvimento das plantas, devido às modificações químicas que causa no solo, especialmente aumentando o conteúdo de NH_4^+ e promovendo a eliminação de patógenos (Domergues *et al.*, 1979), pode ser um fator limitante ao desenvolvimento de plantas altamente dependentes da condição micorrízica, em solos com baixa fertilidade. A inoculação da planta com fungos micorrízicos, nesses casos, pode ser favorecida e, isso pode ser atribuído principalmente à menor competição com outros microrganismos do solo (Islam, 1977).

Mosse *et al.* (1969), trabalhando com plantas inoculadas em sementeira esterilizada, verificaram que, após o transplântio para um solo não

esterilizado, as plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares cresceram mais do que as plantas não inoculadas. Afirmam ainda, que a incorporação em um solo não esterilizado pode beneficiar o crescimento das plantas, quando a comunidade de endófitos nativos é pequena ou de baixa eficiência. Experimentos de vasos, com solos não esterilizados, têm sido usados como passo preliminar para a inoculação no campo, fornecendo informações sobre o estabelecimento do endófito e sua habilidade em utilizar o fósforo adicionado ao solo como fertilizante (Mosse , 1981; Cardoso *et al.*, 1986).

Para Marschner & Dell (1994) as micorrizas oferecem pouco benefício para as plantas que possuem outras adaptações para obter P do solo, tais como: raízes finas e fasciculadas e pelos radiculares longos. Portanto, há uma tendência, com relação à absorção de P, para que a dependência de plantas em micorrizas seja negativamente relacionada com parâmetros das raízes, tais como comprimento e superfície específica.

Pesquisas com plantas cítricas demonstram que essas plantas exibem um maior crescimento, quando são colonizadas com fungos micorrízicos do tipo arbuscular (Krikum & Levy, 1980; Manjunath *et al.*, 1983). Em geral considera-se que uma planta é muito dependente da micorriza, quando há resposta positiva à inoculação, independentemente do nível de P e acima do efeito do P. As vantagens mútuas dessa associação são expressas como uma maior disponibilidade dos nutrientes, especialmente o fósforo, para o porta-enxerto cítrico e no fornecimento de fotoassimilados para o endófito. (Hayman, 1982).

A dependência micorrízica do citros e a resposta favorável, dessas plantas à inoculação micorrízica foi demonstrada em trabalhos de diversos autores. Hatting & Gerdemann (1975) conduziram experimentos com citros e verificaram sintomas de enfezamento nas plantas de viveiros fumigados com brometo de metila, em relação às plantas de viveiros fumigados mas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. Todavia, a dependência micorrízica de

cultivares de citros pode ser muito diferenciada. Graham & Sylvertsen (1985) verificaram que as plantas cítricas com diferentes graus de dependência micorrízica, inoculadas com fungo micorrízico em ausência de P, demonstraram um desenvolvimento e morfologia similares ao das plantas que não foram micorrizadas, mas que receberam adubação com fósforo, fato que compara a eficiência da inoculação micorrízica como a de uma adubação fosfatada, mesmo quando as plantas exibem diferentes graus de dependência micorrízica.

De acordo com Cardoso *et al.* (1986), os fungos micorrízicos estimulam o desenvolvimento das plantas cítricas, principalmente na fase de mudas, podendo determinar incrementos de até cinco vezes na altura e de dezesseis vezes no material seco da parte aérea. Segundo os mesmos autores, o benefício da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, tornou-se mais evidente, quando se observou que as mudas de plantas cítricas inoculadas, em solo esterilizado, tiveram a época de enxertia reduzida para cerca de oito meses após a semeadura.

2.5. A depressão do crescimento da planta induzida por colonização com fungos micorrízicos arbusculares

O efeito depressivo do crescimento em planta micorrizada, induzido por altas doses de P no solo, tem sido verificado em várias espécies de plantas (Menge *et al.*, 1978; Hall *et al.*, 1984; Cardoso *et al.*, 1986; Antunes & Cardoso, 1991).

Entre as diversas teorias propostas para explicar esse efeito, está a competição entre a planta hospedeira e o fungo micorrízico arbuscular por carboidratos, o que provocaria um dreno excessivo de carbono da planta para a manutenção e o crescimento das estruturas fúngicas (Buwalda & Goh, 1982; Peng *et al.*, 1993). Essa competição por fotoassimilados entre a planta hospedeira e o

fungo também foi estudado por Pang & Paul (1980), que observaram que a biomassa de fungos micorrízicos arbusculares no interior das raízes pode representar até 17% do material seco das raízes, o que sugere um gasto maior de energia pelas raízes micorrizadas em relação às não micorrizadas, para a manutenção das estruturas dos fungos MA (Peng *et al.*, 1993). Fatores tais como a toxidez provocada pela concentração excessiva de P, contaminação com parasitas do solo, introduzidos com os fungos micorrízicos, além dos aumentos excessivos na absorção de macro e micronutrientes, provocando alterações nas características químicas do solo, foram considerados, para tentar se explicar o efeito da redução do crescimento das plantas cítricas micorrizadas (Antunes & Cardoso, 1991).

Estudos sobre a cinética de absorção do P em raízes de plantas micorrizadas poderiam auxiliar a esclarecer se o aumento na absorção do P do solo pelas plantas micorrizadas é devido somente ao aumento da superfície de absorção proporcionado pela extensão das hifas do fungo MA ou/e devido a uma maior afinidade dos sítios de absorção de íons, pelo fungo da raiz colonizada ou ainda por ambos os mecanismos. Silveira & Cardoso (1990), estudando os efeitos de FMA nos parâmetros cinéticos de absorção radicular de ^{32}P pela soja, obtiveram um r valor menor de K_m para as raízes de soja colonizadas com endófitos micorrízicos, em relação às raízes não colonizadas. Todavia estudos a cinética de absorção de P em plantas cítricas colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares ainda são necessários para se explicar que tipo de alterações cinéticas de absorção de P limitaria sua disponibilidade para o metabolismo normal das plantas, resultando na redução no crescimento.

Marshner & Dell (1994) descrevem a redução do crescimento de plantas micorrizadas como uma mudança de mutualismo para o parasitismo, o qual ocorre pelo fato de que o gasto de carbono para a manutenção da simbiose nem sempre é compensado pelos seus efeitos positivos. Além disso, nas plantas

micorrizadas há uma elevação na concentração de P por unidade de material seco, em relação às plantas não micorrizadas, resultando numa menor eficiência de utilização do P, o que pode levar também a um desbalanço na absorção de outros nutrientes, com um conseqüente prejuízo para o crescimento da planta.

Os mecanismos da redução do crescimento, induzidos por micorrizas arbusculares, ainda não estão bem explicados e, várias são as hipóteses propostas para elucidar o fenômeno. Uma outra hipótese que está sendo considerada e que atualmente pode ser estudada mais cuidadosamente, seria a do aumento do volume de micélio extramatricial total e concomitante redução de sua atividade o que, segundo Cardoso Filho (1994) poderia acarretar um efeito depressivo no crescimento das plantas.

2.6. Efeito do fósforo na associação micorrízica

Além da infectividade natural do solo, o nível de fertilidade, especialmente o teor de P disponível, desempenha um papel muito importante na resposta à inoculação micorrízica, pois a disponibilidade daquele nutriente afeta a formação e funcionamento da simbiose micorrízica (Siqueira *et al.*, 1984). Segundo estudos de Graham *et al.* (1982), o efeito do P do substrato sobre a micorrização ocorre principalmente na fase inicial de crescimento e expansão do micélio extrarradicular. Todavia, os mecanismos envolvidos no controle da colonização radicular pelo P são pouco conhecidos e motivo de grande parte da pesquisa micorrízica atual.

Abbott *et al.* (1984), estudando o efeito do P sobre a formação de hifas extrarradiculares do fungo micorrízico arbuscular *Glomus fasciculatum* no solo, observaram que o comprimento máximo das hifas do fungo MA formado, por grama de solo e por centímetro de raíze colonizada de trevo, ocorria em vasos que tinham recebido 1g de superfosfato (33 mg de P). A aplicação de níveis

mais elevados de superfosfato causou na redução da formação de hifas externas de *G. fasciculatum*, o que demonstra que a relação entre o comprimento de hifas do fungos MA formadas no solo e o comprimento das raízes colonizadas é claramente afetada pelas diferentes taxas de aplicação de P. Crush (1976) no entanto, constatou que a elevação nas doses de P estimulava o crescimento do micélio externo, mas que esse efeito reduzia o crescimento do hospedeiro, através da competição entre o fungo e a planta pelos fotoassimilados.

Miranda *et al.* (1984) observaram que a percentagem de colonização micorrízica em plantas de sorgo decrescia com o aumento da dose de P aplicada ao solo. E também, que os incrementos no rendimento do material seco e a absorção de fósforo pelas plantas colonizadas, ocorriam somente em níveis baixos de P disponível, cerca de 25 mg kg⁻¹ de solo. Para o solo natural, o rendimento obtido com essa dose, nas plantas inoculadas, foi equivalente ao que seria obtido com a dose 39 mg kg⁻¹ de P, em plantas não inoculadas. Isso representa um incremento potencial de 56% na eficiência do P aplicado. Em um trabalho posterior Miranda *et al.* (1989) ainda trabalhando com sorgo, inoculado com *Glomus macrocarpum* em doses baixas (0 a 25 mg de P kg⁻¹) e altas (250 mg de P kg⁻¹) de P, observaram uma redução no crescimento do micélio externo do fungo micorrízico na presença da dose de P mais elevada.

A adição de P ao solo diminui a percentagem do comprimento radicular colonizado pelo fungo micorrízico (Melloni, 1996) o que pode ser atribuído a alterações no balanço de P no interior da planta. Isso pode ser devido à redução na concentração de possíveis metabólitos fúngicos, como carboidratos solúveis e compostos amino-nitrogenados nas raízes, uma vez que os carboidratos solúveis e compostos aminados radiculares parecem ser responsáveis pelo crescimento do micélio externo do fungo MA. Todavia, plantas micorrizadas apresentaram uma maior concentração desses compostos aminados na raiz, do que as plantas não micorrizadas (Thomson *et al.*, 1986).

Schwab *et al.* (1983) compararam três estádios diferentes de formação do processo de colonização micorrízica no sorgo em dois níveis de P, e verificaram que o estágio mais influenciado pelo P foi o de formação do micélio externo do fungo. A partir dessas observações, concluíram que o crescimento micelial do fungo micorrízico foi reduzido na presença de níveis de P mais elevados.

Lambais & Cardoso (1990), testando o efeito da calagem e de dois níveis de P em *Stylosanthes* inoculado com fungos micorrízicos, observaram que na presença do cálcio, o efeito inibitório do P sobre a colonização micorrízica diminuía, que o aumento da percentagem de colonização aumentou a massa de material seco da parte aérea das plantas e que a correção do pH do solo foi mais eficiente para as plantas não micorrizadas, na presença de P.

Os efeitos da adição de P sobre a diminuição na taxa de colonização micorrízica são bastante conhecidos e, várias hipóteses têm sido propostas para explicar esse fenômeno (Siqueira *et al.*, 1984). Embora os mecanismos envolvidos não estejam completamente determinados, evidências sugerem que o P controla a colonização via planta (Menge *et al.*, 1978). Alguns desses possíveis mecanismos de controle são citados por Fernandes *et al.* 1987, em um trabalho, que avaliou o efeito do P sobre a eficiência simbiótica das endomicorrizas em milho e soja: 1) O envolvimento de enzimas como as fosfatases ácidas entre outras, controlando o estabelecimento da simbiose (Woolhouse, 1975); 2) Produção e translocação de carboidratos, onde tanto o aumento (Siqueira *et al.*, 1984) quanto a redução (Jasper *et al.*, 1979) destes nas raízes podem afetar o estabelecimento e desenvolvimento do fungo; 3) permeabilidade das membranas - por esse mecanismo, as membranas das raízes tornam-se permeáveis quando o nível de fósforo diminui, deixando escapar exsudatos que promovem a proliferação da microbiota da rizosfera. Dessa forma, o aumento dos exsudatos radiculares estimularia a população da rizosfera da planta e, conseqüentemente, da atividade

dos propágulos dos fungos MA, resultando num aumento na colonização MA (Graham *et al.*, 1982; Schwab *et al.*, 1991).

A elevação no nível de P pode aumentar a densidade radicular e diminuir a distancia que a hifa do fungo micorrízico, deve crescer no solo, para encontrar a raiz. Em experimentos utilizando fertilizantes fosfatados Abbott *et al.* (1984) observaram que aplicações elevadas de superfosfato reduziram a formação de micélio externo, e a relação entre o comprimento de micélio formado no solo e o comprimento de raiz colonizada foi claramente afetada pelas doses do superfosfato. A relação entre o comprimento do micélio de 3 espécies de fungos MA e a absorção de P, pelas raízes da planta hospedeira foi estudada por Jakobsen *et al.* (1992), que observaram que o comprimento do micélio externo dos fungos micorrízicos variou não apenas com a dose de P adicionada, mas também com a espécie do fungo utilizada. As medidas efetuadas mostram que o micélio de *A. laevis* foi o que mais cresceu, podendo se estender em solo livre de raízes por uma distância de até 11cm em 47 dias

Silva *et al.* (1991) estudando o efeito de diferentes fontes de P, sobre o desenvolvimento de *Gigaspora gigantea*, *in vitro*, concluíram que o efeito diferenciado no crescimento do fungo, diante das diversas fontes de P, ocorreu provavelmente devido à ação conjunta do P e dos íons acompanhantes como Ca, Mg e K, e não pela ação exclusiva do P.

Melloni (1996), trabalhando com mudas de plantas cítricas micorrizadas crescidas em substrato com doses elevadas de P, observou que havia uma redução no crescimento das plantas quando o nível do P no substrato era elevado e que essa redução poderia estar associada à diminuição do comprimento do micélio externo ativo e ao aumento do micélio externo total dos fungos micorrízicos envolvidos, o que promoveria maior desvio de fotoassimilados do hospedeiro para a formação deste último.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalação do experimento

A instalação e a manutenção do experimento ocorreu em casa-de-vegetação do Departamento de Ciência do Solo, localizada no Campus da Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz - ESALQ, em Piracicaba, São Paulo.

3.1.1. Substrato utilizado

Para esse experimento foi utilizado um substrato obtido a partir da mistura de um solo classificado como Areia Quartzosa da Série Paredão Vermelho e areia de rio (grossa) lavada, misturados na proporção 3:1 (v/v). O solo foi coletado na profundidade 0-20cm, na região de Piracicaba.

O substrato devidamente seco e peneirado foi submetido à autoclavagem à temperatura de 121°C, por um período de duas horas e sua utilização só ocorreu 2 semanas após esse processo.

Uma amostra do substrato foi retirada e submetida à análise química no Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ-USP (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades do substrato utilizado no experimento

Característica	Valores
pH(CaCl ₂)	4,0
M.O	2,0 (g dm ⁻³)
P	5,0 (mg dm ⁻³)
S-SO ₄	28,5 (mmol _c dm ⁻³)
K ⁺	0,5 (mmol _c dm ⁻³)
Ca ⁺²	7,0 (mmol _c dm ⁻³)
Mg ⁺²	2,0 (mmol _c dm ⁻³)
H ⁺ + Al ⁺³	34,0 (mmol _c dm ⁻³)
SB(Soma de Bases)	10,0 (mmol _c dm ⁻³)
T(Bases totais)	44,0 (mmol _c dm ⁻³)
V(Índice Sat.p/ Bases)	23 (%)
m(Sat. p/Al ⁺³)	44 (%)
B	0,48 (mg kg ⁻¹)
Cu	0,42 (mg kg ⁻¹)
Fe	66 (mg kg ⁻¹)
Mn	0,48 (mg kg ⁻¹)
Zn	3,8 (mg kg ⁻¹)
Na	4,6 (mg kg ⁻¹)

A partir dessa análise, o substrato foi corrigido e os fertilizantes usados foram misturados ao solo, de acordo com a recomendação de adubação utilizada para a cultura de citros (Antunes & Cardoso, 1991). Sendo a correção do pH realizada com calcário dolomítico PRNT 131, considerando-se 65% de saturação por bases.

A adubação de base com macronutrientes foi realizada de acordo com Antunes & Cardoso (1991), utilizando-se 50 mg kg⁻¹ de K (na forma de KCl), 45 mg kg⁻¹ de Mg (na forma de MgSO₄ .7H₂O), 46 mg kg⁻¹ de S e 40 mg kg⁻¹ de N (na forma de (NH₄)₂ SO₄) enquanto que os micronutrientes foram supridos através da adição de solução de micronutrientes de Hoagland (1950), sem Mn, utilizando-se 1,0 ml de solução por vaso de 15 em 15 dias, durante todo o decorrer do experimento. O fósforo (P), foi fornecido através do superfosfato triplo (SFT), cuja análise química é apresentada na Tabela 2, de acordo com os seguintes níveis: (0, 200 (7,76g de SFT/vaso), 400 (15,52g de SFT/vaso), 600 (23,28g de SFT/vaso) e 800 (31,04g de SFT/vaso) mg kg⁻¹ de substrato).

Cada parcela era constituída por um vaso de polietileno preto, contendo 8 kg de substrato e uma planta .

Tabela 2. Composição do super fosfato triplo (SFT) utilizado no experimento

Determinação	Solubilidade	(%)
Fósforo	P ₂ O ₅ (total)	47,20
	P ₂ O ₅ (água)	40,07
	P ₂ O ₅ (*CNA+água)	43,70
	P ₂ O ₅ (ác. cítrico)	40,85
Potássio	K ₂ O (água)	0,0
Cálcio	Ca (total)	15,40
Magnésio	Mg (total)	1,03
Enxofre	S (total)	0,04

*CNA: Citrato neutro de amônio

3.1.2. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido com um delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x3x5), sendo três tratamentos de inoculação (duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares e um controle não inoculado), três porta-enxerto e cinco níveis de P, com quatro repetições, totalizando 180 parcelas.

Os tratamentos foram distribuídos ao acaso em diferentes bancadas no interior da casa-de-vegetação e, quinzenalmente, foi realizada nova casualização entre as parcelas, de modo a tornar as condições experimentais mais homogêneas, eliminando-se, assim, qualquer necessidade de aplicação de fator de restrição à casualização.

3.1.3. Sementeira

A semeadura foi feita inicialmente em bandejas de semeadura que eram constituídas por caixas de madeira com dimensões de 45 x 45 x 15 cm, contendo areia de rio esterilizada, nas quais as plântulas foram mantidas. Recebendo adubação periódica com solução de Hoagland, sendo transplantadas, logo que atingiram o ponto ideal para a repicagem, ou seja, quando atingiram uma altura média de 6cm do colo até a gema apical. Sendo o tempo decorrido entre a semeadura e a germinação, cerca de 30 dias e o tempo decorrido entre a germinação e o transplante, que normalmente é de 60 dias, foi de 90 dias. Esse atraso ocorreu em função de se esperar a análise dos resultados de um experimento preliminar que serviram de base para a implantação deste experimento. Todavia, as plantas foram devidamente supridas com solução nutritiva de Hoagland, apresentando vigor excelente por ocasião do transplante, o que em nada comprometeu o do experimento.

3.1.4. Espécies utilizadas como porta-enxertos

As espécies utilizadas como porta-enxertos no experimento foram escolhidas em função de sua utilização pela maioria dos produtores de citros da região produtora de São Paulo (Limoeiro “Cravo”) e de trabalhos de pesquisa que vêm sendo feitos no Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ com a Laranjeira “Caipira” e com a tangerineira “Cleópatra”:

- Limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* (L.) Osbeck)
- Laranjeira “Caipira” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- Tangerineira “Cleópatra” (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka)

3.1.5. Inóculo

A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares foi procedida por ocasião do transplante da sementeira para o vaso definitivo. O inóculo utilizado constituiu-se de 20g de solo contendo raízes colonizadas e propágulos de cada uma das espécies fúngicas (número de esporos em quantidade acima da capacidade saturadora utilizada nas inoculações) que foram previamente multiplicadas em vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens* Stapf., pertencentes ao banco de inóculo do Laboratório de Microbiologia do Solo, da ESALQ-USP. Para os tratamentos-controle, utilizou-se a mesma quantidade de amostra de solo rizosférico de plantas não inoculadas.

As duas espécies fúngicas utilizadas foram escolhidas de acordo com pesquisas (Melloni, 1996; Melloni *et al.* 1996), realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ, nos quais foram estudadas espécies de fungos micorrízicos arbusculares que melhor se associavam com os três porta-enxertos de citros estudados.

Os tratamentos relacionados com inoculação foram:

- Plantas não inoculadas (amostra de rizosférico de plantas não inoculadas)
- Plantas inoculadas com *Glomus intraradices* Schenck & Smith
- Plantas inoculadas com *Glomus clarum* Nicolson & Schenck

A irrigação do experimento foi feita periodicamente com água destilada, mantendo-se a umidade do solo próxima da capacidade de campo. As condições climáticas na época em que foi conduzido o experimento foram: temperatura máxima de 32 °C e mínima de 13°C, umidade relativa média de 82 % e um fotoperíodo médio de 12, 5 horas de luz natural por dia.

3.2. Colheita e avaliação do experimento

O experimento teve duração de 180 dias, do transplântio das mudas da sementeira para os vasos, até o dia da colheita. A altura das plantas e o diâmetro do caule, foram medidos mensalmente, a partir do primeiro mês após o transplântio das plantas sendo a última avaliação feita por ocasião da colheita do experimento.

As plantas foram colhidas, separando-se a parte aérea das raízes, sendo acondicionadas em sacos de papel e de plástico, respectivamente. Parte do solo rizosférico, do qual foram retiradas as raízes, foi acondicionado em sacos de plástico. Em seguida, todo o material colhido foi enviado para o laboratório, onde foi preparado para as avaliações das seguintes variáveis: material seco da parte aérea, colonização micorrízica radicular, comprimento de micélio externo total, comprimento de micélio externo ativo, nutrientes no material seco foliar e o teor de fósforo no solo.

3.2.1. Massa do material seco da parte aérea da planta

Segundo Benincasa (1988), a massa do material seco é um dos parâmetros mais significativos para se avaliar o efeito de um determinado fator sobre o desenvolvimento da planta, pois mostra o aumento dos compostos na formação dos órgãos aéreos na planta, sem levar em consideração a entrada de água.

Para se obter a massa do material seco da parte aérea, o material foi colocado para secar em estufa de ventilação forçada a 65°C, permanecendo por aproximadamente 7 dias, até atingir o peso constante, após o que, foi pesado utilizando-se uma balança semi-analítica.

3.2.2. Altura das plantas

A medida da altura das plantas foi realizada mensalmente, com a utilização de fita métrica, e foi iniciada um mês após o transplântio das mudas , , para o vaso definitivo.

3.2.3. Diâmetro do caule

A medida do diâmetro das plantas, foi realizada mensalmente, com a utilização de paquímetro, de 5cm acima do colo da planta.

3.2.4. Conteúdo de nutrientes foliares

O preparo das amostras, a obtenção dos extratos e as determinações analíticas foram realizadas no Laboratório de Análise de Plantas do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ-USP .

A concentração dos nutrientes na parte aérea das plantas foi determinada a partir de extratos que foram preparados de acordo com metodologia adaptada por Sarruge & Haag (1974). A digestão sulfúrica foi utilizada para a obtenção do extrato para a determinação do nitrogênio, enquanto que a digestão nítrico-perclórica foi utilizada na obtenção dos extratos para as determinações do fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês e zinco.

O nitrogênio foi determinado pelo método semi-micro-Kjeldahl, fósforo por colorimetria vanado molíbdica, o potássio por fotometria de chama, o enxofre por turbidimetria, o cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica, toda essa metodologia está descrita em Malavolta *et al.* (1989).

A absorção total de nutrientes pelas plantas foi obtido a partir dos teores dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn) e do material seco da parte aérea. Os resultados foram expressos em mg planta⁻¹ para os macronutrientes e ug planta⁻¹ para os micronutrientes.

3.2.5. Conteúdo de fósforo disponível no solo

Para a determinação desta variável, o solo retirado dos vasos foi devidamente homogeneizado, seco em estufa a 40 °C até peso constante e logo em seguida o fósforo disponível foi determinado segundo o método da resina trocadora de íons (Raij & Quaggio, 1983).

3.2.6. Colonização micorrízica arbuscular radicular

Após a colheita das plantas, as raízes foram separadas e mantidas em solução conservadora FAA (13 ml de formaldeído 40%, 5 ml de ácido acético glacial e 200 ml de etanol 50%) até o momento da coloração. A constatação da colonização radicular pelos fungos micorrizicos, foi realizada através de observações microscópicas das raízes, após o processo de clarificação e coloração (Phillips & Hayman, 1970). A quantificação dessa colonização foi feita através do método de Giovannetti & Mosse (1980) e Bethlenfalvay *et al.* (1981).

3.2.7. Comprimento do micélio externo ativo

Para essa variável, foi usado o método da fluorescência induzida com diacetato de fluoresceína (FDA), descritos por Sylvia (1988), Cardoso Filho (1994) e modificado por Melloni (1996) para se extrair e quantificar o comprimento do micélio externo ativo no solo.

3.2.8. Comprimento do micélio externo total

A extração e quantificação do micélio extrarradicular total foi realizada seguindo-se as metodologias de Schubert *et al.* (1987), Sylvia (1992) e de Cardoso Filho (1994), modificadas por Melloni (1996).

3.3. Análise estatística do experimento

Os resultados do experimento foram analisados através de modelos matemáticos apropriados para o delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o nível de significância de 0,05 para o teste “F”.

As variáveis cujos resultados referentes às doses de P, apresentaram diferenças significativas entre si pelo teste “F” a 0,05 foram submetidos à análise de regressão.

Os resultados de percentagem de colonização radicular, foram normalizados pela transformação $\text{arco seno} \sqrt{x / 100}$, onde x é a taxa de colonização radicular. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05 de significância utilizando-se o programa estatístico SANEST (Univ. Fed. de Pelotas-RS), enquanto que os gráficos, equações matemáticas e os coeficientes de correlação foram feitos, utilizando-se o programa gráfico e estatístico EXCEL (Microsoft Corporation).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos neste trabalho em relação às variáveis: massa do material seco da parte aérea, altura das plantas, diâmetro do caule, colonização micorrízica radicular, comprimento de micélio ativo externo, comprimento de micélio total externo, teor de nutrientes no material foliar seco e o teor de fósforo disponível no solo pós-cultivo, são discutidos a seguir:

4.1. Massa do material seco total da parte aérea

Para a massa do material seco da parte aérea, houve efeito significativo nas interações, Porta-enxertos x Doses de P e Porta-enxertos x FMA (Tabela. 3)

Os valores médios obtidos através da análise da variância da variável massa do material seco da parte aérea das plantas estudadas encontram-se nas Tabelas 4 e 5.

A adubação com P e a inoculação com FMA foram eficientes em promover o aumento da massa do material seco da parte aérea de todos os porta-enxertos, quando eles foram cultivados em substrato natural sem adição de P (Figura 1). A adição do P ao substrato de cultivo das mudas cítricas tendeu inicialmente a elevar a massa do material seco da parte aérea (Tabela 4). Todavia, quando se associaram fungos MA, especialmente *G. intraradices*, às doses de P, notou-se uma redução da massa do material seco da parte aérea dos porta-enxertos, a partir da dose 600 mg kg^{-1} de P (Figura 1), com excessão para o porta-

Tabela 3. Valores de “P” (nível de significância) obtidos na análise de variância das variáveis: material seco parte aérea, altura das plantas e diâmetro do caule dos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Piracicaba, 1997

CAUSAS VARIAÇÃO	Massa do material seco da parte aérea	Altura das plantas	Diâmetro do caule
P-ENXERTO	0,00001*	0,00001*	0,00001*
DOSES P	0,00001*	0,00002*	0,00001*
FMA	ns	ns	ns
PEN X DOS	0,00001*	0,00001*	0,00002*
PEN X FMA	0,03776*	ns	ns
DOS X FMA	ns	0,00410*	0,00659*
PEN X DOS X FMA	ns	ns	ns

*: significante a 0,05 de probabilidade pelo teste “F”, ns: não significante. PEN: Porta-enxerto, DOS: Doses de P, P-ENXERTO: Porta-enxerto, FMA: Fungo micorrízico arbuscular.

Tabela 4. Efeito da inoculação dos FMA (*G. intraradices* (G.intr.), *G. clarum* (G. clar.) e S/F (sem fungo) sobre os valores da massa do material seco da parte aérea (g/planta), altura das plantas (cm) e diâmetro do caule (mm) na média de três espécies utilizadas como porta-enxertos cítricos, para os 5 níveis de P. Média de 4 repetições. Piracicaba, 1997.

Inoc./Doses	Material seco da parte aérea (g/planta)	Altura da planta (cm)	Diâmetro do caule (mm)
0 mg P kg ⁻¹			
S/F	0,03 a	7,38 a	1,52 b
G. intr	0,61 a	18,41 a	2,77 a
G. clar.	0,20 a	16,62 a	2,48 a
200 mg P kg ⁻¹			
S/F	6,73 a	49,95 a	5,46 a
G. intr.	6,01 a	46,83 a	5,56 a
G. clar.	5,26 a	45,00 a	5,51 a
400 mg P kg ⁻¹			
S/F	4,83 a	42,75 a	4,87 a
G. intr.	5,13 a	44,87 a	4,26 a
G. clar.	6,53 a	53,91 a	5,18 a
600 mg P kg ⁻¹			
S/F	10,44 a	64,75 a	6,10 a
G. intr.	9,13 a	57,54 a	5,79 a
G. clar.	8,58 a	56,58 a	5,29 a
800 mg P kg ⁻¹			
S/F	11,9 a	69,45 a	6,40 a
G. intr.	8,70 b	55,25 a	6,15 a
G. clar.	12,25 a	65,75 a	6,59 a

*Comparar letras na vertical, dentro da mesma dose de P. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 0,05 de significância, pelo teste de Tukey .

Tabela 5. Valores da massa do material seco da parte aérea (g/planta), altura das plantas (cm) e diâmetro do caule (mm) de três porta-enxertos cítricos: tangerineira “Cleópatra” (TAN), laranjeira “Caipira” (LAR) e limoeiro “Cravo” (LIM), na média dos 3 tratamentos de inoculação com fungos MA para os 5 níveis de P. Média de 4 repetições. Piracicaba, 1997.

Inoc./Doses	Material seco da parte aérea (g/planta)	Altura das plantas (cm)	Diâmetro do caule (mm)
0 mg P kg ⁻¹			
TAN	0,16 a	11,65 a	1,95 b
LAR	0,41 a	18,44 a	2,92 a
LIM	0,26 a	12,33 a	1,90 b
200 mg P kg ⁻¹			
TAN	5,16 b	49,58 a	4,16 b
LAR	4,25 b	34,45 b	6,18 a
LIM	8,60 a	57,75 a	5,79 a
400 mg P kg ⁻¹			
TAN	4,33 b	44,33 b	3,81 b
LAR	3,16 b	32,29 c	4,91 a
LIM	9,00 a	64,91 a	5,91 a
600 mg P kg ⁻¹			
TAN	6,58 b	55,45 b	4,18 b
LAR	6,45 b	43,08 c	6,19 a
LIM	15,15 a	80,33 a	6,80 a
800 mg P kg ⁻¹			
TAN	7,08 b	61,16 b	4,50 c
LAR	7,16 b	44,95 c	6,70 b
LIM	8,62 a	86,30 a	7,95 a

*Comparar letras na vertical, dentro da mesma dose de P. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey .

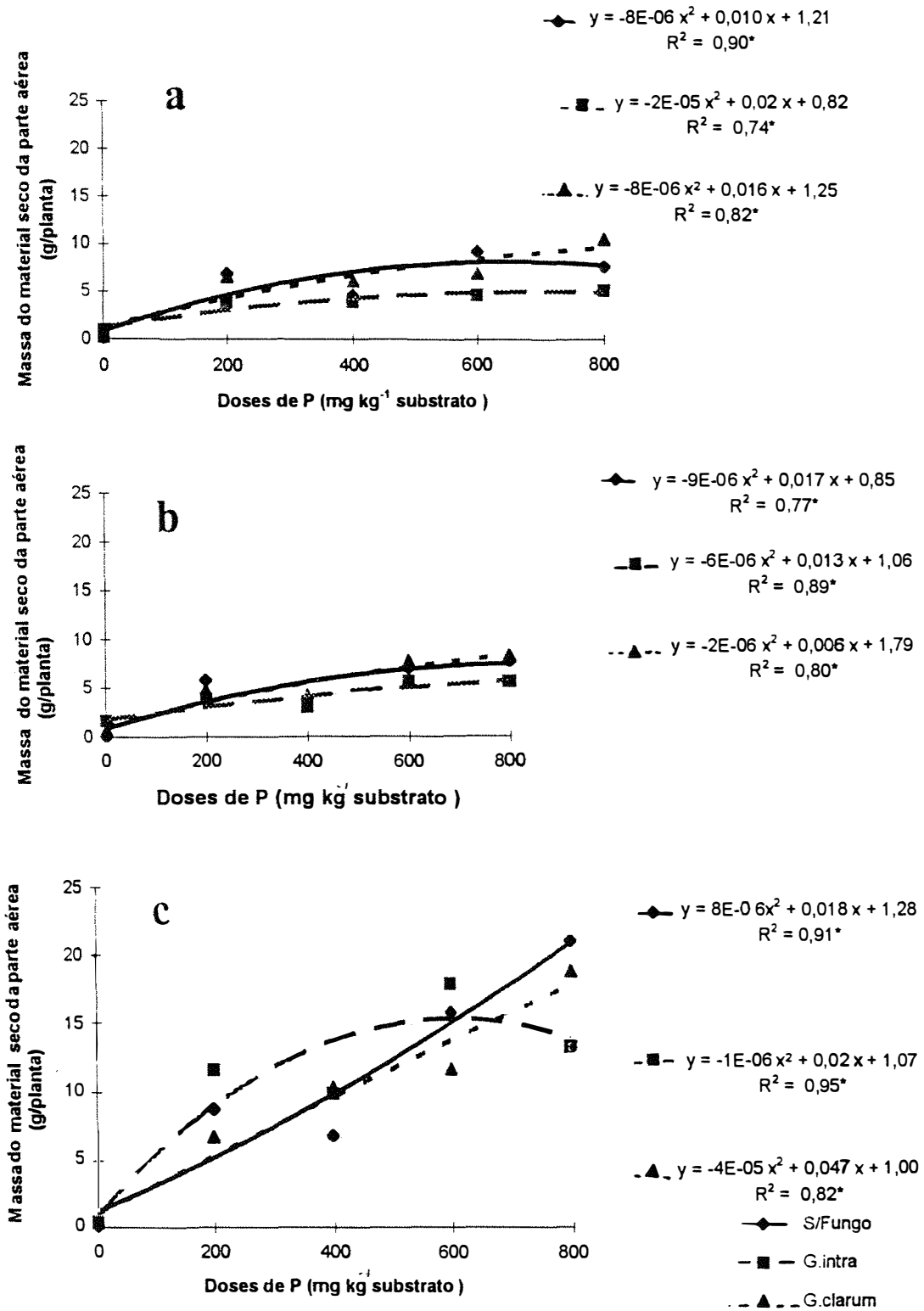


Figura 1. Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre a massa do material seco da parte aérea da tangerineira "Cleópatra" (a), laranja "Caipira"(b) e limoeiro "Cravo"(c). Média de 4 repetições . (*): P<0,05.

enxerto Limoeiro “Cravo”, que apresentou seu crescimento estimulado com a elevação das doses de P.

Para a interação Doses de P x FMA, houve tendência de redução da massa do material seco de todas as espécies utilizadas como porta-enxerto quando as plantas foram inoculadas com FMA (Figura 1). Entre as espécies de FMA utilizadas, *G. intraradices* mostrou maior efeito na redução no crescimento das plantas em que foi inoculado, especialmente quando associado à tangerineira “Cleópatra” na dose 800 mg kg⁻¹ de P. Esse efeito na redução da massa do material seco da parte aérea foi significativo ao nível de 5% de probabilidade em relação a *Glomus clarum* e ao tratamento não inoculado (sem fungo), na mesma dose de P. Nas doses inferiores a 800 mg kg⁻¹ de P, a laranjeira “Caipira” e a tangerineira “Cleópatra” (Figura 1a e Figura 1b) apresentaram sempre valores menores da massa do material seco da parte aérea do que o limoeiro “Cravo” (Figura 1c).

Na interação espécies de Porta-enxertos x Doses de P, o limoeiro “Cravo” apresentou um aumento da massa do material seco da parte aérea estatisticamente superior ao das outras duas espécies, o que demonstra o maior efeito da resposta do limoeiro à adubação fosfatada (Figura 1).

O efeito das espécies utilizadas como porta-enxertos sobre a massa do material seco da parte aérea foi significativo ao nível de 5% de probabilidade como é apresentado na Figura 1. A tangerineira “Cleópatra” e a laranjeira “Caipira” foram as que mostraram tendência à redução na massa da massa do material seco numa dose em torno de 600 mg kg⁻¹ de P, enquanto que o limoeiro “Cravo” só apresentou a mesma tendência quando foi submetido a uma dose de P bem mais elevada, aproximadamente 800 mg kg⁻¹ de P. Esse efeito depressivo na massa do material seco das plantas, inclusive do limoeiro “Cravo”, é demonstrado pelas curvas quadráticas e comprovado através dos valores negativos apresentados pelas equações de regressão obtidas através do desdobramento desse efeito dentro de cada espécie utilizada como porta-enxerto

em todas as doses estudadas e para todos os tratamentos de inoculação (Figura 1).

Apesar do reconhecido efeito dos fungos micorrízicos arbusculares em reduzir as taxas de crescimento das plantas cítricas, quando cultivadas em presença de elevadas doses de adubo fosfatado (Cardoso *et al.*, 1986; Antunes, 1987), no presente trabalho, embora tenham-se obtido correlações negativas para a massa do material seco das plantas de todas as espécies utilizadas como porta-enxertos em todas as doses estudadas e com cada um dos fungos inoculados, efetivamente, apenas a massa do material seco total do limoeiro “Cravo” inoculado com *G. intraradices* e cultivado numa dose de 800 mg kg⁻¹ de P foi significativamente menor ao nível de 5% de probabilidade (Figura 1 c). Esses resultados também confirmam os resultados de Melloni *et al.* (1996), segundo os quais *G. intraradices* mostrou-se mais sensível às elevadas doses de P, em relação a *G. clarum* e, conseqüentemente conduzindo à redução no crescimento das plantas cítricas cultivadas nessas condições.

4.2. Altura das plantas

Para essa variável, podemos observar um comportamento muito semelhante ao que ocorreu com a massa do material seco da parte aérea das plantas, sendo significativos os efeitos do fator porta-enxertos, do fator doses de P e da interação FMA x Doses de P (Tabela 3). As médias para a altura das plantas dentro do fator doses de P com relação às espécies utilizadas como porta-enxerto e à inoculação micorrízica são mostrados nas Tabelas 4 e 5.

Os maiores valores médios para a altura das plantas foram apresentados pela espécie de porta-enxerto limoeiro “Cravo” em todas as doses de P e foram significativamente superiores às outras duas espécies: laranjeira “Caipira” que apresentou os menores valores de altura das plantas e a tangerineira “Cleópatra” (Figura 2). Esses resultados, mais uma vez, comprovaram o que já

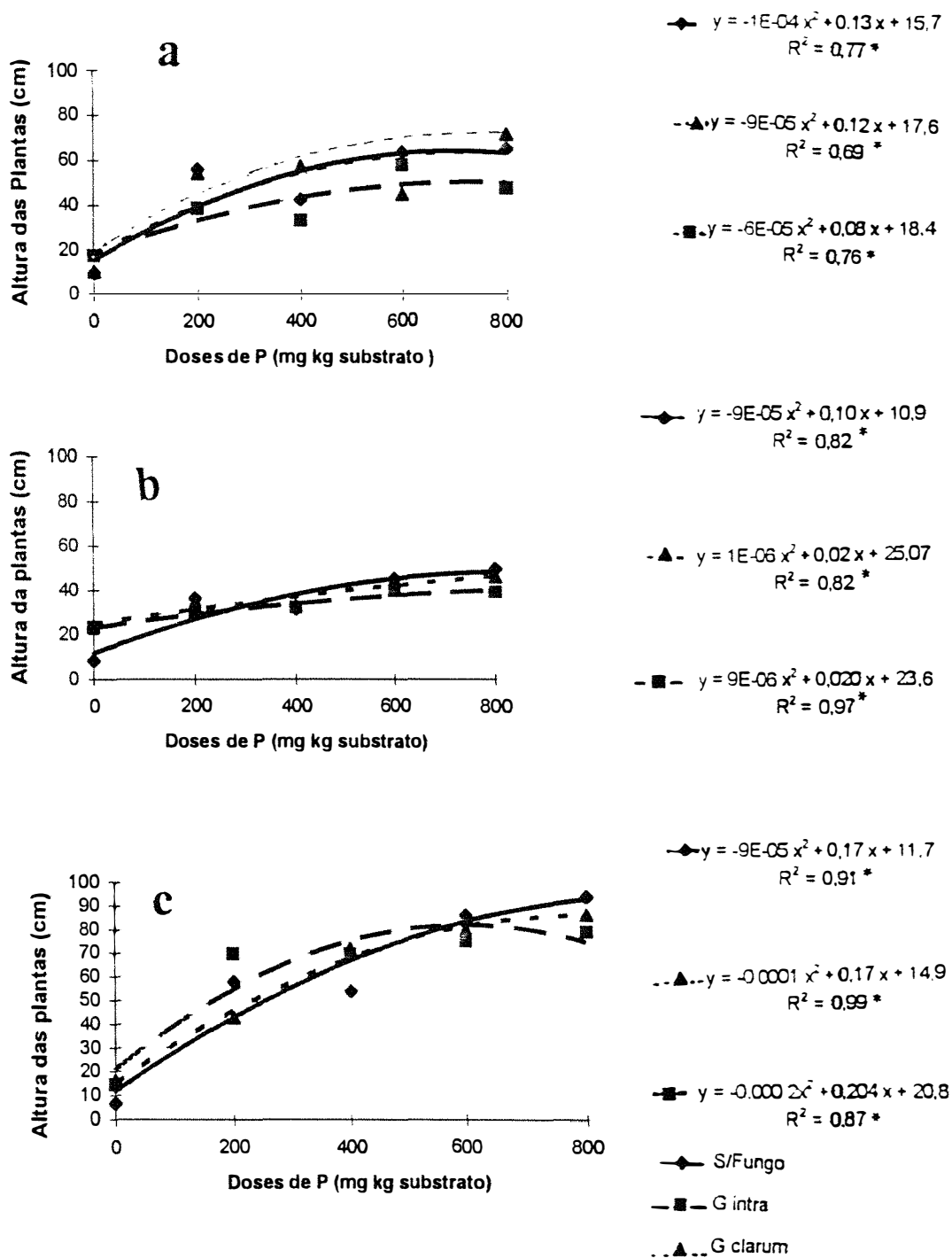


Figura 2 . Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre a altura da tangerineira “Cleópatra” (a), laranjeira “Caipira” (b) e do limoeiro “Cravo”(c) . Média de 4 repetições , (*): $P < 0,05$.

vem sendo estudado sobre os efeitos de P no crescimento de espécies utilizadas como porta-enxertos cítricos como o limoeiro “Cravo”, que em sementeira apresentou maior crescimento quando cultivado nas maiores dosagens de fertilizantes fosfáticos, demonstrando que o crescimento destas plantas está muito mais diretamente relacionado com a nutrição em P (Nicole, 1982; Bueno, 1984; Antunes, 1987) do que com a dependência micorrízica apresentada pela maioria das plantas cítricas.

A inoculação com fungos MA não apresentou efeito significativo sobre a altura das plantas (Tabela 4). No entanto, as plantas inoculadas com *G. intraradices* e adubadas com doses de P superiores a 600 mg kg^{-1} de P tenderam a apresentar um decréscimo no crescimento das espécies utilizadas como porta-enxerto com excessão para o limoeiro “Cravo”, o que pode ser evidenciado pelas equações de regressão, apresentadas no desdobramento da interação dentro do fator porta-enxerto (Figura 2).

Embora a altura das plantas não seja uma característica fisiológica da planta, essa variável apresentou uma correlação significativa, com os resultados que foram obtidos para a variável anterior, massa do material seco da parte aérea, dentro das condições em que o experimento foi conduzido (Figura 3), o que evidencia a coerência dos resultados, uma vez que trata-se de variáveis que representam em termos práticos, a resposta mais importante das plantas em relação às condições a que foram submetidas.

4.3. Diâmetro do caule das plantas

Os valores médios para essa variável encontram-se nas Tabelas 4 e 5. Houve efeito apenas do fator porta-enxertos e do fator doses de P isoladamente, não havendo contudo efeito significativo entre as interações PEN x DOS e DOS x FMA (Tabela 3).

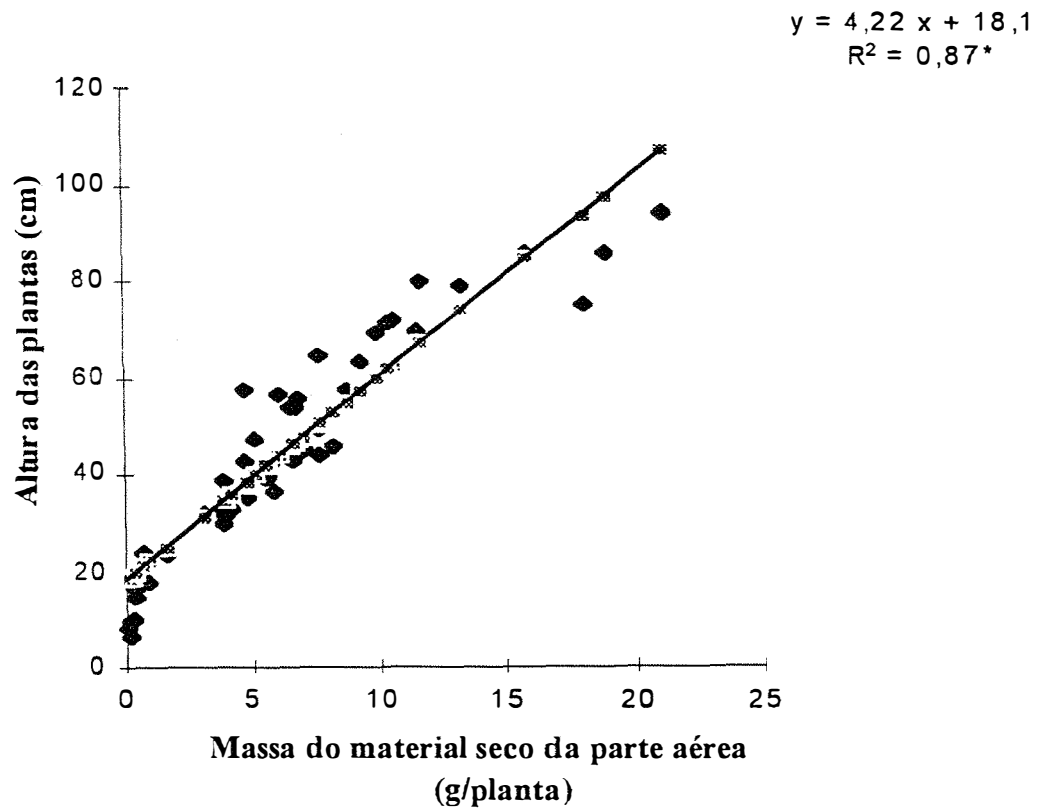


Figura 3. Correlação entre a altura e a massa do material seco da parte aérea das três espécies utilizadas como porta-enxertos (tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”). Média de 45 repetições. (* $P < 0,05$).

A exemplo do que ocorreu com as outras variáveis que denotam o crescimento das plantas, a massa do material seco da parte aérea e altura das plantas, ficou demonstrada a influência das doses crescentes de P, incrementando o diâmetro do caule (Figura 4).

Todavia, o incremento no diâmetro das plantas ocorrido com doses inferiores a 600 mg kg^{-1} de P, tendeu a decrescer proporcionalmente com a elevação desse teor de P no substrato de cultivo, associado à inoculação com os fungos MA. Também houve uma tendência de um efeito depressivo sobre essa variável o que poderia ser explicado por diversas teorias, como a da alteração da cinética de absorção de P (Silveira & Cardoso, 1987), a hipótese de produção de toxinas, a alteração na relação entre o micélio externo ativo e total, a alteração na taxa fotossintética e de utilização de substratos (Qui & Israel, 1992). Para se elucidar o real mecanismo que indicaria qual dessas hipóteses aplicar-se-ia melhor para explicar os resultados obtidos, são necessários estudos muito elaborados.

Neste trabalho, no entanto, a simples constatação desse tipo de efeito já é muito relevante pois, concorda com os estudos de Buwalda & Goh (1982) e Hall *et al.* (1984), que há muito tempo estão sendo desenvolvidos, confrontando o nível de P com o desempenho dos FMA no crescimento de diversas plantas.

O comportamento das doses de P e dos FMA em conjunto, determina aparentemente, a diminuição no diâmetro do caule, dentro de cada um dos porta-enxertos em alguns níveis de P (Figura 4). Apesar dessa tendência, as curvas voltam a se encontrar no maior nível de P utilizado (800 mg kg^{-1}), evidenciando uma possível variação devido ao acaso nos níveis anteriores.

A exemplo do que ocorreu com as outras variáveis que denotam o crescimento das plantas, a massa do material seco da parte aérea e altura das plantas, ficou demonstrada a influência das doses crescentes de P, incrementando o diâmetro do caule (Figura 4).

Todavia, o incremento no diâmetro das plantas ocorrido com doses inferiores a 600 mg kg^{-1} de P, tendeu a decrescer proporcionalmente com a elevação desse teor de P no substrato de cultivo, associado à inoculação com os fungos MA. Também houve uma tendência de um efeito depressivo sobre essa variável o que poderia ser explicado por diversas teorias, como a da alteração da cinética de absorção de P (Silveira & Cardoso, 1987), a hipótese de produção de toxinas, a alteração na relação entre o micélio externo ativo e total, a alteração na taxa fotossintética e de utilização de substratos (Qui & Israel, 1992). Para se elucidar o real mecanismo que indicaria qual dessas hipóteses aplicar-se-ia melhor para explicar os resultados obtidos, são necessários estudos muito elaborados.

Neste trabalho, no entanto, a simples constatação desse tipo de efeito já é muito relevante pois, concorda com os estudos de Buwalda & Goh (1982) e Hall *et al.* (1984), que há muito tempo estão sendo desenvolvidos, confrontando o nível de P com o desempenho dos FMA no crescimento de diversas plantas.

O comportamento das doses de P e dos FMA em conjunto, determina aparentemente, a diminuição no diâmetro do caule, dentro de cada um dos porta-enxertos em alguns níveis de P (Figura 4). Apesar dessa tendência, as curvas voltam a se encontrar no maior nível de P utilizado (800 mg kg^{-1}), evidenciando uma possível variação devido ao acaso nos níveis anteriores.

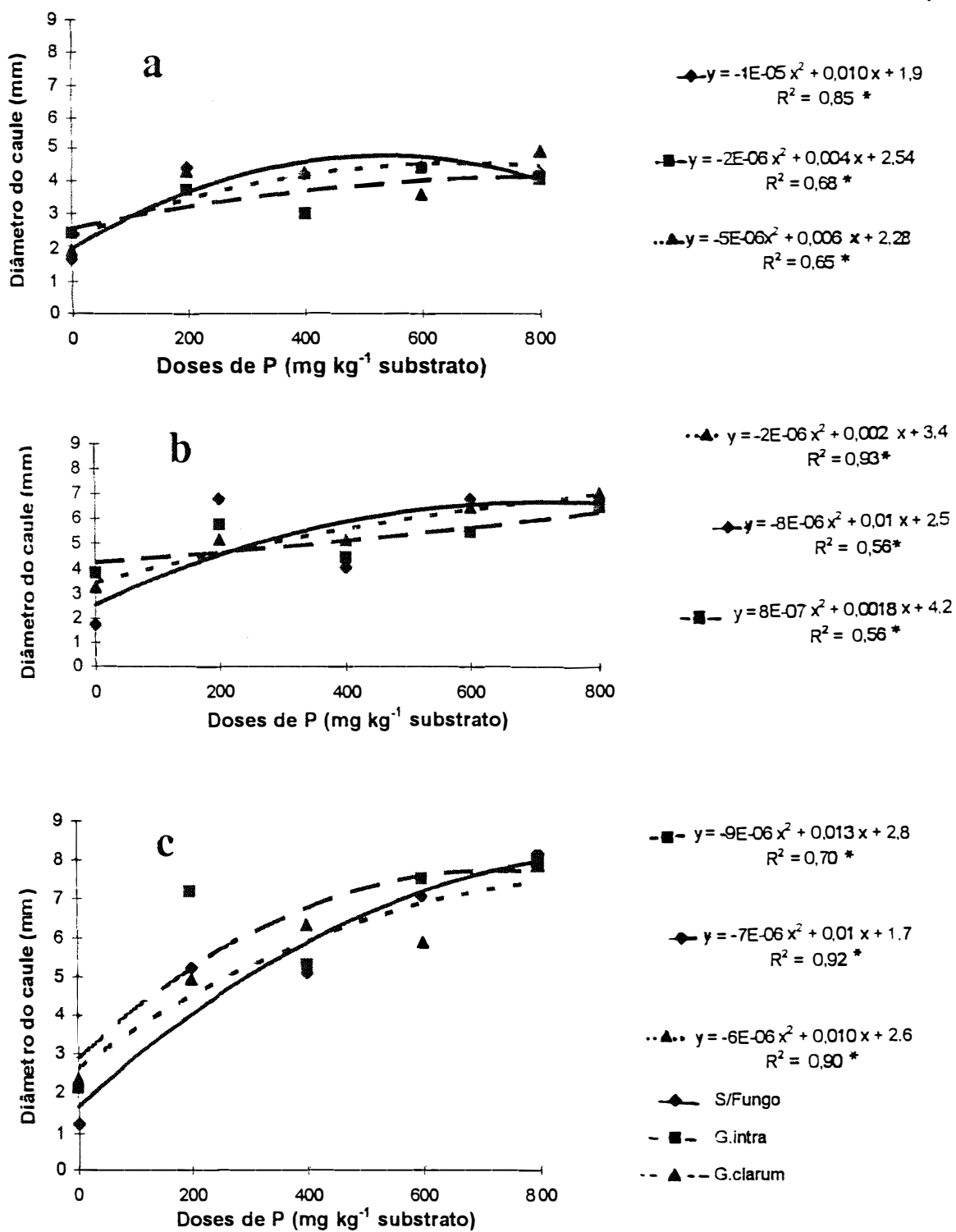


Figura 4. Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre o diâmetro do caule da tangerineira "Cleópatra"(a), laranja "Caipira"(b) e limoeiro "Cravo"(c). Média de 4 repetições. (*) : $P < 0,05$.

4.4. Colonização micorrízica arbuscular radicular

Os valores médios para a percentagem de colonização micorrízica das raízes da tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”, submetidos às 5 doses de P e em cada tratamento de inoculação, encontram-se na Tabela 6. Os valores de “P” (Tabela 7), mostram que houve um efeito estatisticamente significativo sobre a porcentagem de colonização radicular da tripla interação, Porta-enxertos x Doses de P x FMA.

Os resultados da taxa de colonização micorrízica nas raízes das três espécies utilizadas como porta-enxerto com as doses de P, encontram-se na Figura 5 (a) para o efeito de *G. clarum* e na Figura 5 (b) para o efeito de *G. intraradices*. Os tratamentos não inoculados com FMA não apresentaram colonização.

Esses resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos sobre esse assunto, que frequentemente constataram que a adição de P, tem causado diminuição na colonização e algumas vezes no crescimento das planta micorrizadas (Antunes 1987 e Antunes & Cardoso, 1991). Todavia, fontes pouco solúveis como as rochas fosfáticas, podem ser usadas em conjunto com FMA em citros, para substituir quantidades médias de fosfatos solúveis, sem contudo causarem efeito depressivo sobre a colonização e/ou crescimento das plantas (Antunes & Cardoso, 1990).

Camargo (1989), trabalhando com limoeiro “Cravo” inoculado com *Glomus clarum* e com *Acaulospora laevis*, observou que os níveis de P na forma de superfosfatos capazes de reduzirem a colonização micorrízica, variavam desde a aplicação suficiente para fornecer 200 mg de kg^{-1} até o nível de 556 mg de P kg^{-1} disponível.

Neste trabalho, as melhores taxas de colonização micorrízica foram obtidas no material inoculado e cultivado sem a adição de P ou seja substrato com

Tabela 6. Taxas de colonização micorrízica (%) nas raízes de 3 espécies utilizadas como porta-enxerto de citros, submetidos a 3 tratamentos de inoculação com fungos MA e 5 níveis de P. Média de 4 repetições. Piracicaba, 1997

	Tangerineira “Cleópatra”	Laranjeira “Caipira”	Limoeiro “Cravo”
0 mg P kg⁻¹			
S/F ¹	0 Ba	0 Ca	0 Ca
G. intr.	61,6Aa	58,5Aa	22,7Bb
G. clar.	54,8Ab	68,5Aa	37,4Ac
200 mg P kg⁻¹			
S/F	0 Ca	0 Ba	0 Ba
G. intr.	15,1Aa	3,0Ab	5,8Ab
G. clar.	5,9Ba	0,8ABb	2,9Aa
400 mg P kg⁻¹			
S/F	0 Ba	0 Aa	0 Aa
G. intr.	1,8Aa	0,7Aa	0,5Aa
G. clar.	0,0Bb	0,0Ab	0,7Aa
600 mg P kg⁻¹			
S/F	0 Aa	0 Aa	0 Aa
G. intr.	0 Aa	0 Aa	0Aa
G. clar.	0 Aa	0 Aa	0 Aa
800 mg P kg⁻¹			
S/F	0 Aa	0 Aa	0 Aa
G. intr.	0 Aa	0 Aa	0 Aa
G. clar.	0 Aa	0 Aa	0 Aa

⁽¹⁾Médias seguidas por letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal iguais, não diferem entre si, ao nível de 0,05 de significância, pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Valores de “P” (nível de significância) obtidos na análise de variância das variáveis: colonização radicular, comprimento do micélio externo ativo e comprimento do micélio externo total dos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Piracicaba, 1997

CAUSAS VARIAÇÃO	Colonização radicular	Comprimento do micélio externo ativo	Comprimento do micélio externo total
P-ENXERTO	0,00001*	0,00001*	0,00001*
DOSES P	0,00001*	0,00001*	0,00001*
FMA	0,00001*	0,00001*	0,00001*
PEN X DOS	0,00001*	0,00004*	0,00001*
PEN X FMA	0,00001*	ns	0,02789*
DOS X FMA	0,00001*	0,00001*	0,00001*
PEN X DOS X FMA	0,00001*	0,00047*	0,00001*

*: significante a 0,05 de probabilidade pelo teste “F”; ns: não significante.

PEN: Porta-enxerto, DOS: Doses de P, P-ENXERTO: Porta-enxerto, FMA: Fungo micorrízico arbuscular.

teor natural de P em torno de 5 mg P kg^{-1} de substrato (Tabela 1). A partir da dose 200 mg P kg^{-1} adicionada ao substrato, cerca de 15 mg dm^{-3} de P disponível, começou a decrescer o valor da colonização radicular em todos os porta-enxertos, e esta tornou-se completamente nula em 600 mg kg^{-1} de P (Figura 5).

O efeito inibitório da taxa de colonização micorrízica, causada por altas doses de P, talvez possa ser explicado por diferentes hipóteses, inclusive a de Siqueira *et al.* (1984), segundo a qual, o P controla o grau de colonização das raízes pelos fungos MA através do metabolismo de carboidratos da planta hospedeira. Entretanto, o nível exato de P considerado inibitório à colonização micorrízica, pode ser dependente também de fatores inerentes à planta hospedeira, à espécie do fungo MA, ao substrato e/ou às condições ambientais. Neste trabalho, podemos considerar que a colonização radicular MA foi influenciada pelos três fatores estudados: tipo de porta-enxerto, espécie do fungo micorrízico e pelo nível de P. As mudas de citros mostraram elevada resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, em especial com a espécie *G. intraradices* (Figura 5), que favoreceu a colonização de todas as espécies utilizadas como porta-enxertos estudadas, inclusive o limoeiro “Cravo”, reconhecidamente com baixo potencial micorrízico.

4.5. Comprimento do micélio externo ativo

Para essa variável pode-se observar que houve uma interação tripla entre os três fatores Porta-enxerto x Doses de P x Fungos micorrízicos arbusculares (Tabela 7).

Ficou evidente o efeito de *Glomus intraradices*, elevando significativamente o comprimento de micélio ativo, medido pelo método da FDA, nas três espécies utilizadas como porta-enxertos estudados (Figura 6). Em especial, na tangerineira “Cleópatra”, principalmente quando se utilizaram doses de P

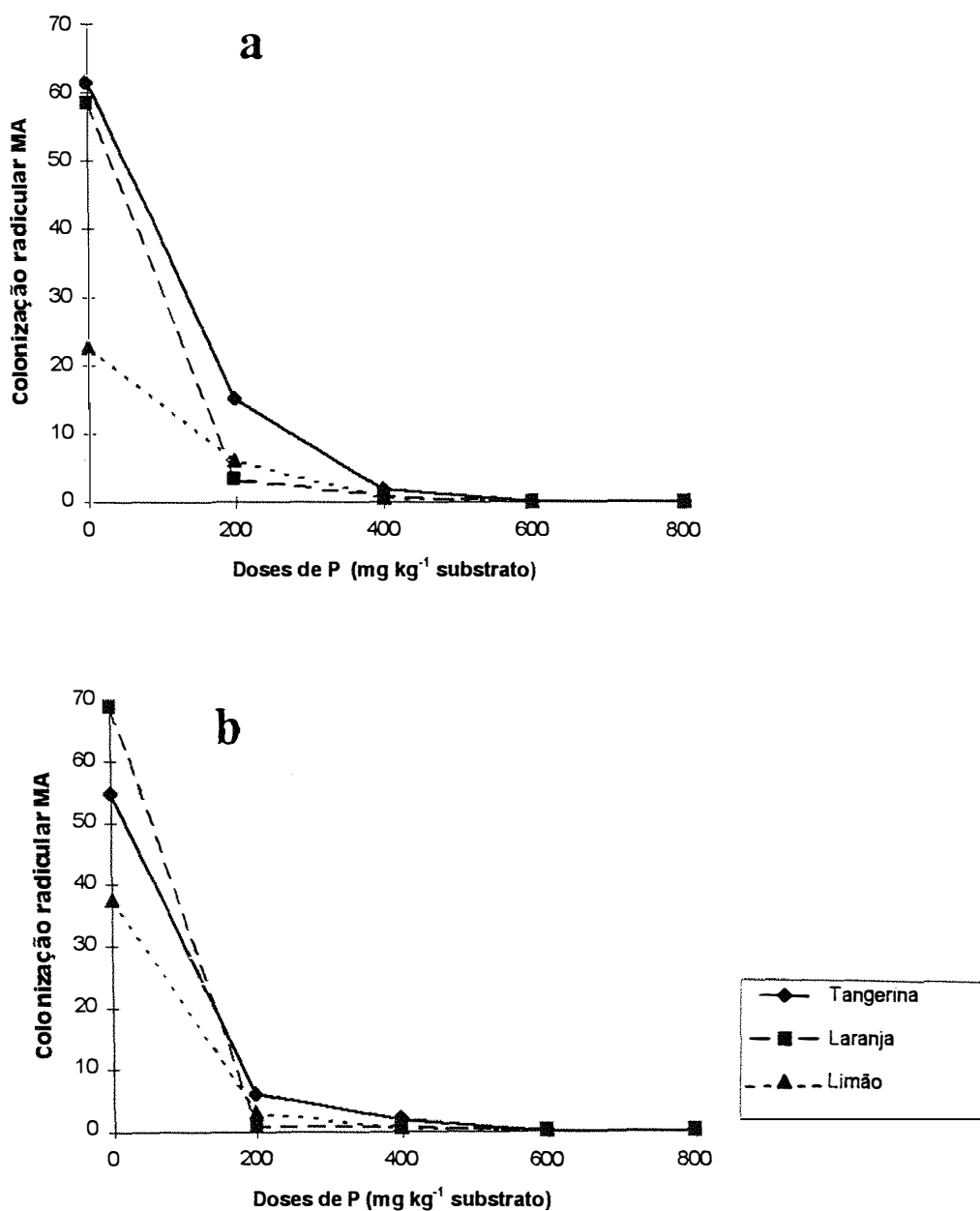


Figura 5. Porcentagem de colonização radicular por *G. intraradices* (a) e *G. clarum* (b), dentro do fator porta-enxertos (tangerineira "Cleópatra", laranjeira "Caipira" e limoeiro "Cravo") submetidos a 5 doses de P. Médias de 4 repetições.

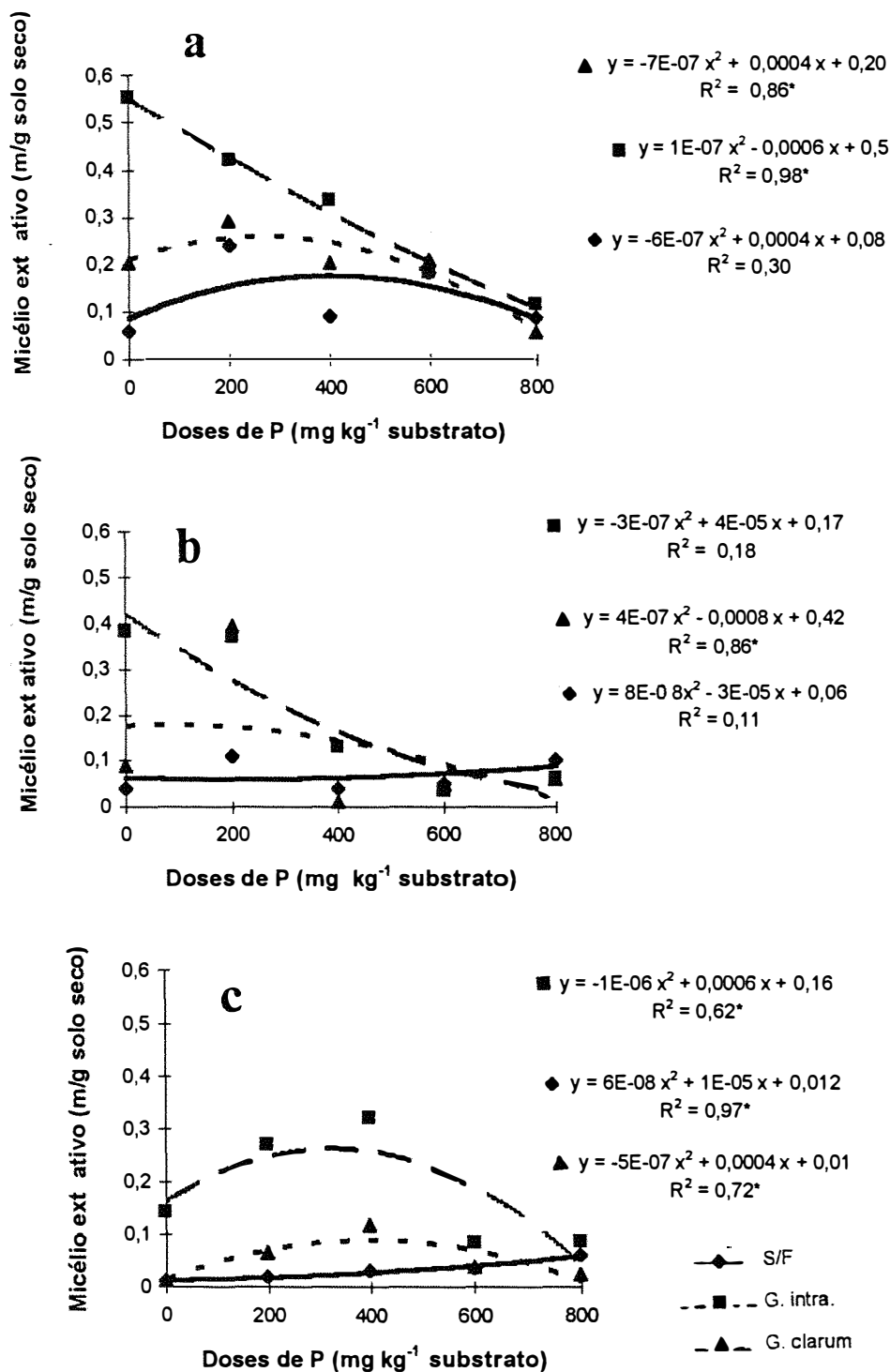


Figura 6. Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre o comprimento do micélio externo ativo de tangerineira "Cleópatra" (a), laranjeira "Caipira"(b) e limoeiro "Cravo"(c). Média de 4 repetições. (*) : P < 0,05.

menores que 200 mg kg^{-1} . Um decréscimo acentuado foi observado nos valores de comprimento de micélio externo ativo, quando se elevou a dose de P acima de $200 \text{ mg de P kg}^{-1}$ de substrato.

Glomus clarum ao contrário de *Glomus intraradices* não demonstrou uma grande eficiência na promoção do comprimento do micélio ativo para nenhum dos porta-enxertos (Figura 6). Ficou patente todavia, o efeito das doses de P na redução do comprimento do micélio externo ativo, o que pode justificar teorias como a de Jakobsen *et al.* (1992) segundo a qual, os elevados teores de P do substrato seriam absorvidos pelo fungo através do micélio externo ativo, o que poderia causar um desbalanço no processo de absorção de outros nutrientes, gerando com isso, um efeito depressivo sobre o crescimento das plantas.

Os resultados de micélio externo ativo obtidos neste trabalho, reforçam mais uma vez a teoria do dreno de carbono da planta para o fungo MA, quando o sistema fungo-planta está submetido a doses elevadas de P e abrem uma perspectiva muito promissora para os estudos futuros que se situem nesta linha de pesquisa, requerendo contudo, uma avaliação muito mais ampla. Estudos complementares esses, muito mais específicos com relação ao hospedeiro, aos endófitos utilizados, substratos e, principalmente, quanto a metodologia, que ainda está em fase de aprimoramento.

4.6. Comprimento do micélio externo total

Para essa variável, foi verificado efeito de todos os fatores envolvidos, inclusive das interações entre esses fatores (Tabela 7), sendo que ao contrário do que ocorreu com o micélio ativo, houve uma tendência de aumento no comprimento do micélio total com a elevação das doses de P na tangerineira “Cleópatra” e na laranja caipira, quando inoculadas com os fungos MA. O limoeiro “Cravo”, todavia,

apresentou uma tendência de redução no comprimento do micélio total, quando inoculado com *G. intraradices* (Figura 7).

Foram realizadas análises de correlação entre a percentagem de colonização radicular, o comprimento de micélio externo ativo e comprimento do micélio externo total e os resultados mostraram que, ao contrário do que se esperava, não houve uma boa correlação entre essas variáveis, em especial o micélio total e a colonização micorrízica.

Todavia, analisando-se os resultados e relacionando-os com o crescimento das plantas, observamos que eles confirmam o que já vem sendo demonstrado por diversos autores (Cardoso *et al.*, 1986; Antunes & Cardoso, 1991) segundo os quais as plantas micorrizadas cultivadas em altas doses de P podem apresentar uma redução de crescimento e que ela pode ser devida a fatores internos inerentes ao fungo e/ou à planta hospedeira.

A exemplo do que ocorreu no experimento de Cardoso Filho (1994) constatou-se uma redução na colonização interna das raízes, acompanhada pelo aumento do micélio externo total e a diminuição de sua atividade proporcional ao aumento das doses de P no substrato. É provável que estes resultados possam explicar a redução no crescimento, pela teoria do dreno excessivo de carbono da planta para o fungo, uma vez que o desbalanço da relação entre a biomassa fúngica extrarradicular ativa e a total pode levar a um balanço energético negativo, que compromete a manutenção equilibrada do sistema fungo-planta e pode gerar a depressão do crescimento da planta, visto que grande parte dos fotoassimilados estaria sendo gasto para a formação da biomassa fúngica e a retribuição em importação de nutrientes seria extremamente limitada, pois só poderia ocorrer através do micélio ativo.

Em termos de carbono para a formação e a manutenção das micorrizas, cerca de 50% são canalizados para atender a maior distribuição e alocação para as,

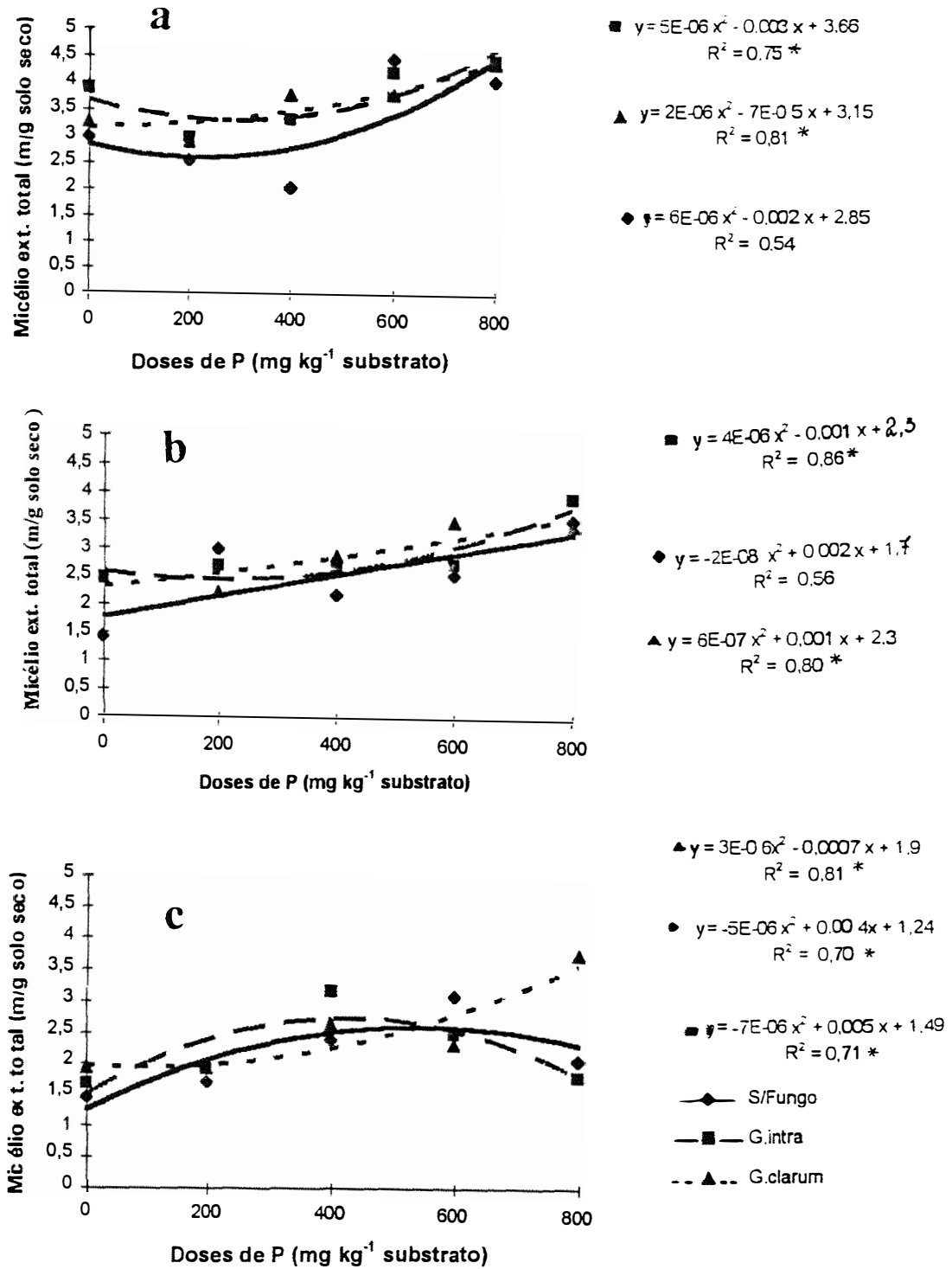


Figura 7. Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre o comprimento do micélio externo total da tangerineira "Cleópatra"(a), laranjeira "Caipira"(b) e limoeiro "Cravo"(c). Média de 4 repetições. (*): P < 0,05.

raízes 11% são gastos na formação de raízes e o restante, para a manutenção das estruturas do fungo, notadamente do micélio extramatricial (Peng *et al.*, 1993).

As estruturas do micélio externo ativo e total ao microscópio podem ser vistas na Figura 8. O micélio externo ativo, submetido á metodologia da fluorescência induzida com diacetato de fluoresceína (FDA), apresentou uma cor verde-fluorescente-brilhante (Figura 8.1 e 8.4), enquanto que o micélio externo total, submetido à mesma técnica, apresentou uma cor avermelhada, tendendo para o marrom (Figura 8.2). A cor verde característica do micélio externo ativo foi desaparecendo com o decorrer do tempo após a coloração (Figura 8.3), motivo pelo qual o material foi observado e quantificado imediatamente após a coloração. Os mecanismos e os fatores bioquímicos que determinam esse comportamento ainda não estão bem esclarecidos .

4.7. Quantidades de nutrientes totais no material foliar seco

4.7.1. Macronutrientes

Os valores de “P” (nível de significância) para os conteúdos totais de N, P, K, Ca, Mg e S no material seco das folhas da tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo” são apresentados na Tabela 8.

4.7.1.1. Nitrogênio

Houve efeito negativo dos fatores porta-enxerto e doses de P isoladamente e da interação Porta-enxerto x Doses de P (Tabela 8). Para essa variável o limoeiro “Cravo” absorveu N de forma crescente em função do aumento das doses de P, enquanto que a laranjeira “Caipira” e, especialmente, a tangerineira “Cleópatra” absorveram o nitrogênio de forma crescente, até aproximadamente a dose de 400 mg kg⁻¹ de P, e a partir dela começou a decrescer (Figura 9).

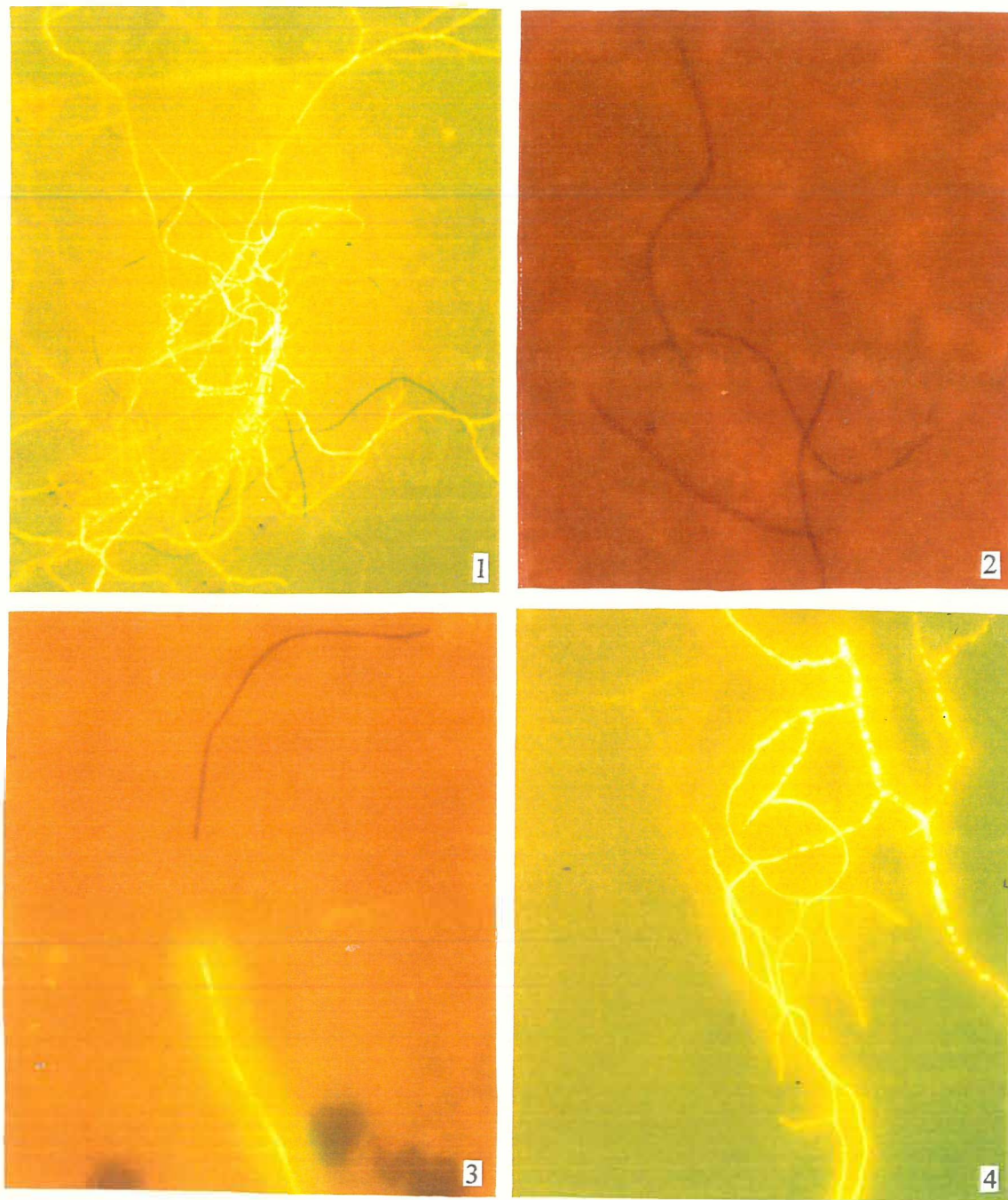


Figura 8 - Observações microscópicas de :

1-Micélio externo ativo sob luz U.V. (100x)

2-Micélio externo total sob luz incandescente (400x)

3-Micélio externo parcialmente ativo sob luz U.V. (400x)

4-Micélio externo ativo sob luz U.V. (400x)

Tabela 8. Valores de “P” obtidos na análise de variância dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) absorvidos pelos porta-enxertos: tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Piracicaba, 1997.

CAUSAS	N	P	K	Ca	Mg	S
VARIACÃO						
P-ENXERTO	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*
DOSES P	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*
FMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PEN X DOS	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*	ns
PEN X FMA	ns	0,04820*	0,00227*	ns	ns	ns
DOS X FMA	ns	0,02646*	ns	ns	ns	0,04884*
PEN X DOS X FMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns

*: significante a 0,05 de probabilidade pelo teste “F”; ns: não significante.

PEN: Porta-enxerto, DOS: Doses de P, P-ENXERTO: Porta-enxerto, FMA:

Fungo micorrízico arbuscular.

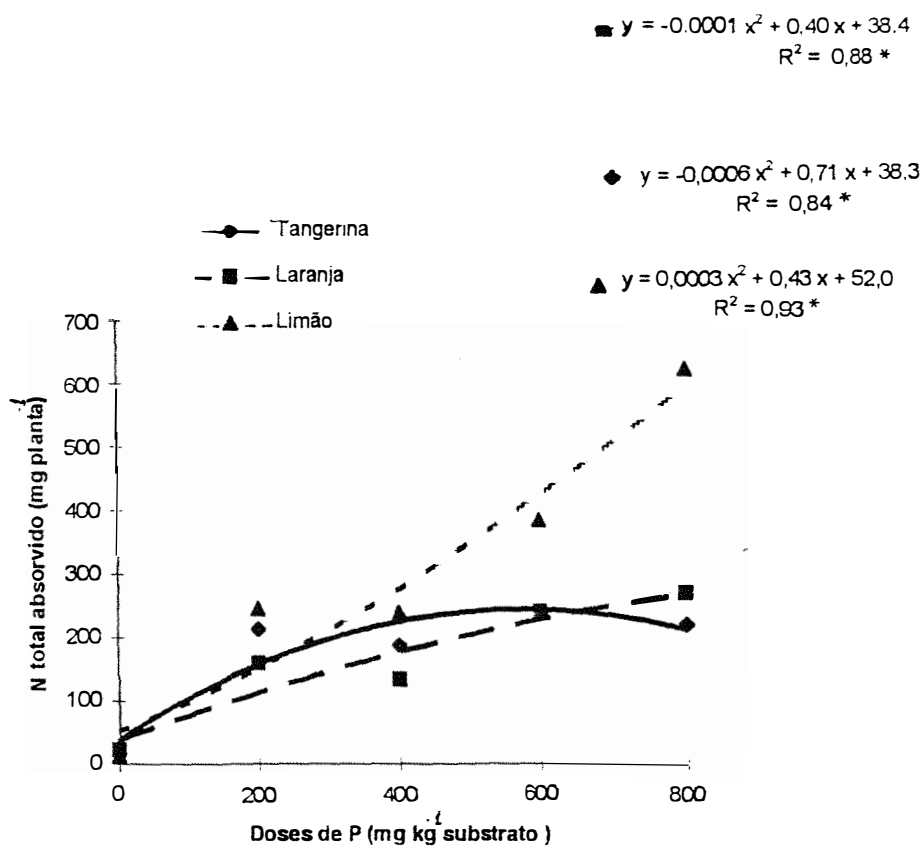


Figura 9. Efeito das doses de P, sobre o nitrogênio total absorvido pelos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

Vários autores também observaram a redução no conteúdo de nitrogênio no material seco da parte aérea de alguns porta-enxertos de citros, com a adição de fertilizantes fosfatados, o que poderia ser explicado pelo efeito de diluição (Fonseca, 1991).

4.7.1.2. Fósforo

Com relação ao teor de P na massa da matéria seca foliar, houve diferença estatística significativa dentro das interações, Porta-enxerto x Doses de P, Porta-enxerto x FMA e Doses de P x FMA (Tabela 8).

Efeitos diferenciados no teor de P absorvido também foram observados entre as três espécies utilizadas como porta enxerto, quando submetidos aos diferentes tratamentos de inoculação, dentro dos cinco níveis de P estudados (Figura 10). O P absorvido pelas plantas aumentou com o teor de P adicionado ao solo, enquanto que a inoculação com fungos MA proporcionou aumentos significativos na absorção de P pelas plantas cítricas, efeito esse, que também foi observado no limoeiro “Cravo” na fase de sementeira, conforme Cardoso *et al.*(1986) e Antunes (1987).

Neste estudo, houve uma resposta positiva entre a absorção de P pela planta e o aumento das doses de P ao substrato não inoculado e inoculado com *G. clarum*, mas uma resposta negativa, com queda na absorção de P por plantas inoculadas com *G. intraradices*, já a partir da adição de 600 mg kg⁻¹ de P (Figura 10). Os resultados encontrados nesse trabalho não mostram nenhuma evidência de que as doses elevadas de P aumentaram a concentração do P nos tecidos da planta a níveis que possam ser considerados tóxicos.

A laranjeira “Caipira” inoculada com *Glomus clarum* e que não recebeu adubação fosfática, foi a espécie de porta-enxerto que inicialmente tendeu a uma maior absorção de P (Figura 10 b). A partir da adição de P ao

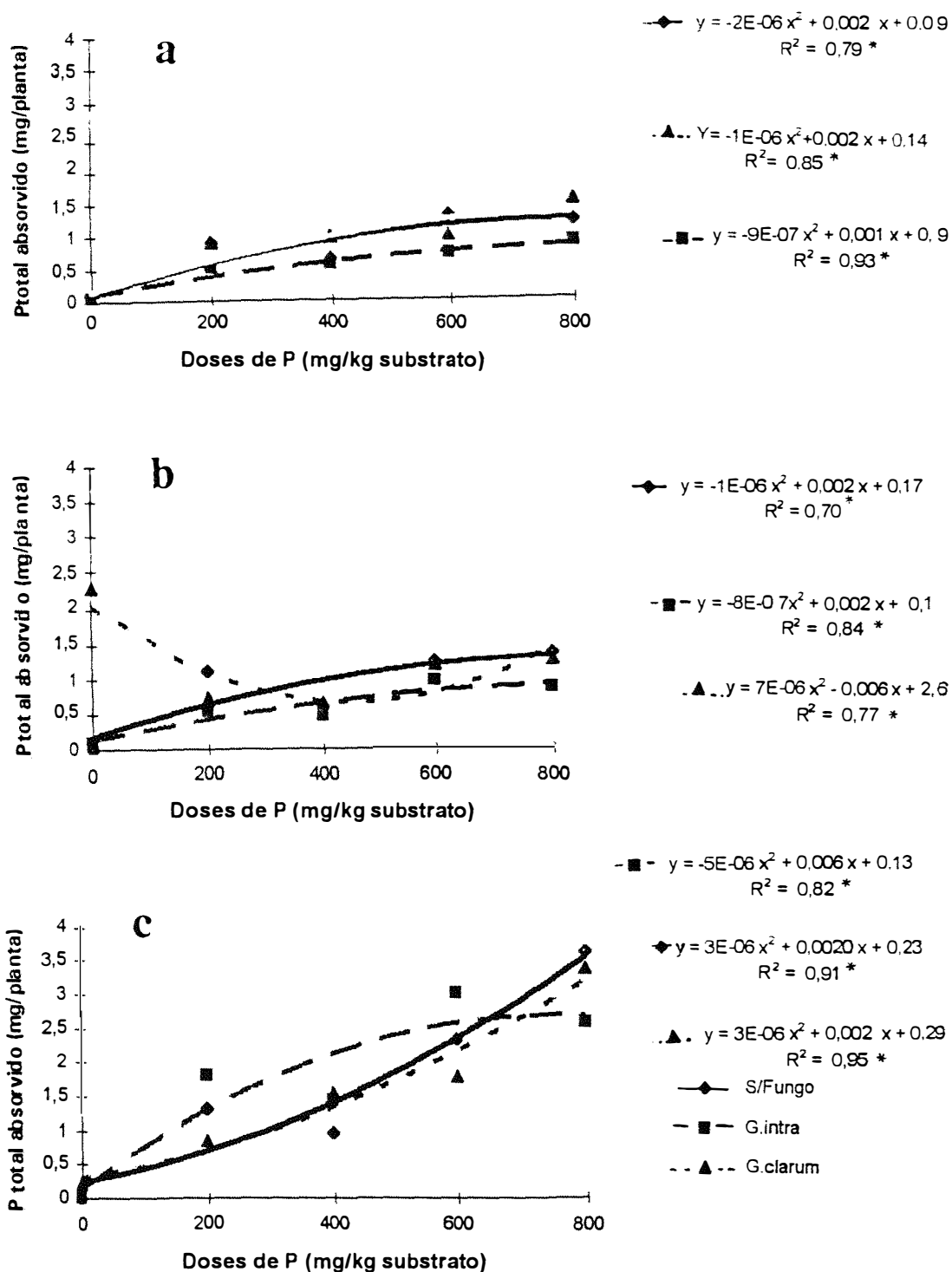


Figura 10. Efeito das doses de P e da inoculação com fungos MA sobre o fósforo total absorvido pela tangerineira "Cleópa ra (a), laranjeira "Caipira" limoeiro "Cravo"(c). Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

substrato de cultivo, observou-se um acentuado decréscimo na absorção de P por essa espécie de porta-enxerto.

4.7.1.3. Potássio

Para essa variável, podemos observar que houve interação entre os fatores Porta-enxertos x Doses e Porta-enxertos x FMA (Tabela 8).

O limoeiro “Cravo” foi, dentre as espécies utilizadas como porta-enxerto, a que mais absorveu o K, reagindo diferentemente da laranjeira “Caipira” e da tangerineira “Cléopatra”, que tenderam a reduzir essa absorção quando se elevaram as doses de P acima dos 600 mg kg^{-1} .

Todavia, pelas equações, de natureza quadrática e negativas (Figura 11), pode-se comprovar o efeito depressivo também na absorção desse elemento, com relação à elevação das doses de P no substrato de cultivo das mudas, especialmente na tangerineira “Cleópatra”.

Quando os resultados desse estudo são comparados, quanto ao teor de K absorvido pelos porta-enxertos em presença de elevados níveis de P, com os de outros autores, verifica-se que os resultados aqui apresentados confirmam aqueles encontrados por vários deles. Redução nos teores de K na massa do material seco do limoeiro “Cravo” cultivado em sementeira foi observado por Camargo (1989) e Carvalho (1987), estudando o efeito do P no crescimento das plantas. Esses autores atribuíram tais resultados ao maior acúmulo de material seco causado pelo aumento nos níveis de P, em relação à absorção de K, caracterizando-se o efeito diluição. Está embutido neste efeito também, o efeito do cálcio, que normalmente faz parte da constituição dos fosfatados adicionados aos substratos de cultivo. Ao contrário do que foi observado neste trabalho, onde a elevação do nível de P ao substrato causou a redução da absorção do K pelas

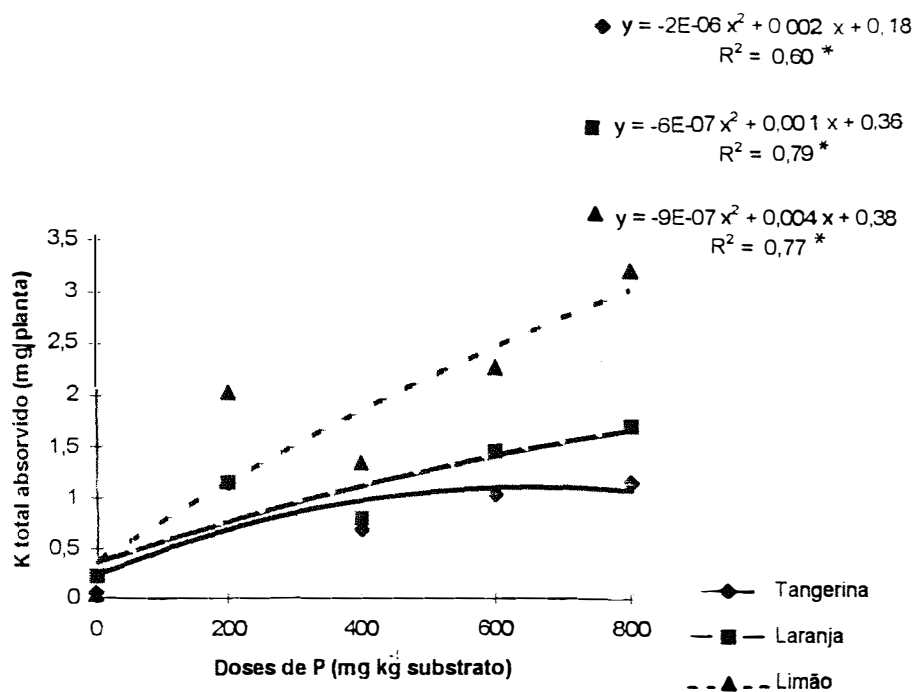


Figura 11. Efeito das doses de P, sobre potássio total absorvido pelos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

plantas, Nicoli(1982) e Bueno (1984), não constataram nenhuma influência da adição de adubos fosfatados sobre a absorção desse nutriente pelas plantas.

A quantidade de adubo potássico fornecida por ocasião da implantação desse experimento deve ter equilibrado os teores de K para todas as plantas, eliminando dessa forma, o efeito antagônico causado pela alta concentração de cálcio adicionada ao substrato, juntamente com as elevadas doses de P. Uma vez que os íons Ca^{+2} em altas concentrações interagem com os íons K^{+} numa inibição competitiva (Malavolta, 1980).

4.7.1.4. Cálcio

Para o conteúdo de cálcio na massa do material foliar seco, houve efeito significativo apenas da interação entre Porta-enxertos x Doses de P (Tabela 8).

O conteúdo de Ca tendeu a um aumento com a elevação das doses de P (Figura 12), esse efeito talvez possa ser atribuído ao Ca presente em forma solúvel (Superfosfato triplo) no fertilizante fosfatado utilizado, o que também foi observado por Silva (1981); Bueno (1984) e Carvalho (1987), que também utilizaram fosfato solúvel, embora de solubidade diferente, da utilizada nesse trabalho.

Dentre os porta-enxertos estudados, mais uma vez, o limoeiro “Cravo” destacou-se, sendo sua absorção de Ca significativamente maior do que aquela que ocorreu nos outros dois porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra” e laranjeira “Caipira” o que pode ser atribuído entre outros fatores às elevadas taxas de crescimento do limoeiro “Cravo” em função do P adicionado ao substrato (Figura 12) ou ainda ao efeito diluição (Fonseca, 1991).

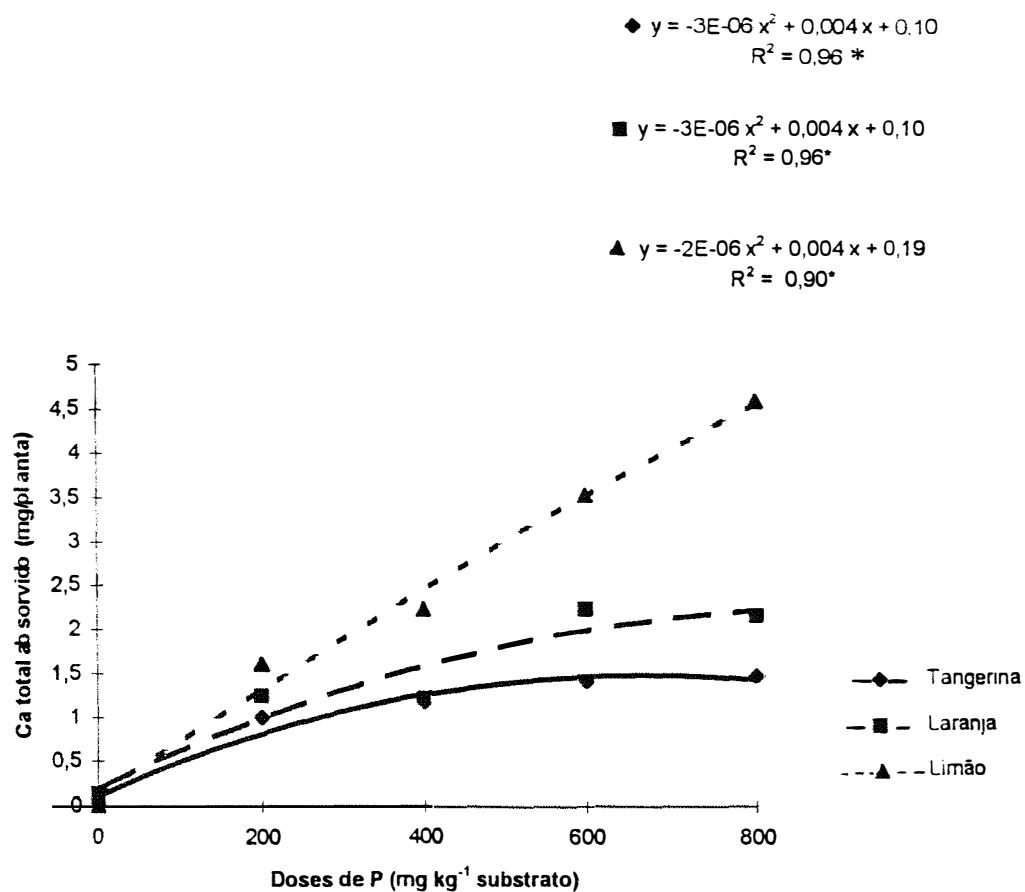


Figura 12. Efeito das doses de P sobre o cálcio total absorvido pelas três espécies utilizadas como porta-enxerto, tangerineira "Cleópatra", laranjeira "Caipira" e limoeiro "Cravo". Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

4.7.1.5. Magnésio

Para esta variável houve um efeito significativo na interação dos fatores Porta-enxerto x Doses de P (Tabela 8) e efeitos isolados das Doses de P e dos Porta-enxertos sobre o conteúdo do magnésio total absorvido pela planta (Figura 13).

Entre os porta-enxertos, o limoeiro “Cravo” apresentou maior absorção de magnésio em todos os níveis de P a partir dos 200 mg kg⁻¹, independentemente da inoculação micorrízica associada. Uma menor absorção do magnésio foi observada para a tangerineira “Cleópatra” e a laranjeira “Caipira”, que tenderam a reduzir a absorção deste elemento quando se elevaram as doses de P acima dos 600 mg kg⁻¹ de P. Esse efeito apresenta semelhança com o comportamento demonstrado pelos mesmos porta-enxertos na absorção do cálcio (Figuras 12 e 13).

4.7.1.6. Enxofre

Para essa variável, podemos observar que houve efeito significativo da interação Doses de P x FMA (Tabela 8). A absorção desse nutriente pelas plantas tendeu a ser maior do que a que vinha ocorrendo com a absorção da maioria dos outros macronutrientes.

A absorção de S na massa do material seco, foi influenciada pelas doses de P adicionadas ao substrato de cultivo (Figura 14). Entre os porta-enxertos, no entanto, o limoeiro “Cravo” manteve a tendência a absorver mais esse nutriente. A tendência a elevação no conteúdo de S no limoeiro “Cravo” e na laranjeira “Caipira” pode ser atribuída provavelmente a uma maior disponibilidade desse nutriente no substrato, em função não apenas das elevadas doses de P, mas também devido à adubação inicial de base, quando se supriu a

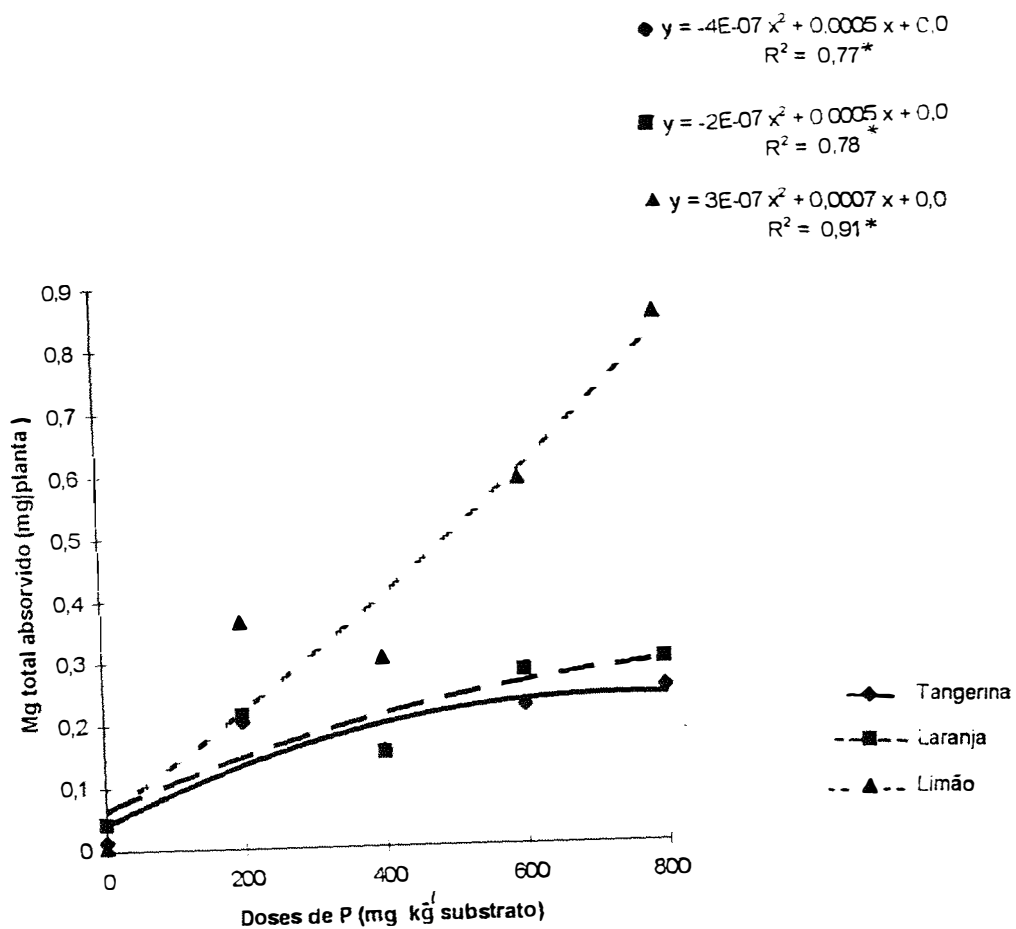


Figura 13. Efeito das doses de P sobre o magnésio total absorvido pelos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Média de 12 repetições.

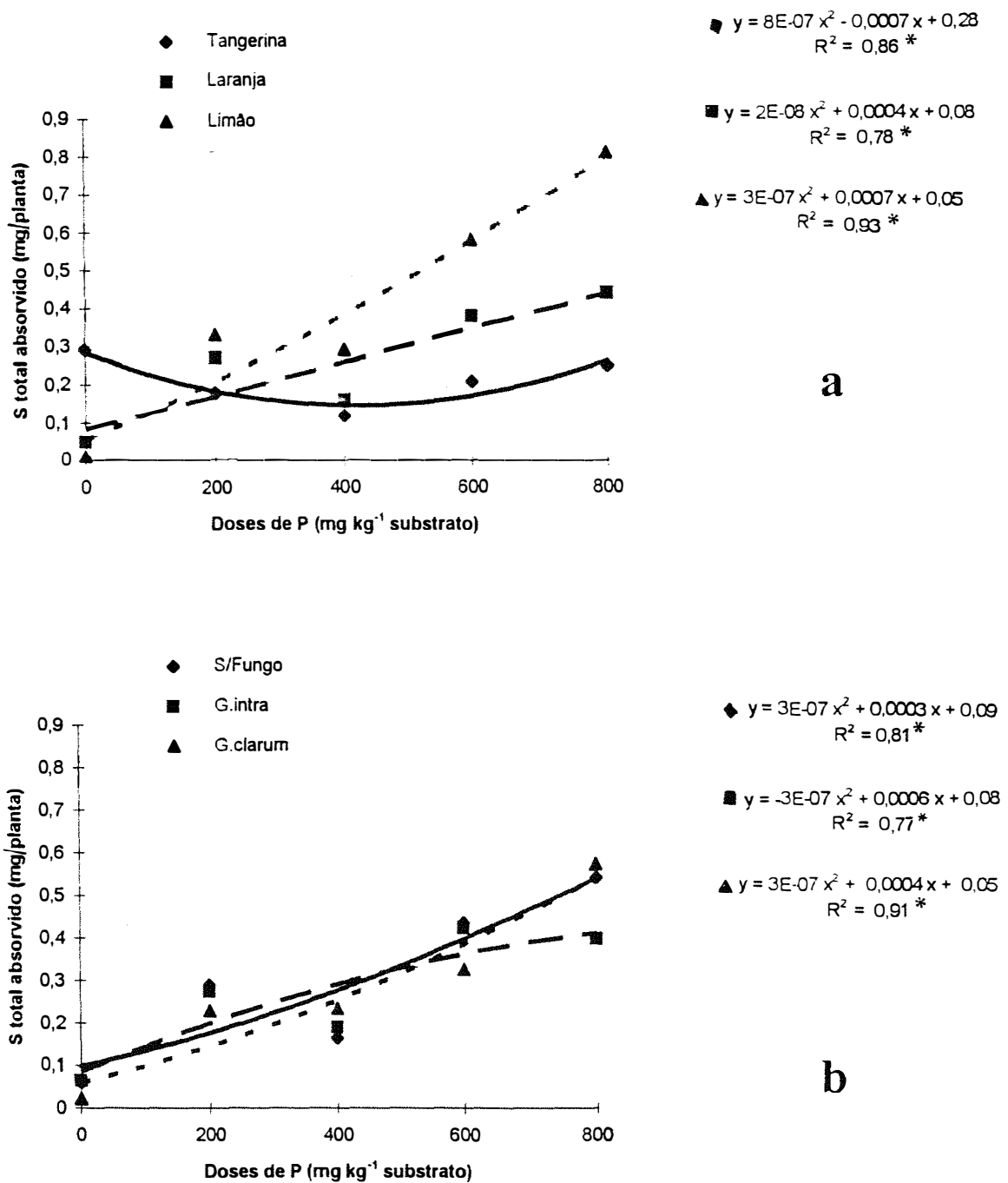


Figura 14. Efeito dos porta-enxertos (a) e da inoculação com fungos MA (b), dentro das doses de P, sobre o enxofre total absorvido. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

demanda de nitrogênio e de magnésio com fertilizantes que continham S em suas fórmulas. O que pode ser observado pela correlação positiva demonstrada nas equações da Figura 14 (a).

Com relação ao efeito dos fungos MA, a tendência de *G. intraradices* em reduzir a absorção do nutriente, quando se elevaram as doses de P no substrato, também foi mantida (Figura 14 b).

Com relação às doses de P, podemos observar (Figura 14) que os efeitos começam a se tornar mais diferenciados, a partir da dose 500 mg kg^{-1} de P. Ao contrário do que foi observado por Fonseca (1991), onde a inoculação com *G. clarum* não reduziu o conteúdo de S absorvido pelo limoeiro “Cravo”.

A tendência de aumento na absorção de S no material seco dos porta-enxertos estudados, entre outros fatores, pode ser atribuída à adubação básica inicial, quando se supriu o Mg e o N com adubos que continham S.

4.7.2. Micronutrientes

Os valores de “P”(nível de significância), para os conteúdos de Zn, Cu, Mn e Fe no material foliar seco da tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo” estão apresentados na Tabela 9.

4.7.2.1. Zinco

Com relação às quantidades de Zn absorvidas pelas plantas, houve um efeito da interação Doses de P x FMA (Tabela 9). Pode-se considerar que a partir daí, houve uma redução do Zn quando se adicionaram mais de 600 mg kg^{-1} de P ao substrato de cultivo, principalmente quando se utilizou como inóculo o fungo micorrízico arbuscular *G. intraradices* e as espécies de porta-enxerto, laranjeira “Caipira” e tangerineira “Cleópatra”. Embora exista um antagonismo natural entre o P e o Zn (Lambert *et al.* 1979), comparando-se as curvas de

regressão desses dois nutrientes, (Figura 10 (c) para P e Figura 15 para o Zn) observa-se que ambas mostram uma resposta semelhante nas plantas inoculadas com *G. intraradices*.

O aumento nas doses de P, pouco influenciaram a absorção de Zn pelo limoeiro “Cravo”, que apresentou uma tendência crescente em absorver o Zn, mesmo quando inoculado com o fungo *G. clarum* e cultivado em níveis de P acima dos 600 mg kg⁻¹ (Figura 15). O comportamento antagônico entre o Zn e o P é uma consequência da interação existente entre o P e o Zn na planta, a qual, segundo Olsen (1972), é estudada sob três aspectos principais: primeiro - diminuição na taxa de translocação do Zn das raízes para a parte aérea das plantas, como efeito das elevadas doses de P, que vão reduzir a disponibilidade do Zn devido à formação entre outras formas, do Zn₃(PO₄)₂ insolúvel; segundo - efeito da diluição da concentração do Zn na parte aérea, face a resposta de crescimento e à aplicação de P ao solo, e terceiro, ao distúrbio metabólico nas células da planta, devido ao desequilíbrio entre P e Zn causado pela interferência excessiva de P na função metabólica do Zn. Em alguns casos, o antagonismo aparente entre o P e o Zn, determinado pela redução no conteúdo de Zn absorvido, é função muito mais do efeito diluição decorrente da rápida taxa de crescimento das plantas adubadas com elevadas doses de P, do que do efeito do P por si só. Nesse trabalho contudo, não encontrou-se esse tipo de efeito, havendo uma tendência a um efeito semelhante do P com o Zn , especialmente quando utilizou-se inoculação com o endófito *G. intraradices*.

4.7.2.2. Cobre

Quanto ao teor de cobre (Cu), houve um efeito da interação Porta-enxerto x Doses de P e Porta enxerto x FMA (Tabela 9). A adição de doses de P tendeu a reduzir o conteúdo deste nutriente na massa do material foliar seco dos

Tabela 9. Valores de “P” obtidos na análise de variância dos micronutrientes: (Zn, Cu, Mn e Fe) absorvidos pelos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Piracicaba, 1997.

CAUSAS VARIAÇÃO	Zn	Cu	Mn	Fe
P-ENXERTO	0,00001*	0,00483*	0,00001*	0,00001*
DOSES P	0,00001*	0,00001*	0,00001*	0,00001*
FMA	ns	ns	ns	ns
PEN X DOS	0,00003*	ns	ns	0,00001*
PEN X FMA	ns	0,01442*	ns	0,00479*
DOS X FMA	0,02121*	ns	0,04598*	ns
PEN X DOS X FMA	ns	ns	ns	ns

*: *significante a 0,05 de probabilidade pelo teste “F”*. ns: *não significante*.

PEN: *Porta-enxerto*, DOS: *Doses de P*, P-ENXERTO: *Porta-enxerto*, FMA: *Fungo micorrízico arbuscular*.

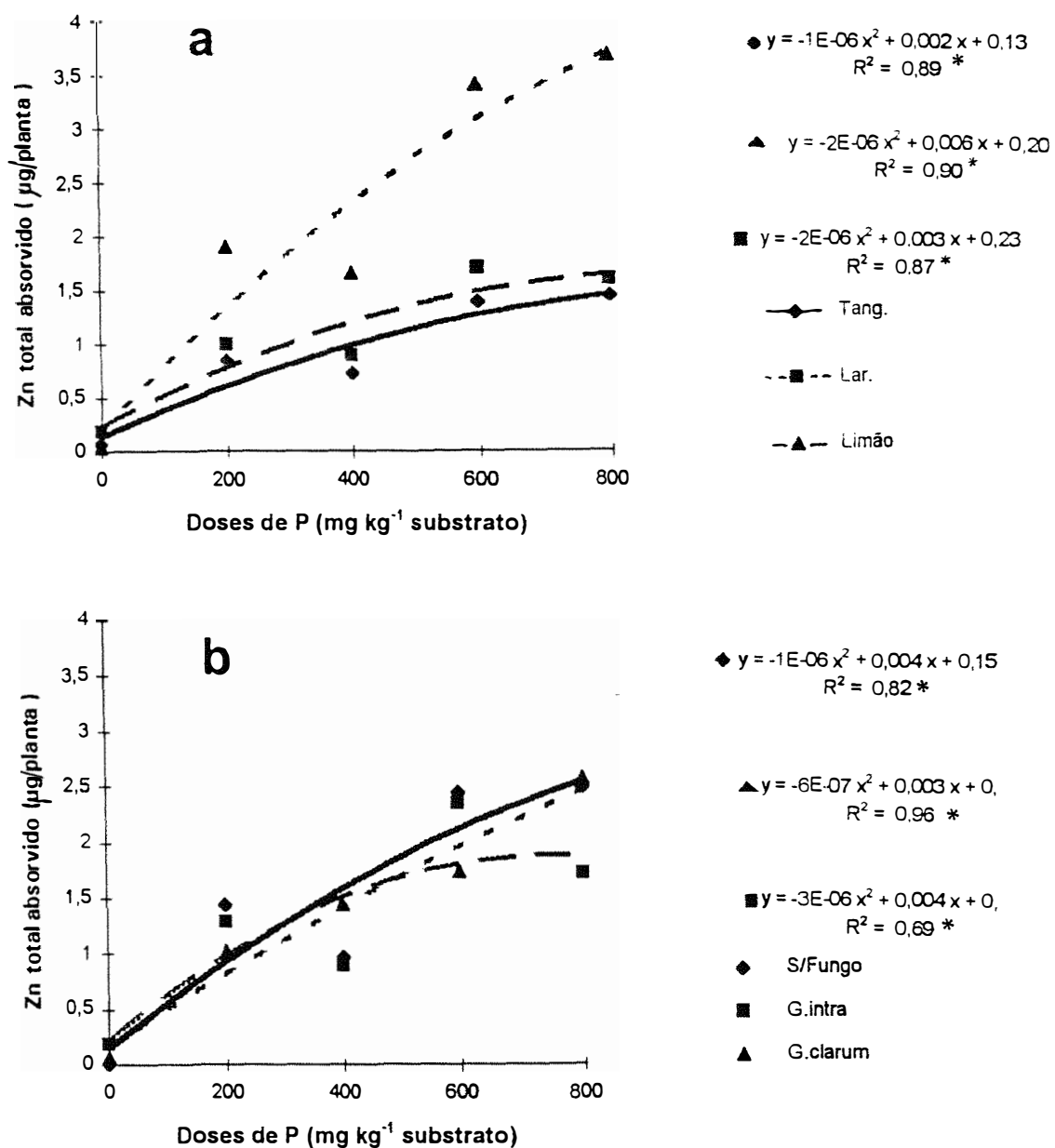


Figura 15. Efeito do porta-enxerto (a) e dos FMA (b) dentro das doses de P, sobre o zinco total absorvido pelas plantas. Média de 12 repetições. (*) : $P < 0,05$.

três porta-enxertos (Figura 16). Tal efeito poderia ser explicado pela redução no processo de absorção do Cu pelas plantas, devido a sua interação com o P no solo, formando compostos insolúveis como é o caso do $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ entre outras formas, numa inibição competitiva (Malavolta, 1980).

O efeito inibitório do P sobre a absorção de Cu por plantas cítricas em fase inicial de crescimento também foi relatado por outros autores (Graham & Timmer, 1984 e 1985). Deficiência de Cu tem sido observada após a aplicação de fertilizantes fosfatados em altas concentrações, não se conhecendo ainda o mecanismo preciso dessa indução, todavia, diversos fatores poderiam ser responsáveis por esse efeito. Um deles seria o estímulo provocado pelo P ao crescimento das plantas, até o suprimento de Cu no solo tornar-se limitante, caracterizando-se o efeito de diluição desse nutriente nos tecidos da planta (Nicoli, 1982). Outras causas de deficiência seriam: a precipitação do Cu pelo P dentro da raiz, na sua superfície e no solo e, ainda, a inibição da absorção do Cu pelo excesso de íons fosfato no solo (Timmer & Leyden, 1980).

A inoculação com fungos MA não apresentou resposta significativa sobre o Cu no material seco total das plantas (Figura 16). Embora a laranjeira “Caipira” inoculada com *G. clarum* tenha apresentado uma tendência a um valor maior desse nutriente em relação aos outros dois porta-enxertos, o que poderia ser justificado pelo efeito dos FMA, favorecendo a absorção deste micronutriente mesmo em presença dos elevados níveis de P.

Os resultados do presente trabalho indicam que as micorrizas são um importante componente sobre a absorção de Zn e Cu e que a maior causa do efeito do P sobre a absorção do Zn e do Cu nas plantas micorrizadas, ocorrem pela mesma razão, ou seja, o P induz à supressão da absorção pelos fungos MA.

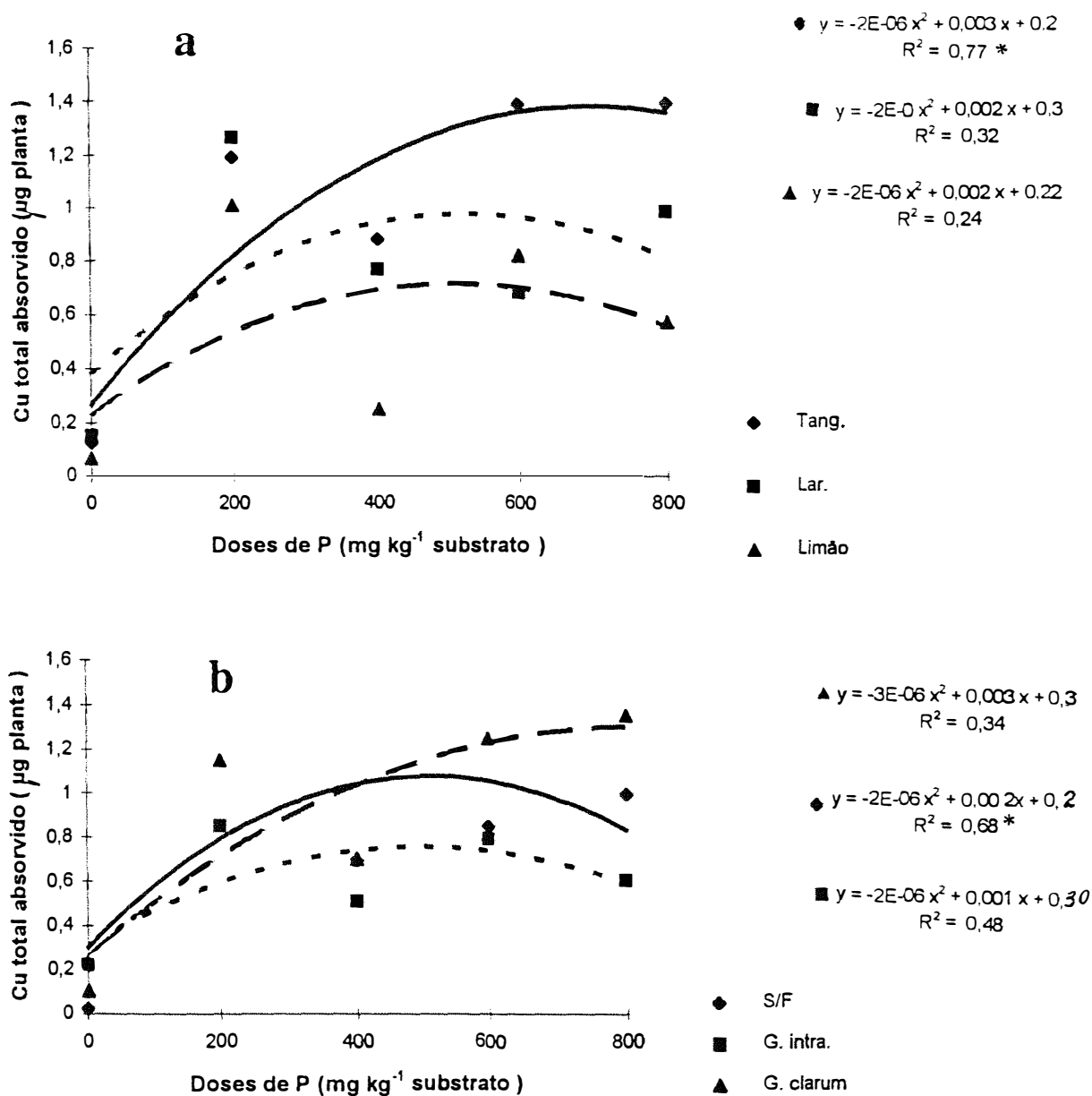


Figura 16. Efeito do porta-enxerto (a) e dos FMA (b) dentro das doses de P, sobre o cobre total absorvido pelas plantas. Média de 12 repetições. (*) : $P < 0,05$

4.7.2.3. Manganês

Quanto ao conteúdo de manganês (Mn), aumentos nos teores de P acarretaram numa elevação desse nutriente no material foliar seco dos três porta-enxertos de citros, todavia não houve efeito significativo das interações entre os fatores estudados (Tabela 9). Existem divergências quanto à resposta das plantas à adição de elevadas doses de P com relação ao teor de manganês, todavia, a elevação nos teores foliares em seedlings de laranja azeda, foram observadas como resposta à doses crescentes de P por Camargo (1989). Já para o limoeiro “Cravo” em sementeira, teores menores de Mn foram encontrados quando foram utilizadas doses de superfosfatos (Bueno, 1984; Carvalho, 1987).

Neste trabalho, a inoculação com fungos MA, em particular com o *G. intraradices* nas doses mais elevadas de P, tendeu a reduzir significativamente o teor desse micronutriente no material seco dos porta-enxertos (Figura 17).

Com relação ao efeito dos fungos MA sobre o teor de Mn na planta, Cardoso (1996), em uma revisão sobre a interação de P e Mn em plantas micorrizadas de soja discutiu que plantas não micorrizadas apresentavam sintomas de toxidez de Mn quando cultivadas em níveis elevados de P e que sob as mesmas condições, plantas micorrizadas não apresentavam esses sintomas. Esse tipo de efeito contudo, ainda não tinha sido observado em citros, uma vez que o mais comum tem sido o aumento do conteúdo de Mn no tecido de plantas micorrizadas (Menge 1983). Também, Manjunath *et al.* (1983), trabalhando com citros, encontraram aumentos significativos nos teores de alguns nutrientes como o P, Zn e Mn na parte aérea e raiz de plantas inoculadas com o fungo MA, *Glomus fasciculatum*.

A partir dos atuais resultados, pode-se sugerir um estudo mais detalhado dos efeitos promovidos pela interação dos endófitos utilizados neste trabalho com plantas cítricas, no sentido de se avaliar até que ponto a

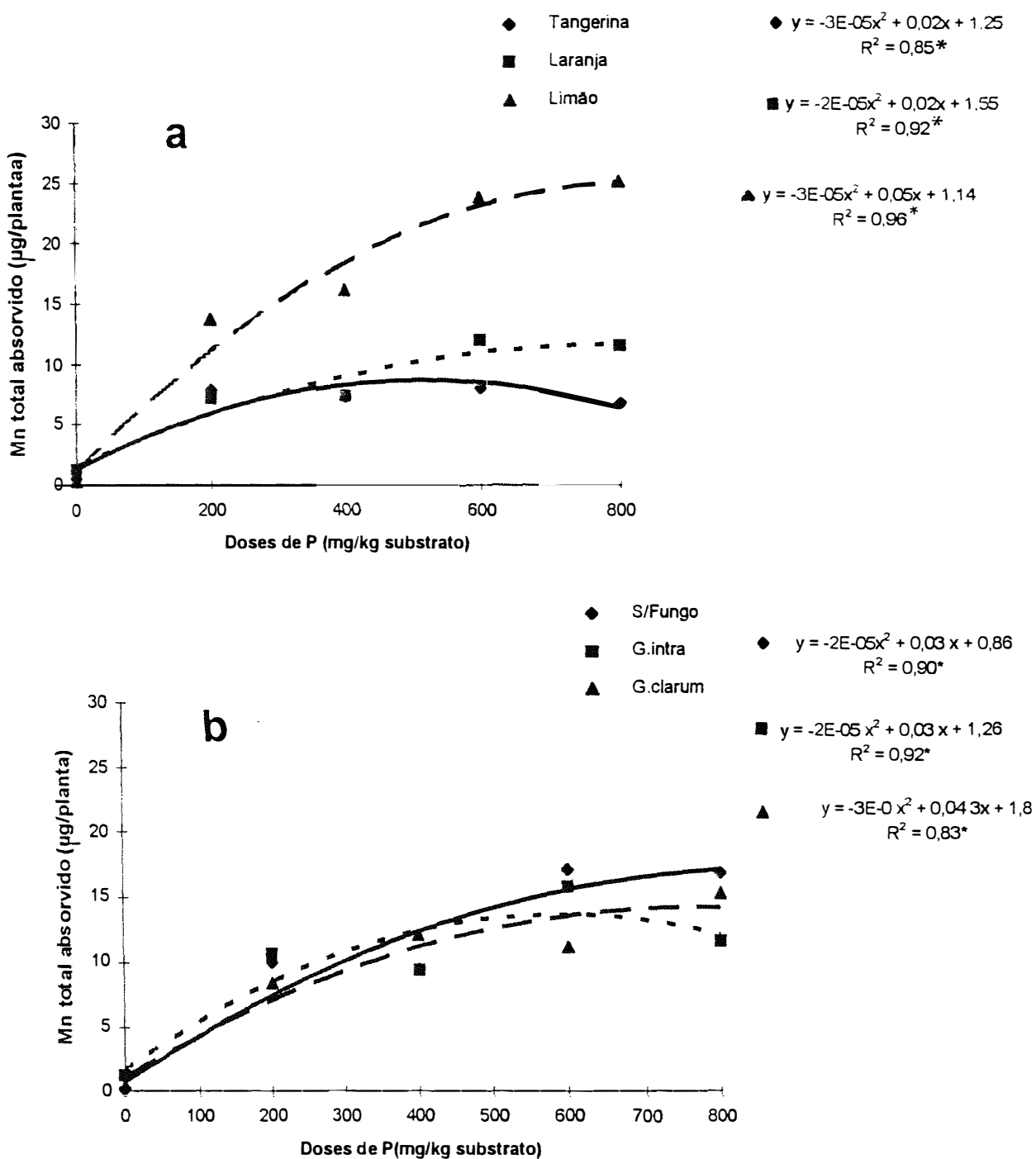


Figura 17. Efeito dos porta-enxertos (a) e da inoculação com fungos MA (b), dentro das doses de P, sobre o manganês total absorvido. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$

especificidade desses fungos pode influenciar as condições de absorção do Mn por essas plantas, quando cultivadas em elevados níveis de P (Figura 17).

4.7.2.4. Ferro

Os valores da análise de “P” (nível de significância) apresentados para os conteúdos de Fe demonstram que houve efeito da interação Doses de P x Porta-enxertos e da interação Porta-enxertos x FMA (Tabela 9). Dentre os três porta-enxertos, o limoeiro “Cravo” foi o único que apresentou uma correlação positiva entre o aumento das doses de P e o conteúdo de Fe absorvido pelas plantas, independentemente da inoculação com os FMA. A tangerineira “Cleópatra” e a laranjeira “Caipira” tenderam a absorver menos Fe, já a partir da dose 400 mg kg⁻¹, principalmente quando foram inoculadas com *G. intraradices* (Figura 18).

A absorção e a translocação de Fe assim como de Mn, pode ser antagonizada pelo P, Cu e Zn (Olsen, 1972), cujas concentrações geralmente são ampliadas pelas micorrizas, mas a probabilidade de que isto ocorra é maior, se as quantidades desses nutrientes no substrato, forem muito elevadas. Todavia, Lambert *et al.* (1979), trabalhando com milho e soja, não encontraram nenhum antagonismo entre o P, Cu e Zn com o Fe e o Mn, pois a interação entre o nível de P com a inoculação micorrízica aumentou significativamente o conteúdo de P, Cu, Zn e Mn, mas não o conteúdo de Fe no material seco das plantas.

Na literatura, são poucos os trabalhos que relatam aumentos no teor de Fe em plantas micorrizadas, pois o efeito das micorrizas sobre a absorção desse elemento, assim como do Mn, ainda não estão bem esclarecidos.

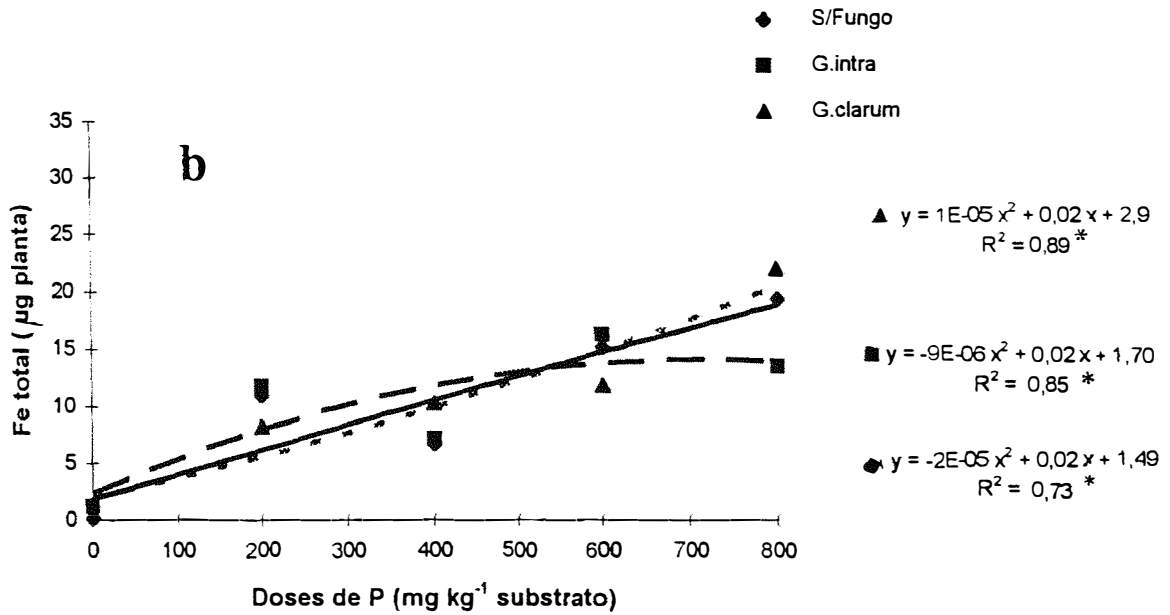
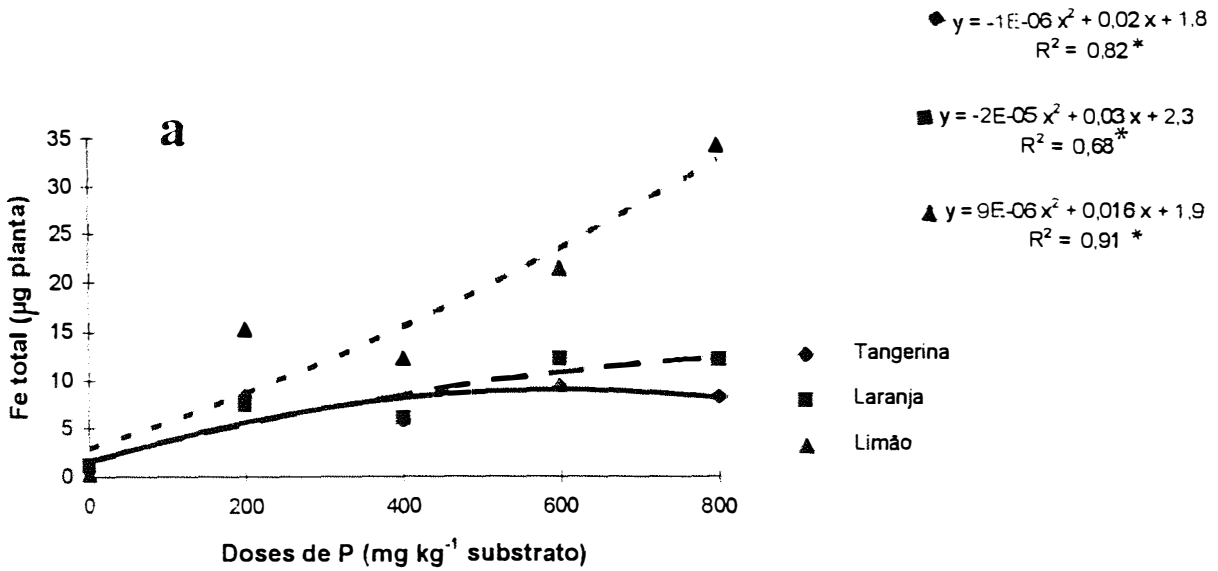


Figura 18. Efeito dos porta-enxertos (a) e dos F MA (b), dentro do fator doses de P sobre o ferro total absorvido. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

4.8. Teor de fósforo disponível no solo

Os teores de P no solo não apresentaram diferenças significativas com relação aos fungos micorrízicos arbusculares. Apenas as interações Doses de P x FMA e da tripla interação Porta-enxerto x Doses de P x FMA apresentaram um efeito significativo sobre o teor de P disponível no solo (Tabela 10).

De acordo com a Figura 19, os valores de P disponível observados foram diretamente proporcionais aos aumentos na dose de P aplicada ao solo, tanto para a tangerineira “Cleópatra”, quanto para o limoeiro “Cravo”, apenas a laranjeira “Caipira” apresentou uma tendência a reduzir o teor de P disponível no solo após a colheita, o que foi confirmado pela correlação (Figura 19 b). Isso poderia ser explicado pela maior absorção do P pela laranjeira “Caipira”, quando cultivada nas menores doses de P.

Como as MA representam um importante papel na absorção de P do solo, é importante dimensionar até que nível de P disponível no solo, essa associação pode favorecer o desenvolvimento das plantas.

Esse aumento no teor de P no substrato, decorrente da adição das doses de superfosfato triplo, concorda com os resultados obtidos por outros autores que encontraram uma elevação natural do nível de P disponível no solo após a colheita, sempre que adicionavam alguma fonte de P aos substratos de cultivo de várias espécies de citros (Bueno, 1984; Carvalho, 1987).

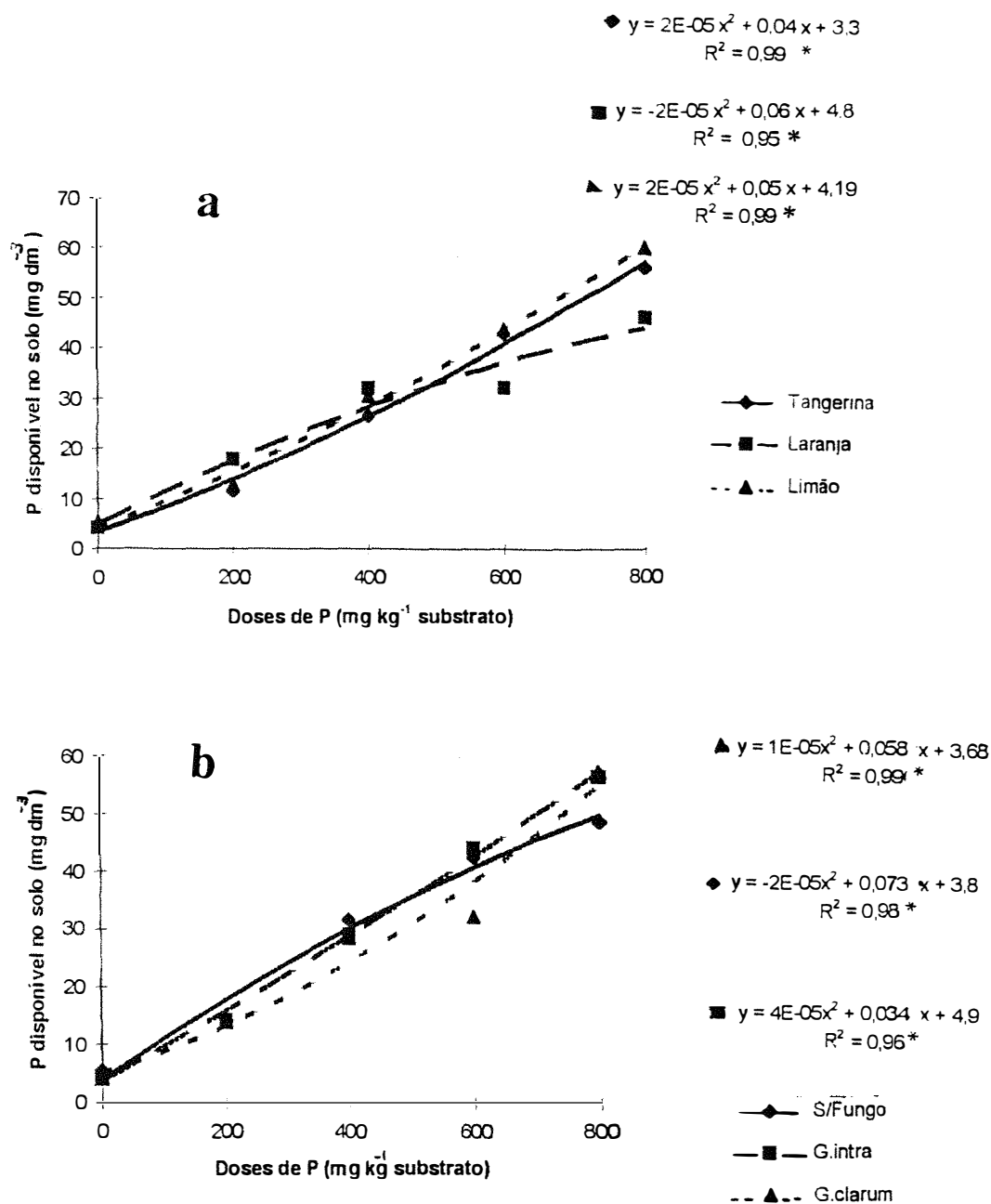


Figura 19. Efeito do fator porta-enxerto (a) e dos fungos MA (b) dentro do fator doses de P, sobre o fósforo total disponível no solo após a colheita. Média de 12 repetições. (*): $P < 0,05$.

Tabela 10. Valores de “P”(nível de significância) obtidos na análise de variância do P disponível no solo após o cultivo dos porta-enxertos, tangerineira “Cleópatra”, laranjeira “Caipira” e limoeiro “Cravo”. Piracicaba, 1997

CAUSAS VARIAÇÃO	P disponível no solo pós-cultivo
P-ENXERTO	0,03367*
DOSES P	0,00001*
FMA	ns
PEN X DOS	0,00048*
PEN X FMA	ns
DOS X FMA	0,01293*
PEN X DOS X FMA	0,03158*

*: significante a 0,05 de probabilidade pelo teste “F”, ns: não significante.

PEN: Porta-enxerto, DOS: Doses de P, P-ENXERTO: Porta-enxerto, FMA:

Fungo micorrízico arbuscular.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos a partir do experimento realizado permitiu concluir que:

- A dose de 600 mg kg^{-1} de P associada a FMA promoveu a depressão dos valores da : massa do material seco da parte aérea, da altura e do diâmetro do caule das plantas.

- Teores de P acima de 200 mg kg^{-1} reduziram o comprimento do micélio externo ativo (MEA) e elevaram o comprimento do micélio externo total (MET).

- A colonização radicular interna MA foi influenciada pela espécie utilizada como porta-enxerto, pela espécie do FMA e pelas doses de P (acima de 400 mg kg^{-1} de P não houve mais colonização).

- A absorção dos macro e micronutrientes foi favorecida com o aumento das doses de P até aproximadamente 600 mg kg^{-1} de P, a partir de onde tendeu a cair.

- Não se observou efeito antagônico dp P sobre a absorção deo Zn em quaisquer doses utilizadas.

- O Mn absorvido diminuiu nas plantas inoculadas com FMA, especialmente com *G. intraradices*.

- O P disponível após o cultivo aumentou com o teor de P do substrato.

- A diminuição da colonização interna radicular, do comprimento do MEA e o aumento do MET com o aumento das doses de P determinaram um desbalanço da relação entre a biomassa fúngica intra e extrarradicular.

-Em relação á conclusão anterior pode-se afirmar ainda que:

É provável que ocorra um balanço energético negativo entre a planta e o fungo, comprometendo a manutenção do sistema fungo-planta e causando a depressão do crescimento das plantas micorrizadas cultivadas em elevados níveis de P.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi in field soils. **Australia Journal Agricultural Research**, v. 32, p.621-630, 1981.
- ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D.; De BOER, G. The effect of phosphorus on the germination of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, v. 97, p.437-446, 1984.
- ANTUNES, V. Crescimento do limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* Osbeck) sob influência da inoculação com fungo micorrízico vesículo-arbusculares e da aplicação de fósforo. Piracicaba, 1987. 99p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz , Universidade de São Paulo.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E. J. B. N. O fósforo e a micorriza vesicular arbuscular no crescimento de porta-enxertos de citros cultivados em solo natural. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p.277-282, 1990.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E. J. B. N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**, v. 131, p.11-19, 1991.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: Noções básicas**, Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BETHLENFALVAY, G. J.; PACOVSKY, R. S.; BROWN, M. S. Measurement of Mycorrhizal infection in soybean. **Soil Science Society of America Journal**, v. 45, p.871-875, 1981.

- BIELESKI, R. L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24 p.225-252, 1973.
- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA. In: POWELL, C. L.; BAGYARAJ, D. J. (Ed.). **VA mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.53-53.
- BOWEN, G. D. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: NIKOLA, P. (Ed.). **Tropical mycorrhiza research**. Oxford University Press, 1980. p.165-190.
- BOWEN, G. D.; BEVEGE, D. I.; MOSSE, B. Phosphate physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B.; TINKER, P. B. (Ed.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.241-260.
- BUENO, D. M. Efeito do superfosfato triplo no crescimento inicial de porta-enxertos de citros em diferentes tipos de solos. Lavras, 1984. 176p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras. 1984. 176p.
- BUWALDA, J. G.; GOH, K. M. Host-fungus competition for carbon as cause of growth depressions in vesicular-mycorrhiza reygrass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, p.103-106, 1982.
- CAMARGO, I. P. Efeitos de doses, fontes de fósforo e de fungos micorrízicos sobre o limoeiro “Cravo” até a repicagem. Lavras, 1989. 104p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- CARDOSO, E. J. B. N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. (Ed.). **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 1996. p.304-306.

- CARDOSO, E. J. B. N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P. B.; OLIVEIRA, M. H. A. de Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbuscular em porta enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 10, p.25-30, 1986.
- CARDOSO FILHO, J. A. Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus etunicatum* e da atividade em simbiose com milho. Piracicaba, 1994. 119 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CARVALHO, S. A. Métodos de aplicação do superfosfato simples e do cálcario dolomítico no limoeiro "Cravo" em sementeira. Lavras, 1987. 124p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- CRUSH, J. R. Endomycorrhizas and legume growth in some soils the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zeland. **New Zeland Journal Agricultural Research**. v. 19, p.473-476, 1976.
- DOMERGUES, Y, R.; DIEM, H. G.; GANRY, F. **The effect of soil microorganisms on plant productivity**. Nairobi: ICRAF SOIL GROUP, 1979. p.26-31.
- DUC, G.; TROVELOT, A.; GIANINAZZI- PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. First report of non-mycorrhizal plant mutant (myc⁻) obtained in pea (*Pisum sativa* L.) and (*Vicia faba* L.). **Plant Science**, v. 60, p.2115-2122, 1989.
- FERNANDES, A. B.; SIQUEIRA, J. O.; MENESES, M. A. L.; GUEDES, G. A. A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose micorrízica em milho e soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 11, p.101-108, 1987.
- FONSECA, E. B. A. Efeitos de doses de superfosfato simples e de fungo micorrízico na formação de mudas de citros envasados. Lavras, 1991. 99p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

- FONSECA, E. B. A.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, M.; CARVALHO, J. G. Efeitos do fósforo e fungo MVA na nutrição de dois porta-enxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 12, p.1889-1896, 1994.
- GERDEMANN, J. W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J. G.; CLARKSON, D. T. (Ed.). **The development and function of roots**. London: Academic Press, p.575-591, 1975.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction British Mycological Society**, v. 46, p.235-246, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p.489-500, 1980.
- GRAHAM, J. H.; LINDERMAN, R. G.; MENGE, J. A. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus sp p* in reation to root colonization and growth of troyer citrange. **New Phytologist**, v. 91, p.183-189, 1982.
- GRAHAM, J. H.; SYLVERTSEN, J. P. Host determinants of mycorrhizal dependency of citrus rootstock seedlings. **New Phytologist**, v. 101, p.667-676, 1985.
- GRAHAM, J. H; TIMMER, L. W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae development and growth response of rough lemon in soil and soil less media: effect of phosphorus source. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p.118-121, Jan. 1984.
- GRAHAM, J. H; TIMMER, L. W. Rock phosphate as a source of phosphorus for vesicular-arbuscular mycorrhizae development and growth of citrus in a soil less medium effect of phosphorus source. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p.489-492, July 1985.

- HALL, I R.; JOHNSTONE, P. D; DOLBY, R. Interactions between endomycorrhizas and soil nitrogen and phosphorus on the growth of ryegrass. **New Phytologist**, v. 97, p.447-453, 1984.
- HATTING, M. J.; GERDEMANN, J. W. Inoculation of Brazilian Sour orange seed with an endomycorrhizal fungus. **Phytopathology**, v. 65, p.1013-1016, 1975.
- HAYMAN, D. S. Influence of soils and soil fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology**, v. 72, p.1119-1125, 1982.
- HAYMAN, D. S.; MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. growth of inoculated plants in phosphate-deficient soils. **New Phytologist**, v. 70, p.19-21, 1981.
- HEPPER, C. M. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **Soil Biology Biochemistry**, v. 9, p.15-18, 1977.
- HOAGLAND, O. R.; ARNON, O. I. The water-culture methods for growing plants without soil. California: Agric. Exp. Stn., 1950. 32p. (Circular, 37).
- ISLAM, R. **Effect of several *Endogone* spore types on the yield *Vigna unguiculata***. Internat. Inst. Trop. Agric., Ibadan: 1977. 19p.
- JAKOBSEN M. I.; ABBOTT, L. K; ROBSON, A. D. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. I. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. **New Phytologist**, v. 120, p.371-380, 1992.
- JASPER, D. A.; ROBSON, A. D. ; ABBOTT, L. K. Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 11, p.501-505, 1979.

- JENKINS, W. R. A rapid centrifugation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.
- KORMANIK, P. P.; MCGRAW, A. C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: SCHENCK, N. C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 244p.
- KRIKUM, J.; LEVY, Y. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on Citrus growth and mineral composition. **Phytoparasitica**, v. 8, p. 195-200, 1980.
- LAMBAIS, M. R.; CARDOSO, E. J. B. N. Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. I. Plant growth and development. **Plant and Soil**, v. 129, p.283-289, 1990.
- LAMBERT, D. H.; BAKER, D. E.; COLE, H. Jr. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. **Soil Science Society American Journal**. v. 43, p.976-980, 1979.
- LOPES, E. S. ; SIQUEIRA, J. O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 7, p.1-19, 1983.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: CERES, 1980, 251p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201p.
- MALAVOLTA, E.; HAAG, H. P.; MELLO, F. A. F.; CAMPONEZ SOBRINHO, B. M. O. **Nutrição mineral e adubação de plantas**. São Paulo, Pioneira, 1974. 752p.

- MANJUNATH, A.; MOHAN, R.; BAGYARAJ, D. J. Response of citrus to vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation in unsterile soils. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p.2729-2732, 1983.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 159, p.89-102, 1994.
- MELLONI, R. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. Piracicaba, 1996. 83p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M. A.; FREIRE, V. F.; CARDOSO, J. B. N. Efeito de doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de limão (*Citrus sinensis* L. Osbeck). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, 1996. **Trabalhos apresentados**. Resumo em CD-ROM, 1996.
- MENGE, J. A. Interactions between mycorrhizal fungi, soil fumigation and growth of grapes in California. **American Journal of Botany and Viticulture**, v. 34, n. 2, p.112-121, 1983.
- MENGE, J. A.; JOHNSON, E. L. V.; PLATT, R. G. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. **New Phytologist**, v. 81, p.553-559, 1978.
- MEYER, F. H. Distribution of Ectomycorrhizal in native and Manma de Forest. In: MARKS, G. S.; KOZ LOWSKI, T. T (Ed.). **Ectomycorrhizae**. New York: Academic Press, 1973. p.79-105.
- MIRANDA, J. C. C.; HARRIS, P. J.; WILD, A. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. **New Phytologist**, v. 112. p.405-410, 1989.

- MIRANDA, J.C.C.; SOUSA, D.M. G.; MIRANDA, L. N. Ocorrência de fungos endomicorrízicos nativos em um solo de cerrado do Distrito Federal e sua influência na absorção de fósforo por *Brachiaria decumbens* Stapf. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 5, p.102-105, 1981.
- MIRANDA, J. C. C.; SOUSA, D. M. G.; MIRANDA, L. N. Influência de fungos endomicorrízicos vesículo-arbusculares na absorção de fósforo e rendimento de matéria seca de plantas de sorgo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p.31-36, 1984.
- MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): New order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v. 37, p. 471-491, 1990.
- MOSSE, B. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture**. Hawaii: Institute for Tropical Agricultural and Human Resources, 1981, 81p. (Research Bulletin, 194).
- MOSSE, B.; HAYMAN, D. S.; IDE, G. J. Growth responses of plants in unsterilized soil to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Nature**, v. 224, p.1031-1032, 1969.
- NICOLI, A. M. Influência de fontes e níveis de fósforo no crescimento e nutrição mineral do limoeiro "Cravo" (*Citrus limonia* Osbeck) em vasos até a repicagem. Lavras, 1982. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- OLIVEIRA, A. A. R.; JESUS, E. S. Efeito da infecção por fungos micorrízicos vesículo-arbusculares sobre o desenvolvimento de porta-enxertos de citros. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, p.319-25, 1987.

- OLSEN, S. R. Micronutrient interactions. In: J. J. MORTVED (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. Soil Science Society of American, Madison, Wis. p.243-264, 1972.
- PANG, P. C.; PAUL, E. A. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ^{14}C and ^{15}N distribution in nodulated faba beans. **Canadian Journal Soil Science**, v. 60, p.241-250, 1980.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.; GRAHAM, J. H.; KIMBERLYN, W.; HOHGE, N. C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply: analysis of carbon cost. **Plant Physiology**, v. 101, p.1063-1071. 1993.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, A. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assesment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUES, O., VIÉGAS F., POMPEU JUNIOR, J. *et al.* **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p.265-280.
- QUI, J.; ISRAEL, D. W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plants. **Plant Physiology**, v.98, p.316-323, 1992.
- RAIJ, B. van ; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 31p. (Boletim Técnico, 81).
- READ, K.; HODSGSON, J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. The occurrence of infection. **New Phytologist**, v. 77, p.641-653, 1976.
- SALIBE, A. A. A. **Cultura dos citros**. 3.ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1974. 188p.

- SANDERS, F. E.; TINKER, P. B. Phosphate flow into mycorrhizal roots. **Pesticide Science**, v. 4, p. 385-395, 1973.
- SARRUGE, J. R. ; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. ESALQ, Departamento de Química. Piracicaba, 1974. 17p.
- SCHWAB, S. M.; MENGE, J. A.; LEONARD, R. T. Comparison of stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in sudangrass growth at two levels of phosphorus nutrition. **American Journal of Botany**, v. 70, p.1225-1232, 1983.
- SCHWAB, S. M.; MENGE, J. A.; TINKER, P. B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v. 117, p.387-398, 1991.
- SCHUBERT, A.; MARZACHI, M.; MAZZITELLI, M.; CRAVERO, M. C.; BONFANTE-FASOLO, P. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenck. **New Phytologist**, v. 107, p. 183-190, 1987.
- SILVA, J. O. B. Efeito do superfosfato simples e de seus nutrientes principais no crescimento do limoeiro "Cravo" (*Citrus limonia* Osbeck) em vasos até a repicagem. Lavras, 1981. 100p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- SILVA, L. R. C.; PEREIRA, J.; AZEVEDO, I. C. Efeito de fontes de fósforo sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* in vitro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p. 169-172. 1991.
- SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Efeito do fósforo e da micorriza vesículo-arbuscular na simbiose *Rhizobium*-feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 11, p. 31-36, 1987.
- SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N.; FAQUIN, V. Influência da micorriza VA no desenvolvimento do feijoeiro e nos parâmetros cinéticos de

- absorção radicular do fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. **Programas e resumos**. São Paulo: p.26.
- SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Efeito de MVA e rizóbio nos parâmetros cinéticos de absorção radicular de ^{32}P pela soja. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE MICORRIZAS, 1, Havana, 1990. **Resumos**. p.13.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988. cap.5, p.125-177: micorrizas.
- SIQUEIRA, J. O.; HUBBELL, D. H.; VALLE, R. R. Effect of phosphorus on formation of the vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 12, p.1465-1474, dec. 1984.
- SOUZA, E. F. O.; SOUZA, M.; OLIVEIRA, E. Efeito de fungos MVA e fósforo sobre o crescimento do limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck), pós repicagem. **Ciência Prática**, v. 15, n. 4, p. 398 - 404, out./dez. 1991.
- SYLVIA, D. M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. **Soil Biology Biochemistry**, v. 20, p. 39-43, 1988.
- SYLVIA, D. M. Quantificação of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Methods in Microbiology**, v. 24, p.54-65, 1992.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Comportamento de Laranjeira Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre diferentes porta-enxertos. Piracicaba, 1972. 71p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- THOMSON, B. D.; ROBSON, A.; ABBOTT, L. K. Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. **New Phytologist**, v. 103, p.751-765, 1986.

- TIMMER, L. W.; LEYDEN, R. F. The relationship of mycorrhizal infection to phosphorus-induced copper deficiency in sour orange seedlings. **New Phytologist**, v. 85, n. 1. p.15-23, May 1980.
- VILARIÑO, A.; ARINES, J.; SCHÜEPP, H. Extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 99-100, 1993.
- WOOLHOUSE, H. W. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B.; TINKER, M. P. B., (Ed.). **Endomycorrhizas**. London, Academic Press, 1975. p.209-239.
- ZAMBOLIN, L.; SIQUEIRA, J. O. **Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura**. Belo Horizonte: EPAMIG,1985. 36p. (EPAMIG Documentos, 26).