



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARTHA VIVIANA TORRES CELY

**PRODUÇÃO DE INÓCULO *IN VITRO* DE *Rhizophagus clarus* E SUA APLICAÇÃO EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

---

Londrina  
2014

MARTHA VIVIANA TORRES CELY

**PRODUÇÃO DE INÓCULO *IN VITRO* DE *Rhizophagus clarus* E SUA APLICAÇÃO EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Univeridade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C394p Cely, Martha Viviana Torres.  
Produção de inóculo *in vitro* de *Rhizophagus clarus* e sua aplicação em sistemas agrícolas / Martha Viviana Torres Cely. – Londrina, 2014.  
93 f.: il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.  
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Fungos micorrízicos – Teses. 2. Inoculação – Teses. 3. Plantas – Crescimento – Teses. 4. Microorganismos do solo – Teses. 5. Microbiologia agrícola – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 631.461

MARTHA VIVIANA TORRES CELY

**PRODUÇÃO DE INÓCULO *IN VITRO* DE *Rhizophagus clarus* E SUA  
APLICAÇÃO EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Waldemar Zangaro Filho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Maria Catarina Megumi Kasuka  
Universidade Federal de Viçosa - UFV

---

Dr. Arnaldo Colozzi Filho  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de Julho de 2014.

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, a meu namorado Alexander e ao grupo de trabalho do Laboratorio de Ecologia Microbiana.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro a Deus pela vida, por cada dia de aprendizado e por me permitir na sua infinita bondade realizar mais este objetivo de vida.

Ao Dr. Galdino Andrade, em primeiro lugar pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, a qual continua sendo uma das experiências mais valiosas da minha vida profissional, pela orientação neste trabalho, por todos os conhecimentos compartilhados e, em especial, pela amizade e apoio incondicional.

Aos integrantes da banca examinadora: Prof. Dr. Waldemar Zangaro Filho; Prof<sup>a</sup>. Dra Maria Catarina Megumi Kasuya; Dr. Arnaldo Colozzi Filho e Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira, pela disposição para a avaliação deste trabalho e as sugestões que contribuíram ao seu enriquecimento.

Aos professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina pela formação e orientação.

Ao professor Dr. Cássio Egídio Cavenagui Prete, coordenador da área de produção vegetal da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, e toda sua equipe técnica, pela colaboração na instalação e manutenção dos experimentos de campo.

Aos engenheiros agrônomos Guilherme Volante Garcia e James Bertalli, pela assessoria e acompanhamento técnico dos experimentos em campo.

À técnica do Laboratório de Ecologia Microbiana, Marta Salvador, por sua colaboração e apoio.

A todos os meus companheiros e amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana por sua amizade, pelas gratificantes jornadas de trabalho e pelos muitos momentos de lazer compartilhados.

À minha tia Rosalba por sua incansável luta para garantir meu direito à educação e por seu exemplo de coragem e dedicação.

Aos meus avós Abraham (*in memoriam*) e Elisa (*in memoriam*) pelos valores que me inculcaram, pela motivação, formação e carinho.

A minha irmã Sonia e meu cunhado Manuel, meus sobrinhos Lina e Juan Manuel, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu namorado Alexander, por seu carinho, apoio, compreensão e paciência em todos os momentos difíceis.

A todos os que de uma ou outra forma colaboraram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada !!!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

CELY, Martha Viviana Torres. **Produção de inóculo *in vitro* de *Rhizophagus clarus* e sua aplicação em sistemas agrícolas**. 2014. 93 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

A agricultura é um dos setores mais importantes da economia brasileira e está em constante desenvolvimento. A manutenção da produtividade agrícola requer o uso de fertilizantes, prática que pode ter alto impacto no meio ambiente e gerar altos custos de produção. Diante este cenário, é importante considerar o uso de alternativas que possam tanto diminuir o custo de produção como garantir um manejo mais adequado do solo através do aproveitamento de processos biológicos naturais. Uma destas alternativas é a associação micorrízica. O aproveitamento das vantagens da associação micorrízica em grandes áreas de lavoura, onde sua ocorrência natural pode ser diminuída pela própria atividade agrícola, pode ser feita através da inoculação, que ainda é restringida pela baixa disponibilidade de inoculantes comerciais. As técnicas de cultivo *in vitro* de fungos micorrízicos possibilita a obtenção de culturas axênicas com potencial para a produção em grande escala de inoculantes. Neste trabalho um isolado do fungo micorrízico arbuscular, *Rhizophagus clarus*, foi adaptado ao cultivo *in vitro* com o objetivo da produção de inóculos, os quais foram testados no desenvolvimento de soja (*Glycine max* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em condições de campo. A eficiência da inoculação micorrízica foi comparada com o uso de fertilizantes (NPK). Nestes experimentos foi observado que a inoculação de *R. clarus* tem um efeito positivo no desenvolvimento das culturas e no aumento da produção.

**Palavras-chave:** Inoculação. Produção. Crescimento. Agricultura

CELY, Martha Viviana Torres. **In vitro *Rhizophagus clarus* inoculum production and its application in agricultural systems**. 2014. 93 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

### **ABSTRACT**

Agriculture is one of the most important sectors of the Brazilian economy and is constantly developing. The maintenance of agricultural productivity requires the use of fertilizers, this practice can have high impact on the environment and generate high costs of production. In this way, it is important to consider the use of alternatives that can both reduce the cost of production and ensure a more adequate soil management through the use of natural biological processes, among these the mycorrhizal association. The application of mycorrhizal fungi (AMF) in large areas of farm, where their natural occurrence can be reduced by agricultural activity, must be through the inoculation, which is further restricted by the limited availability of commercial inoculants. The global research development of mycorrhizae have generated methodologies for in vitro cultivation of mycorrhizal fungi, enabling obtaining monoxenic cultures with potential for large scale production of AMF inoculum. In this work an isolate of mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* adapted to in vitro culture with the goal of inoculant production. These inoculums were tested in developing of soybean (*Glycine max* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under field conditions. The efficiency of mycorrhizal inoculation was compared to the use of fertilizers (NPK). In these experiments was observed that the inoculation with *R. clarus* has a positive effect on crop development and increased production.

**Key words:** Inoculation. Yield .Growth. Agriculture

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -	Reservas mundiais de gás natural em 2012. ....	18
<b>Figura 2</b> -	Reservas mundiais de fosfato em 2012. ....	19
<b>Figura 3</b> -	Reservas mundiais de potássio em 2012.....	20
<b>Figura 4</b> -	Diferentes estágios da colonização micorrízica. ....	25
<b>Figura 5</b> -	Índice de germinação (%) de esporos desinfetados em agar- água-MES em diferentes pH .....	43
<b>Figura 6</b> -	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Rhizophagus clarus</i> .....	44
<b>Figura 7</b> -	Dinâmica de crescimento de <i>Rizophagus clarus in vitro</i> no método de subcultura por fragmentos de gel .....	46
<b>Figura 8</b> -	Dinâmica de crescimento de <i>Rhizophagus clarus in vitro</i> no método de subcultura por raiz colonizada .....	47
<b>ARTIGO</b>		
<b>Fig 1</b> -	Effect of <i>R. clarus</i> on root colonization of two varieties of soybean at 30 days (A) and 80 days (B) .....	70
<b>Fig 2</b> -	Effect of AM inoculation on grain yield of two cultivars of soybean.....	72
<b>Fig 3</b> -	Correlation between shoot nutrients uptake and grain yield of soybean var BRS 13 .....	73
<b>Fig 4</b> -	Effect of AM inoculation on root colonization in cotton at 120 days after emergence (DAE).....	74
<b>Fig 5</b> -	Effect of <i>R. clarus</i> inoculation on lint cotton yield .....	76
<b>Fig 6</b> -	Correlation between shoot nutrients uptake and lint cotton yield .....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características químicas dos substratos utilizados nos experimentos de casa de vegetação. (SE) substrato estéril; (SNE) substrato não estéril .....	50
<b>Tabela 2</b> - Potencial de colonização do inóculo de <i>R. clarus</i> produzido in vitro em comparação com um inóculo convencional e seu efeito no desenvolvimento de plantas de algodão .....	51
<b>Tabela 3</b> - Potencial de colonização do inóculo de <i>R. clarus</i> produzido in vitro em comparação com um inóculo convencional e seu efeito no desenvolvimento de plantas de soja .....	53
<b>Tabela 4</b> – Colonização e produção de biomassa em algodão e soja após a inoculação de <i>R. clarus</i> produzido <i>in vitro</i> em sementes tratadas quimicamente .....	54
 <b>ARTIGO</b>	
<b>Table 1</b> - Soil properties of experimental areas .....	67
<b>Table 2</b> - Effect of AM inoculation on height, biomass and nutrients uptake in soybean plants at 80 DAE .....	71
<b>Table 3</b> - Effect of <i>R. clarus</i> inoculation on total shoot height, biomass, P and N shoot uptake of cotton plants at 120 DAE.....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1	VISÃO GERAL DO SETOR AGRÍCOLA BRASILEIRO.....	15
3.1.1	Importância do Setor Agrícola na Economia Brasileira .....	15
3.1.2	Principais Culturas .....	16
3.1.2	Consumo de Fertilizantes .....	17
3.1.2	Perspectivas Futuras em Relação à Manutenção da Produtividade .....	21
3.2	DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO SOLO .....	22
3.3	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA).....	23
3.3.1	Biologia e Desenvolvimento.....	23
3.3.2	Estabelecimento da Associação Simbiótica.....	24
3.3.3	Fatores que Regulam o Estabelecimento da MA.....	26
3.3.4	Princípios Fisiológicos dos Benefícios das MA às Plantas .....	27
3.3.5	FMA nos Sistemas Agrícolas .....	28
3.3.6	Multiplicação <i>in vitro</i> de FMA .....	29
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>ADAPATAÇÃO DO FMA <i>Rhizophagus clarus</i> AO CULTIVO <i>IN</i> <i>VITRO</i> E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO NO SOLO</b> .....	<b>39</b>
4.1	ADAPTAÇÃO DO FUNGO <i>Rhizophagus clarus</i> AO CULTIVO <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	40
4.1.1	Cultivo de Raízes Hospedeiras.....	40
4.1.2	Desinfecção de Propágulos .....	40

4.1.3	Germinação dos Esporos.....	41
4.1.4	Indução da Associação Micorrízica <i>in vitro</i> .....	41
4.1.5	Subcultivo de <i>R. clarus in vitro</i> .....	41
4.1.7	Análise Estatística.....	42
4.1.6	Resultados .....	42
4.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO DO INÓCULO DE <i>Rhizophagus clarus</i> PRODUZIDO <i>IN VITRO</i> .....	48
4.2.1	Experimento 1: Potencial de Colonização.....	48
4.2.2	Experimento 2: Colonização em Sementes com Tratamento Antifúngico .....	49
4.2.3	Análise Estatística.....	50
4.2.4	Resultados .....	50
4.3	DISCUSSÃO.....	55
<b>REFERENCIAS.....</b>		<b>58</b>
<b>ARTIGO:</b>	<b>Effect of <i>Rhizophagus clarus</i> inoculation on the growth and yield of soybean and cotton in a field conditions .....</b>	<b>63</b>
<b>PATENTE:</b>	<b>Processo de produção e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A grande dimensão do território brasileiro e sua diversidade de climas e solos permitem o desenvolvimento de uma ampla variedade de culturas, o que tem propiciado a expansão da agricultura à maioria das regiões do país. Este setor tem experimentado, nas últimas décadas, um intenso crescimento, tornando o Brasil em um dos maiores produtores e exportadores de produtos agrícolas do mundo. O rápido e contínuo desenvolvimento do setor agrícola brasileiro está sustentado no aumento das áreas plantadas, assim como também, na evolução das práticas culturais e na adoção de tecnologias que garantem a manutenção da produtividade. Neste sentido a manutenção dos níveis de nutrientes no solo, adequados para a nutrição das culturas é um dos grandes desafios da agricultura atual.

A disponibilidade de nutrientes no solo é influenciada por vários fatores, entre eles as características físicas e químicas, o clima, a cobertura vegetal e a atividade biológica dos microrganismos. Estes últimos participam de muitos processos que permitem a ciclagem dos nutrientes nos ambientes terrestres, porém na maioria dos ecossistemas agrícolas a sua atividade pode ser reduzida devido às práticas agrícolas.

Frente à necessidade de manter a produtividade nos sistemas agrícolas, a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes tem sido a prática mais comum. Porém diante da crescente demanda de insumos agrícolas tem sido evidente a necessidade da procura por alternativas que possam substituir ou diminuir o uso destes produtos, devido aos impactos negativos ao meio ambiente e ao fato de serem produzidos a partir de fontes não renováveis, o que leva à dependência apenas das reservas naturais existentes.

Neste sentido, o estudo dos microrganismos do solo que auxiliem na nutrição vegetal, entre estes os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), e seu potencial de aplicação na agricultura tem sido objeto de estudo desde há vários anos. No entanto, na atualidade, o uso de FMA na agricultura ainda é restringido devido à dificuldade tanto da produção de inóculo em grande escala, como também da inexistência de métodos de inoculação adaptados à agricultura de larga escala.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um pacote biotecnológico visando a multiplicação *in vitro* do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* para sua aplicação na agricultura

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a adaptação do fungo *R. clarus* ao cultivo *in vitro* em associação com raízes transformadas.
- Estabelecer uma metodologia de multiplicação do fungo *R. clarus* em condições axênicas visando a produção em grande escala de inóculo.
- Avaliar a eficiência do inóculo de *R. clarus* derivado da cultura *in vitro* no desenvolvimento de diferentes culturas em condições de campo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 VISÃO GERAL DO SETOR AGRÍCOLA BRASILEIRO

##### 3.1.1 Importância do Setor Agrícola na Economia Brasileira

Brasil ocupa uma área total de 851,1 milhões de hectares. Devido a suas dimensões continentais apresenta vários tipos de climas e solos, o que permite a exploração de uma ampla variedade de culturas. Nos últimos anos o setor agrícola tem ganhado importância no âmbito econômico. No ano de 2012, o agronegócio foi responsável por aproximadamente 21% do PIB (GOMES; BORÉM, 2013). Este é um setor dinâmico que continua crescendo. O total de área plantada na safra 2013/14 foi de 56,87 milhões de hectares, 6,2% acima do registrado na safra 2012/13 (CONAB, 2014a). As arrecadações pelas exportações do agronegócio brasileiro, em 2013, foram de US\$ 101,5 bilhões, valor 4% superior ao do ano anterior (BARROS et al., 2013).

O sistema agrícola brasileiro permite a coexistência da agricultura moderna, tecnicamente avançada e focada aos produtos de exportação, com uma produção de baixa tecnologia que sustenta o consumo interno (FAO, 2004). A grande visibilidade atual deste setor na economia nacional e no âmbito internacional é devida a que várias das principais culturas de exportação brasileira são consideradas *commodities*. *Commodity* é um termo de língua inglesa (plural: *commodities*), que significa mercadoria. O termo é usado como referência aos produtos de base em estado bruto (matérias-primas) ou com pequeno grau de industrialização, de qualidade quase uniforme, produzidos em grandes quantidades e por diferentes produtores. Estes produtos "*in natura*", cultivados ou de extração mineral, podem ser estocados por determinado período sem perda significativa de qualidade; possuem cotação global, o que lhes permite ser negociados nas bolsas de mercado internacional (MDIC, 2014). Segundo a FAOSTAT (2013) as principais *commodities* derivadas da agricultura brasileira são: soja em grão, açúcar, farelo de soja, milho, café, óleo de soja, suco de laranja; por consequência estas culturas aparecem entre as mais importantes do país.

### 3.1.2 Principais Culturas

Entre as principais culturas do Brasil destacam-se:

i) Soja: A soja (*Glycine max* L.) é uma planta cultivada em grande escala que tem boa adaptabilidade a diferentes solos e condições climáticas. Com um total de 30.105 mil hectares de área plantada, o Brasil figura como o segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA. A produção estimada do país em 2014 alcançou 86,5 milhões de toneladas, mostrando um aumento de 5,8% em relação ao ano de 2013. O estado de Mato Grosso é o principal produtor, participando com 30,5% do total da produção nacional, seguido pelo estado do Paraná com 17,0%, Rio Grande do Sul com 15,1%, Goiás com 10,2% e Mato Grosso do Sul com 7,3% (IBGE, 2014; CONAB, 2014a).

ii) Milho: O milho (*Zea mays* L.) é cultivado extensivamente em quase todo o território brasileiro, registrando um total de área plantada de 15.726 mil hectares para a safra 2013/2014. Sua importância econômica radica nas propriedades nutricionais que o fazem apto como fonte de alimento ou como matéria prima em vários processos industriais. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho após os Estados Unidos e a China (MIGUEL et al., 2014). A estimativa total de produção para a safra 2013/14 é de 77.887,1 mil toneladas; os estados com maior produção deste cereal são Minas Gerais, Goiás, Pará e Mato Grosso, sendo este último o maior produtor, responsável por 37,2% da produção nacional (IBGE, 2014).

iii) Café: O Brasil é responsável por aproximadamente 50% do total da produção mundial de café (*Coffea arábica*), o que o deixa no primeiro lugar entre os países produtores. A área total plantada com esta cultura no país totaliza 2.267.577,8 ha. A estimativa de produção do café arábica para o ano 2014 é de 1.982.527 toneladas ou 33,04 milhões de sacas de 60 kg. O principal produtor de café é Minas Gerais, o qual tem uma estimativa de produção de 1.380.758 toneladas de café ou 23,01 milhões de sacas de 60 kg (CONAB, 2014b).

iv) Algodão: Atualmente nas regiões produtoras do país, a área plantada com algodão (*Gyssypium hirsutum* L.) para a safra 2013/14 é de 1.102,8 mil hectares. A produção nacional de algodão deve atingir 4.343.626 toneladas (IBGE, 2014). O estado do Mato Grosso é o líder na produção brasileira, responsável por 56% do total da produção do país, a estimativa de área plantada na

safra 2013/14 é de 627,4 mil hectares, seguido do estado da Bahia com uma área de 319,4 mil hectares, e Goiás atingindo 51,6 mil hectares (CONAB, 2014a).

v) Cana-de-açúcar: A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. A área cultivada na safra 2013/14 foi de 8.811,43 mil hectares, distribuídas em todos os estados produtores. São Paulo é o maior produtor com 51,7% da área plantada (4.552,0 mil hectares), seguido por Goiás com 9,3% (818,4 mil hectares), Minas Gerais com 8,9% (779,8 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,4% (654,5 mil hectares), Paraná com 6,7% (586,4 mil hectares), Alagoas com 4,7% (417,5 mil hectares) e Pernambuco com 3,2% (284,6 mil hectares). Estes sete estados são responsáveis por 91,9% da produção nacional. Os demais estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 3,0%. A produção total da safra atual foi de 658,8 milhões de toneladas de cana moída e 38,34 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2014c).

### 3.1.2 Consumo de Fertilizantes

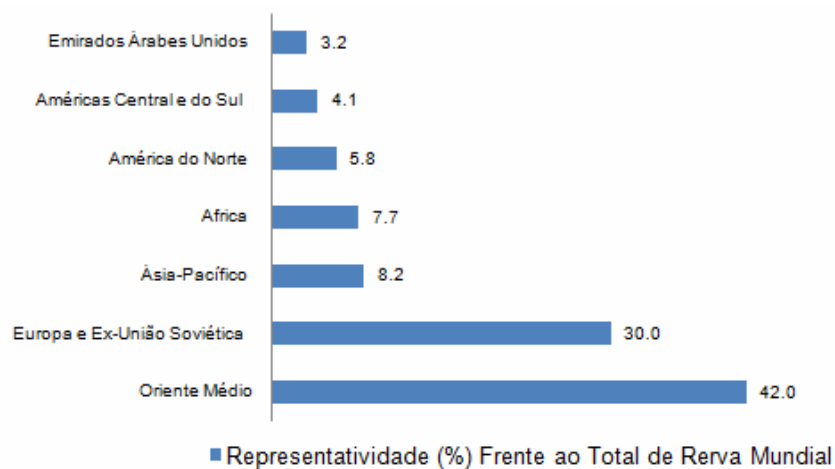
O crescimento da agricultura brasileira foi possível não só graças à expansão da área plantada mas também devido à adoção de práticas que permitiram melhorar a produtividade das culturas. Neste sentido, o uso de fertilizantes químicos tem sido a principal estratégia, sendo esta uma prática global. (FAO, 2004). A demanda mundial de fertilizantes (NPK) no ano de 2011 foi de 172,2 Mt (megatoneladas); apresentando um crescimento de 1,5% em relação ao consumo registrado em 2008 (168,9 Mt). O Brasil com 11,6 Mt (6%) ocupa o quinto lugar entre os países com maior consumo de fertilizantes; este valor corresponde a 3,3 Mt de N (2,7%); 3,9 Mt de  $P_2O_5$  (8,4%); 4,4 Mt de  $K_2O$  (14,2%). As culturas que registraram uma maior demanda de fertilizantes são a soja (48%), o milho (20%) e a cana-de-açúcar (15%); esse percentual não está só determinado pelas exigências nutricionais como também pela intensificação de cada cultura, ou seja, o total de área plantada (IFA, 2013).

O Brasil produz apenas 25% dos fertilizantes que consome (2,97 Mt); discriminado em 0,78 Mt (25%) de N; 1,89 Mt (63%) de  $P_2O_5$  e 0,30 Mt (12%) de  $K_2O$ . A quantidade restante para suprir a demanda nacional é fornecida pelas importações que no ano de 2013 foram de 8,63 Mt (IFADATA, 2014). A expectativa

para os próximos anos é que a demanda de fertilizantes no Brasil continue a crescer, impulsionando a produção agrícola brasileira, que hoje é um dos principais setores da economia do país. Frente a este cenário é importante analisar as reservas disponíveis para a fabricação de fertilizantes.

A amônia é a fonte básica do nitrogênio utilizada na fabricação da maioria dos fertilizantes nitrogenados (incluindo a ureia). O processo de fabricação da amônia utiliza gás natural e ar como matéria prima, sendo necessários cerca de 1.230 m<sup>3</sup> de gás para a produção de uma tonelada de amônia. Este processo é o mais comumente utilizado na atualidade. A análise das reservas de fertilizantes nitrogenados é orientada ao estudo das reservas de gás natural ainda que apenas 5% do consumo anual de gás sejam destinados à produção de amônia (FIXEN, 2009). As principais reservas de gás natural estão localizadas nos países do Oriente Médio (42%) e na região da Europa e na ex-União Soviética (Figura 1). No Oriente Médio, o Irã (33,62 trilhões de m<sup>3</sup>) e o Catar (25,06 trilhões de m<sup>3</sup>) são os países com as maiores reservas; já na ex-União Soviética, a Rússia é o país com as reservas mais representativas (33,27 trilhões de m<sup>3</sup>); o Brasil tem uma reserva de aproximadamente 0,5 trilhões de m<sup>3</sup> (ANP, 2013). Os maiores fabricantes de adubos nitrogenados (ureia e amônia) são a China, com 35% da produção mundial, e a Rússia, com 6%, seguidos pelos Estados Unidos, com 5%; outros países como a Indonésia e o Catar participam com menos dos 3% da produção mundial (IFA, 2014).

**Figura 1 - Reservas mundiais de gás natural em 2012**



**Fonte:** Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2013)

No caso dos adubos fosfatados, a rocha fosfórica é a principal matéria prima. Existem dois tipos de rocha fosfórica: ígnea e sedimentar; a maior parte das explorações destinadas à produção de adubos fosfatados é feita a partir de rocha sedimentar (FIXEN, 2009). Em 2012, a reserva mundial total deste mineral era de 67.000.000 Mt. Aproximadamente 70% destas reservas estão localizadas em Marrocos e no Saara Ocidental (Figura 2); a segunda maior reserva está localizada na China (5.5%) e o Brasil possui um total de 270.000 Mt, que equivale a 0,4 % do total da reserva mundial (USGS, 2013). No panorama global, o maior produtor de adubos fosfatados é a China (60%), seguida dos Estados Unidos e do Marrocos, que apesar de possuir a maior reserva de rocha fosfórica, está em terceiro lugar (22%) entre os produtores de fertilizantes fosfatados. Outros países, como a Rússia (8%), a Jordânia (5%) e o Brasil (5%) também contribuem para a produção total (IFA, 2014).

**Figura 2-** Reservas mundiais de fosfato em 2012



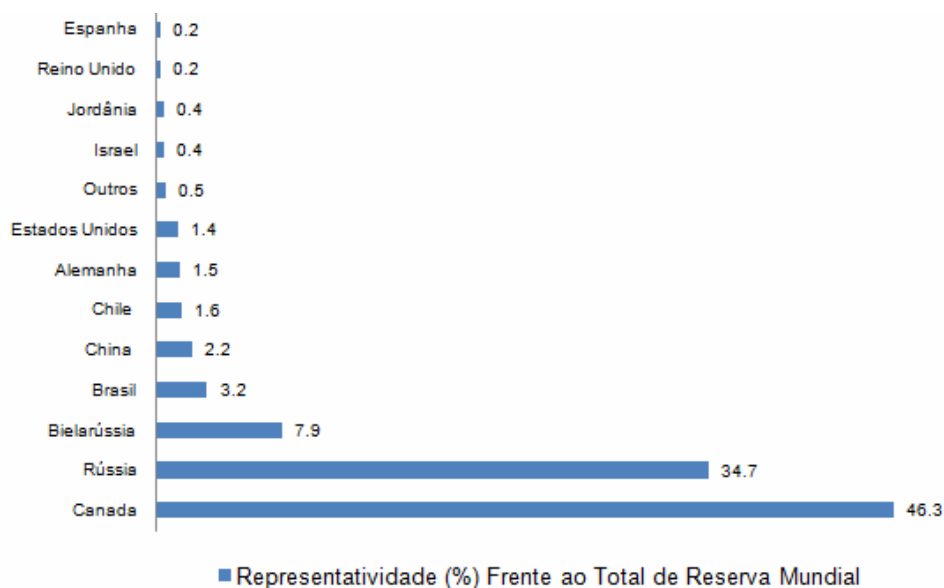
**Fonte:** United States Geological Survey (2013).

O fósforo recebe uma atenção especial nas regiões tropicais porque suas características químicas interferem na sua disponibilidade dada sua interação com o componente químico dos solos. Uma grande extensão dos solos brasileiros, aproximadamente 10 milhões de hectares é do tipo latossolo, com características de

pH ácido, alto teor de óxidos e hidróxidos de Fe e Al e baixa capacidade de troca catiônica, fatores que determinam uma alta complexidade no manejo dos fertilizantes fosfatados. Em solos com estas características o fósforo é adsorvido pelos óxidos de Fe e Al tornando-se indisponível para absorção pelas culturas, o que torna necessária a aplicação de alta quantidade de fertilizantes fosfatados para atender a demanda das culturas (LAPIDO-LOUREIRO; MELAMED, 2008).

O potássio é extraído a partir de vários minerais, entre eles a silvita (KCl), a silvinita (KCl + NaCl) e a langbeinita ( $K_2SO_4 \cdot MgSO_4$ ). As reservas deste nutriente estão constituídas por camadas sedimentares de sal, remanescentes de mares extintos (FIXEN, 2009). A maior parte destas reservas estão localizadas no Canadá (46,3%), na Rússia (34,7%) e na Bielorrússia (7,9%) (Figura 3). O Brasil possui menos de 5% das reservas mundiais destes minerais (USGS, 2013). O principal produtor de adubos potássicos é o Canadá (30%), seguido da Rússia (20%) e da Bielorrússia (16%), outros países, como Alemanha (9,7%), China (8%), Israel e Espanha (9,4%) contribuem em menor proporção para a produção total mundial (IFA, 2014). O Brasil não tem participação significativa na produção mundial de potássio com alta dependência da produção externa pois, como citado anteriormente, produz apenas 12% da demanda interna.

**Figura 3 - Reservas mundiais de potássio em 2012**



**Fonte:** United States Geological Survey (2013).

As reservas até agora existentes são suficientes para a demanda atual e a futura prevista. Mas na medida em que os recursos de mais fácil extração sejam consumidos pode ocorrer uma alta nos valores dos fertilizantes. O maior problema para o Brasil, neste contexto, é que a indústria de produção de fertilizantes, a partir de materiais minerais existentes no país, se desenvolve em ritmo menor do que o crescimento da demanda. Segundo a ANDA (Associação Nacional para Difusão de Adubos) para que o Brasil supere a atual dependência das importações de fertilizantes serão necessários altos investimentos, especialmente na produção de nitrogênio e potássio e melhorar a produção de fosfatos. Por outro lado é indispensável chamar a atenção para o fato de que as fontes de cada um destes nutrientes são não-renováveis e que o futuro da agricultura depende do uso racional destes.

### 3.1.2 Perspectivas Futuras em Relação à Manutenção da Produtividade

Segundo a visão 2014-2034 da EMBRAPA (2014), o setor agrícola está sendo cada vez mais pressionado a aumentar a eficiência do uso dos fertilizantes e agroquímicos, isto significa produzir mais com um determinado nível de insumos ou produzir a mesma quantidade com menos insumos. Diante deste desafio a tecnologia se torna a ferramenta mais importante, tanto para aumentar a eficiência de uso dos insumos quanto para desenvolver alternativas que permitam a substituição eficiente de produtos à base de recursos não-renováveis. Em respeito às alternativas de substituição, diz a EMBRAPA:

[...] é imprescindível, ademais, que se busquem por fontes alternativas de nutrientes, como fósforo, via biodisponibilização, por meio do uso de minerais autóctones, e que se viabilize a fixação biológica de nitrogênio no maior número possível de espécies, incluindo as gramíneas. Esses são exemplos de tecnologias essenciais, que poderão mudar definitivamente a capacidade competitiva da agricultura nos trópicos e subtropicais.

A partir do anteriormente exposto podemos concluir que é totalmente necessária a busca por tecnologias baseadas na dinâmica natural dos ecossistemas que permitam gerar as alternativas biotecnológicas de que tanto precisa o setor agrícola para a manutenção da produtividade agrícola e da segurança alimentar.

### 3.2 DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO SOLO

O solo é considerado um ecossistema que alberga uma alta diversidade de organismos (bactérias, fungos, microfauna, mesofauna e macrofauna), formando uma complexa comunidade biológica. Neste ambiente, os microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetes e algas) são as formas de vida mais abundantes e participam de forma ativa na disponibilidade dos nutrientes (C, N, P) através da sua atividade biológica, pela degradação de resíduos orgânicos e a solubilização de fontes inorgânicas (BARGETT, 2005). Os microrganismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com os processos biológicos que realizam no ecossistema; desta forma são separados conforme sua capacidade de transformar compostos orgânicos e pela utilização de formas inorgânicas.

De acordo com a sua participação nas transformações dos nutrientes, os microrganismos do solo constituem diferentes grupos denominados grupos funcionais. Alguns dos mais importantes no solo são: i) relacionados ao ciclo do N (amonificadores, fixadores de nitrogênio, desnitrificantes, nitratores e nitritadores); ii) relacionados ao ciclo do C (celulolíticos, amilolíticos, proteolíticos) e iii) relacionados ao ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos) (ANDRADE, 2004). A alta diversidade da microbiota do solo está geralmente associada à elevada estabilidade da comunidade microbiana, onde cada população desempenha um papel funcional que determina a manutenção dos fluxos de matéria e de energia em cada nível trófico de um ecossistema. A manutenção desta diversidade funcional no solo tem sido relacionada à estabilidade, produtividade e resiliência dos sistemas terrestres (KUHAD et al., 2004).

O complexo processo de evolução da comunidade microbiana do solo tem contribuído ao enriquecimento das interações entre populações de microrganismos e destes com as plantas. A interação entre microrganismos e plantas, especificamente nas raízes, suplementa importantes requerimentos nutricionais tanto para as plantas como para os microrganismos associados. Desta forma, assim como as raízes afetam diretamente as populações microbianas que as rodeiam, os microrganismos presentes na rizosfera (porção do solo que tem contato direto com as raízes das plantas) podem influenciar o crescimento vegetal (GIRI et al., 2005). As espécies bacterianas que colonizam as raízes e promovem o

crescimento vegetal são chamadas rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR). Dentre as rizobactérias, as fixadoras de Nitrogênio (N) podem ou não formar simbiose com espécies leguminosas, resultando em uma interação benéfica para o crescimento das mesmas (PHILIPPOT; GERMON, 2005; VESSEY, 2003). Outro grupo importante de microrganismos do solo são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que formam associações simbióticas com as plantas; esta associação desempenha um papel muito importante na produtividade vegetal.

### 3.3 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)

#### 3.3.1 Biologia e Desenvolvimento

Os FMA pertencem ao filo *Glomeromycota*, Classe *Glomeromycetes* (glomeromicetos); são organismos biotróficos obrigatórios que se associam às raízes das plantas vasculares terrestres, epífitas, aquáticas e também com rizóides e talos de briófitas, formando uma relação simbiótica mutualista denominada micorriza arbuscular (MA). A natureza biotrófica obrigatória dos FMA é uma característica esperada em simbioses altamente evoluídas em que o microssimbionte (fungo) se torna totalmente dependente do macrossimbionte (planta) para seu crescimento e reprodução (de SOUZA et al., 2010).

Em termos de distribuição geográfica e cobertura filogenética no reino vegetal, a MA é provavelmente a simbiose com maior abrangência na terra (GUTJAHR; PARNISKE, 2013). A origem evolutiva desta relação simbiótica ainda é pouco elucidada mas se acredita que esta simbiose já estava presente nas espécies de plantas da flora terrestre primordial indicando uma origem ancestral tanto dos FMA quanto da MA (de SOUZA et al., 2008). O registro fóssil de esporos e hifas similares aos atuais glomeromicetos é do segundo período da Era Paleozóica, que data de 460 milhões de anos atrás. A ocorrência da MA em plantas terrestres mais primitivas (classe Hepaticae, divisão Briofita) dá suporte à hipótese que os FMA foram fundamentais para a colonização inicial do ambiente terrestre pelas plantas (CAIRNEY, 2000).

Os FMA apresentam desenvolvimento de um micélio asseptado (cenocítico) e formam esporos de grande tamanho (acima de 500  $\mu\text{m}$ ). Não apresentam ciclo sexual, mas eventos de recombinação por anastomose entre hifas

de indivíduos geneticamente diferentes têm sido descritos como o principal mecanismo que permite a manutenção da diversidade genética destes fungos (GIOVANNETTI et al., 2010). Os glomeromicetos são considerados um grupo monofilético por compartilharem uma característica em comum: a formação de arbúsculos como estrutura de troca de nutrientes. A colonização radicular ocorre nas células do córtex e é mediada por interações genéticas, morfológicas e funcionais entre FMA e plantas (SMITH; READ, 2008 a).

### 3.3.2 Estabelecimento da Associação Simbiótica

A colonização das raízes por FMA no solo pode surgir a partir de três fontes principais de inóculo: esporos, fragmentos de raízes colonizadas e hifas, denominados coletivamente como propágulos. Por um longo período de tempo os esporos foram considerados os propágulos mais importantes nos FMA ou, talvez, os únicos. Porém, a germinação destes em algumas espécies pode ser variável e lenta, proporcionando um reservatório de inóculo que persiste por muitos anos, mas que nem sempre pode ser importante no início da colonização dos sistemas radiculares. Em muitos habitats, as redes de hifas e os fragmentos de raízes colonizadas são os principais meios pelos quais as plantas são colonizadas, com a presença de uma alta densidade de esporos (SMITH; READ, 2008 a).

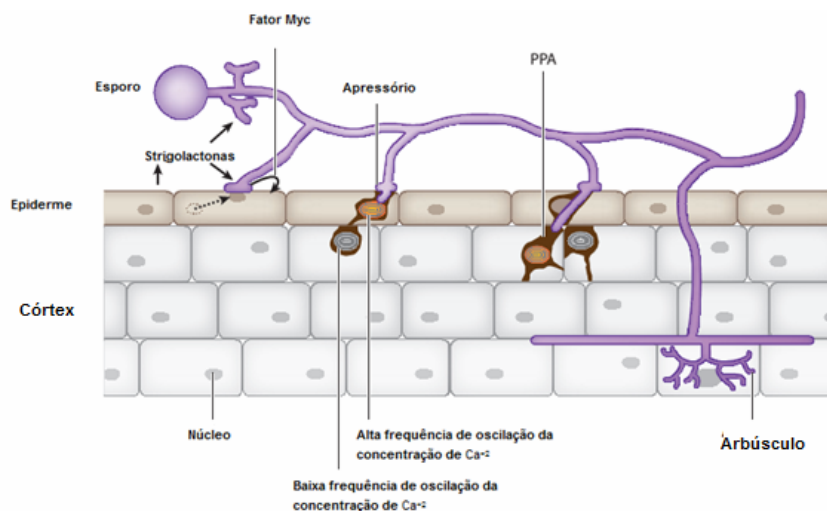
O estabelecimento da associação simbiótica chamada de MA pode ser dividida em distintas fases caracterizadas pelo grau de progressão das hifas do FMA durante a colonização da raiz.

A colonização começa com a troca recíproca de sinais difusíveis entre os FMA e as plantas, fase denominada de sinalização e percepção ou “fase pré-simbiótica”. A fase pré-simbiótica é caracterizada pela ramificação das hifas, resposta induzida pelo reconhecimento de compostos (estrigolactonas) produzidos pelas plantas e denominados fatores de ramificação (AKIYAMA; HAYASHI, 2006). Tem sido demonstrado que a quantidade destes compostos nos exsudados das raízes aumenta em plantas sob estresse por baixa disponibilidade de fósforo, levando a um aumento na colonização micorrízica (NAGAHASHI et al., 2010).

O contato entre as hifas e a raiz é seguido pela adesão da hifa à superfície radicular através da formação de uma estrutura de infecção denominada apressório. O mecanismo de penetração da hifa através das células da epiderme da

raiz inclui uma série de eventos que começam a ser desencadeados pela formação do apressório; basicamente o núcleo da célula epidérmica se movimenta em direção ao apressório formando uma estrutura densa constituída por vesículas provenientes do retículo endoplasmático, filamentos de actina e microtúbulos ao redor do ponto de contato. Consecutivamente, o núcleo migra para o ponto oposto da célula epidérmica formando um espaço citoplasmático que contém o aparato de pré-penetração (PPA) que liga o núcleo com a sua posição original abaixo do apressório. A formação do PPA predetermina o caminho de entrada do fungo nas células. O alongamento da hifa, uma vez que penetra as células epidérmicas e consecutivamente as corticais, é facilitado pela oscilação nas concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$  no citoplasma vegetal. A oscilação do  $\text{Ca}^{+2}$  no citoplasma está relacionada com a indução da expressão de genes relacionados à infecção micorrízica, análogos aos induzidos pelo gênero *Rhizobium* na formação dos nódulos e ativados quando o fungo entra em contato com a raiz (GUTJAHR; PARNISKE, 2013).

**Figura 4**-Diferentes estágios da colonização micorrízica.



**Fonte:** GUTJAHR; PARNISKE (2013)

A formação dos arbúsculos no interior das células corticais da raiz está associada a uma mudança brusca na estrutura e função celular do córtex; neste estágio, as células corticais que desempenham um papel predominantemente estrutural na raiz são drasticamente reprogramadas pela estimulação simbiótica da MA. Durante a formação do arbúsculo, a hifa entra no interior das células corticais e é guiada para o interior da célula por um PPA; ali a hifa se ramifica e é então

circundada pelo retículo endoplasmático e os componentes do citoesqueleto se reorganizam em torno das ramificações do arbúsculo (HARRISON, 2012).

### 3.3.3 Fatores que Regulam o Estabelecimento da MA

O estabelecimento da MA é regulado por vários fatores ambientais; entre eles, a concentração de nutrientes. As plantas regulam a colonização micorrízica de acordo com as suas necessidades nutricionais, provavelmente como um mecanismo para minimizar o custo de carbono imposto pelo FMA. O fósforo (P) é o mais importante nutriente inorgânico que afeta o desenvolvimento da MA. Estudos recentes têm concluído que o P atua na repressão de genes que codificam enzimas importantes para a biossíntese de carotenóides e estrigolatonas essenciais para o estabelecimento da simbiose micorrízica (BREUILLIN et al., 2010) modulando assim, a absorção de P. Em uma planta micorrizada o P pode ser absorvido diretamente pela interfase solo-raiz através da epiderme e pelos radiculares ou pela via simbiótica (micorrizica) através das hifas que compõem o micélio externo (SMITH et al., 2003). Em condições de baixa disponibilidade de P, a rota de absorção do fosfato muda completamente da via direta para a via simbiótica. Em condições de alta disponibilidade de P, a colonização e a absorção simbiótica de fosfato são suprimidas (GUTJAHR; PARNISKE, 2013).

Por outro lado, fatores bioquímicos como a produção de fitormônios podem exercer importantes papéis regulatórios na formação da MA. Ao mesmo tempo em que os hormônios vegetais regulam um grande número de eventos durante o desenvolvimento da planta, constituem também moléculas de sinalização que tem a capacidade de controlar o estabelecimento da simbiose. Por exemplo, auxinas podem ser responsáveis pela formação de raízes laterais na planta hospedeira e, portanto, aumentar os sítios de colonização para o fungo (KALDORF; LUDWIG-MÜLLER, 2000). Outros hormônios de sinalização entre plantas e patógenos, como o ácido jasmônico, podem atuar no controle da colonização micorrízica, ocasionando uma diminuição na porcentagem de colonização com o aumento dos níveis deste tipo de sinais nas vias sistêmicas (HERRERA-MEDINA et al., 2008).

### 3.3.4 Princípios Fisiológicos dos Benefícios das MA às Plantas

Dos benefícios que as MA produzem nas plantas hospedeiras, podem se destacar: ajuda a nutrição, crescimento e desenvolvimento; melhora a sua tolerância frente ao estresse causado por fatores abióticos e agentes patogênicos, além de facilitar sua adaptação em solos com baixa disponibilidade de nutrientes (SYLVIA et al., 1999). Estes benefícios são a base fundamental que permite às plantas uma melhor adaptação ao meio, maior competitividade e uma maior produtividade.

Os benefícios das MA na nutrição, crescimento e desenvolvimento vegetal estão relacionados à facilitação na absorção de nutrientes minerais do solo. As MAs podem ajudar as plantas a incrementar a captação de nutrientes de forma direta ou indireta. De forma direta, o fungo aumenta o campo de absorção da raiz além da zona de influência radicular através do desenvolvimento do micélio externo (extra-radicular) incrementando a captação de nutrientes (P, N, Zn, Cu, Mn, Fe) e água do solo (ALLEN et al., 2003; BAREA et al., 2005). De forma indireta as MA influenciam a dinâmica de nutrientes na rizosfera. Desta maneira os FMA podem interferir em vários ciclos biogeoquímicos, no aumento da eficiência de microrganismos fixadores de N, tais como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* que, por sua vez, incrementam a disponibilidade de nitrogênio para as plantas: no ciclo do carbono, devido a alterações no fluxo dos exsudados das raízes; no ciclo do fósforo (P), mediante a estimulação da atividade de bactérias solubilizadoras de fosfatos e, no ciclo do enxofre, pela influência na dinâmica das populações de bactérias autotróficas oxidadoras e redutoras de sulfatos (ANDRADE, 2004; ARTHURSON et al., 2006; BAREA et al., 2005).

A absorção de P é um dos principais benefícios da associação micorrízica. Esta vantagem torna-se de fundamental importância se considerado que o P é um elemento limitante da produtividade vegetal devido à sua baixa disponibilidade na forma solúvel no solo. O micélio externo dos FMA absorve o P em forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) a partir da solução do solo e o transloca para as raízes. Onde ele é transferido do fungo para a planta a nível celular nas estruturas de troca (arbúsculos). Este processo é mais eficiente em solos com baixa disponibilidade de P que a difusão direta através da interfase raiz-solo (HARRISON, 1999; SMITH; READ, 2008 b). Outros nutrientes, como o nitrogênio (N), também podem ser

captados pelo micélio extra-radicular da MA em forma inorgânica ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ ) ou orgânica (aminoácidos) (SMITH; SMYTH, 2011). O  $\text{NO}_3^-$  e os aminoácidos são transferidos diretamente. Já o  $\text{NH}_4^+$  é convertido à forma de aminoácido (glutamina) para ser transferido para a planta (ALLEN et al., 2003). A absorção de micronutrientes de baixa mobilidade no solo como o Zn, Fe, Cu e Mn também pode ser atribuída à associação micorrízica. Estudos conduzidos com plantas de milho indicaram um incremento na absorção destes elementos em condições de baixa disponibilidade no solo (LIU et al., 2000).

Uma maior tolerância de plantas micorrizadas ao estresse hídrico tem sido relacionada à indução da regulação da expressão de diferentes genes que codificam proteínas de transporte de membrana denominadas aquaporinas. As aquaporinas parecem desempenhar um papel especialmente importante no controle de transporte da água em nível intracelular. Este mecanismo diminui a permeabilidade à água na membrana, permitindo a conservação desta molécula no interior da célula (PORCEL et al., 2006). Por outro lado, a MA pode aumentar a condutância estomática, mecanismo que permite manter a taxa de evaporação ao mínimo o que, por sua vez, aumenta a eficiência do uso da água pela planta (RUIZ-LOZANO; AROCA, 2010).

O efeito da MA na proteção das plantas contra a ação de patógenos primeiramente foi relacionada ao fato desta contribuir a um melhor estado nutricional porém, o comprovado efeito contra uma diversa gama de patógenos levou à elucidação de vários mecanismos de indução de resistência associada à simbiose micorrízica. Entre eles, o efeito *primer* associado à indução da produção de ácido jasmônico pela MA, que permite uma ativação mais eficiente dos mecanismos de defesa da planta (POZO et al., 2010; JUNG et al., 2012).

### 3.3.5 FMA nos Sistemas Agrícolas

À luz do estudo dos benefícios da MA às plantas pode-se concluir que os FMA desempenham um importante papel no solo e contribuem de forma significativa a que este funcione como um sistema que sustente a produtividade vegetal. Este é um potencial que pode ser explorado no desenvolvimento e na produção de plantas cultivadas. Porém a maioria dos estudos com FMA nos ecossistemas agrícolas estão orientados a determinar o efeito das diferentes

práticas agrícolas sobre o estabelecimento da associação micorrízica e as comunidades de FMA no solo (CARRENHO et al., 2010). Em geral, estes estudos indicam que os FMA têm uma ocorrência generalizada nos ecossistemas agrícolas. A maioria das plantas cultiváveis consegue estabelecer associações simbióticas com os FMA. No entanto, muitas práticas agrícolas incluindo a utilização de produtos químicos (fertilizantes e praguicidas), o preparo do solo e as monoculturas influenciam as comunidades de FMA, levando a uma diminuição da diversidade e alteração da funcionalidade deste grupo de microrganismos (GOSLING et al., 2006; KAHILUOTO et al., 2009).

A rotação de culturas e a inoculação de FMA em áreas agrícolas são duas práticas que têm sido avaliadas como estratégias para restabelecer a comunidade de FMA nos solos agrícolas. A rotação de culturas favorece a multiplicação dos FMA no solo e promove uma maior eficiência na associação micorrízica (CASTILLO, et al., 2006; MAITI, et al., 2011). Por outro lado, a inoculação de FMA exógenos com a capacidade para competir com os FMA nativos pode resultar num aumento da colonização e no desenvolvimento das culturas (PELLEGRINO, et al., 2012). Apesar do grande número de estudos sobre o efeito benéfico dos FMA no desenvolvimento de diferentes plantas cultiváveis, seu uso na produção de inoculantes micorrízicos no Brasil ainda é limitado a uma pequena escala em universidades e centros de pesquisa onde normalmente se utiliza a multiplicação de FMA em vasos com variados tipos de plantas hospedeiras, entre elas, as gramíneas são as mais usadas. Estas são plantadas em substratos ou misturas de substratos como solo, areia, vermiculita e turfa, entre outros. O desenvolvimento mundial da pesquisa neste sentido tem gerado metodologias para o cultivo de FMA em meio sintético com raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas em órgãos hospedeiros, possibilitando a obtenção de culturas axênicas com potencial para a produção em grande escala de inoculantes de FMA. A partir desta técnica, em alguns países como o Canadá, a Espanha e a Índia, têm sido desenvolvidos inoculantes a base de FMAs (ADHOLEYA et al., 2005).

### 3.3.6 Multiplicação *in vitro* de FMA

A metodologia da cultura *in vitro* de FMA foi desenvolvida a partir dos estudos pioneiros sobre o desenvolvimento de FMA em condições assépticas

feitos por Mosse (1962), seguidos por vários estudos nas décadas de 70 e 80 como os de Mosse e Hepper (1975) acerca do crescimento de FMA em associação com culturas de raízes como órgãos hospedeiros, e os trabalhos de Strullu e Romand (1986, 1987) relacionados aos meios de cultivo apropriados para o desenvolvimento dos FMA e as raízes hospedeiras. Finalmente, Becard e Fortin (1988) padronizaram a metodologia de cultivo de FMA em raízes de cenoura transformadas pela inserção do plasmídeo Ri T-DNA.

O processo de obtenção e manutenção de culturas axênicas de FMA *in vitro* consiste em quatro etapas: a seleção, desinfecção e germinação de propágulos; o estabelecimento da MA com a cultura de raízes e a manutenção de subculturas contínuas. O meio mineral mais amplamente utilizado é o meio Mínimo (M) segundo Bécard e Fortin (1988). Esta metodologia traz várias vantagens sobre os métodos convencionais de cultivo em vaso permitindo a produção de inóculos puros, axênicos, com alta quantidade de massa fúngica (hifas e esporos) e livres de propágulos contaminantes (ADHOLEYA et al., 2005).

Nas duas décadas passadas várias espécies de MA foram adaptadas ao cultivo axênico em associação com raízes transformadas. Estas culturas têm sido usadas como ferramenta para desenvolver pesquisas em várias áreas como sistemática de FMA (DECLERCK et al. 2001; MORTON; REDECKER, 2001), entre outras, como caracterização morfológica do fungo antes e depois da colonização da raiz descrevendo a germinação *in vitro* de esporos (JUGE et al. 2001) e o estudo da fase desenvolvimento fora da raiz (BAGO et al., 1996; 1998a, 1998b; 1999a); aspectos fisiológicos da relação fungo hospedeiro (GEMMA; KOSKE, 1988; DOUDS et al., 1996; BAGO et al., 1999b; BUÉE et al., 2000); aspectos metabólicos da planta hospedeira (PFEFFER et al., 1999; BAGO et al., 2000; JONER et al., 2000; KOIDE; KABIR, 2000), permitindo a elucidação de muitos aspectos da simbiose estabelecida entre MA e plantas (FORTTIN et al., 2002).

Além de ser uma ferramenta atual para o estudo da associação micorrízica, as técnicas de cultivo *in vitro* de FMA têm sido utilizadas na produção em larga escala de inóculos micorrízicos. A produção e multiplicação de espécies como *Glomus intrarradices* tem sido exitosa desde o começo dos estudos das técnicas de multiplicação *in vitro* até a atualidade, chegando a alcançar níveis de desenvolvimento que permitem obter até 3.250 esporos por mL de meio em 3 meses

(DOUDS, 2003). Assim, esta técnica se mostra mais efetiva e adequada para a prospecção de novos inoculantes à base de fungos micorrízicos.

### 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura pode ser considerada como um dos principais motores da economia brasileira. Assim, é um setor que está em constante crescimento gerando uma alta demanda de insumos agrícolas, entre eles os fertilizantes que são de extrema importância para a manutenção de produtividade. Porém, o uso contínuo destes insumos, que geralmente provem de fontes não renováveis, podem levar a um encarecimento nos custos de produção, assim como gerar impactos negativos ao meio ambiente. Neste sentido, um dos principais desafios do setor agrícola é encontrar alternativas que possam otimizar ou diminuir o uso de fertilizantes mantendo os padrões de produção. Uma das alternativas a este desafio é o uso de microrganismos do solo que promovam o desenvolvimento vegetal, tais como os fungos micorrízicos arbusculares. O desenvolvimento de inoculantes com base em FMA pode ser viável por meio do uso de técnicas que permitam a multiplicação destes microrganismos em larga escala, como as técnicas de cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ADHOLEYA, A.; TIWARI, P.; SINGH, R. Large-scale inoculums production of arbuscularmycorrhizal fungi on root organs and inoculation strategies. In: Declerck, S.; Strullu, D.G.; Fortin, J.A. (Eds). **In vitro Culture of Mycorrhizas**, First ed. New York: Springer, 2005. p. 315-338.
- AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. **Annals of Botany**, v.97, p.925-931, 2006.
- ALLEN, M.F.; SWENSON, W.; QUEREJETA, J.I.; EGERTON-WARBURTON, L.M.; TRESEDER, K.K. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.271-303, 2003.
- ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNE, D.; HAMPP, R. **Plant Surface Microbiology**. New York: Springer, 2004. p.51-68
- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Panorama internacional: gás natural. In: \_\_\_\_\_. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**: 2013. Rio de Janeiro: ANP, 39-45, 2013.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**. v. 8, p. 1-10, 2006.
- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AND PICHÉ, Y. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic culture conditions. **Mycologia**, v.90, p.52-62, 1998a.
- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILLAR, C.; GOULET, A.; PICHÉ, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.139, p.375-388, 1998b.
- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.D.JR; BROUILLETTE, J.; BÉCARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v.121, p.263-271, 1999b.
- BAGO, B.; SHACHAR-HILL, Y.; PFEFFER, P.E. Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. **Current Advances In Mycorrhizae Research**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2000. p.111-126.
- BAGO, B.; VIERHEILIG, H.; PICHÉ, Y.; AZCÓN-AGUILAR, C. Nitrate depletion and pH changes induced by extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. **New Phytology**, v.133, p.273-280, 1996.

BAGO, B.; ZIPFEL, W.; WILLIAMS, R.M.; WEBB, W.W.; PICHÉ, Y. Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi, as revealed by *in vitro* 2-photon microscopy. **Protoplasma**, v.209, p.77-89, 1999a.

BARDGETT, R.D. Organism interactions and soil processes. In: \_\_\_\_\_. **The biology of soil: a community and ecosystem approach**. New York: Oxford University Press, 2005. p.57-85.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AGUILAR, A.C. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: BUSCOTAND, F; VARMA, A. **Soil Biology**. New York: Springer, 2005. p.195-208

BARROS, G.S.C.; ADAMI, A.C.O.; ZANDONÁ, N.F. Faturamento e volume exportado do agronegócio brasileiro são recordes em 2013. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP**. 2014. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/macro/>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

BÉCARD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, v.108, p.211-218, 1988.

BREUILLIN, F.; SCHRAMM, J.; HAJIREZAEI, M.; AHKAMI, A.; FAVRE, P.; DRUEGE, U.; HAUSE, B.; BUCHER, M.; KRETZSCHMAR, T.; BOSSOLINI, E.; KUHLEMEIER, C.; MARTINOIA, E.; FRANKEN, P.; SCHOLZ, U.; REINHARDT, D. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia* hybrid and represses genes involved in mycorrhizal functioning. **The Plant Journal**, v.64, p.1002-1017, 2010.

BUÉE, M.; ROSSIGNOL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.693-698, 2000.

CAIRNEY, J.W.G. Evolution of mycorrhiza systems. **Naturwissenschaften**, v.87, p. 467-475, 2000.

CARENHO, R.; GOMEZ-DA-COSTA, S.M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas brasileiros. In: SIQUIERA, J.; de SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds) **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**, 1. ed. Lavras: Editora UFLN, 2010. p.215-249.

CASTILLO, C. G.; RUBIO, R.; ROUANET, J. L.; Borie, F. Early effects of tillage and crop rotation on arbuscular mycorrhizal fungal propagules in an Ultisol. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p. 83-92, 2006.

CONAB, **Companhia nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, v.1-Safra 2014, p.1-14, 2014 c.

CONAB, **Companhia nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira: café, v.1-Safra 2014, p.1-61, 2014 b.

CONAB, **Companhia nacional de abastecimento**. Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, v.1-Safra 2013/14, p.1-80, 2014a.

de SOUZA, F. A.; SILVA, I.C.; BERBARA, R.L.L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUIERA, J.O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: Editora UFLA, 2008. p.501- 554.

de SOUZA, F.A.; STÜRMER, S.L.; CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUIERA, J.; de SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds) **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**, 1. ed.Lavras: Editora UFLN, 2010. p.16-73

DECLERCK, S.; D'OR, D.; CRANENBROUCK, S.; LÉBOULENGÉ; E. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. **Mycorrhiza**, v.11, p.225-230, 2001.

DOUDS, D.D. Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. **Mycorrhiza**, v.12, p.163-167, 2002.

DOUDS, D.D.; JR., NAGAHASHI, G.; ABNEY, G.D. The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. **New Phytologist**, v.133, p.289-294, 1996.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Visão 2014–2034: o futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira. Brasília: **Embrapa**, 2014. p. 29-36.

FAO. The agricultural structure. In: \_\_\_\_\_. Fertilizer use by crop in Brazil. Roma: **FAO**, 2004. p.11-16.

FAOSTAT. Brazil: economics indicators. 2013. Disponível em: <[http://faostat.fao.org/CountryProfiles/Country\\_Profile/Direct.aspx?lang=en&area=21](http://faostat.fao.org/CountryProfiles/Country_Profile/Direct.aspx?lang=en&area=21)>. Acesso em: 26 jun. 2014.

FIXEN, P.E. Reservas mundiais dos nutrientes dos fertilizantes. **Informações Agrônomicas**, v.126, p.8-14, 2009.

FORTIN, J.A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M.; COUGHLAN, A. P.; PICHÉ, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.80, p.1-20, 2002.

GEMMA, J.N.; KOSKE, R.E. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: chemotropism of germ tubes and root growth responses. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.123-132, 1988.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth – physiological and genetic aspects. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 3-31.

GIRI, B.; GIANG, P.H.; KUMARI, R.; PRASAD, R.; VARMA, A. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. In: BUSCOT, F.; VARMA, A. (Eds), **Soil Biology**. New York: Springer, 2005. p.19-43.

GOMES, W. S.; BORÉM, A. Biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro. **Revista de Economia e Agronegócio**, v.11, p. 115-136, 2013.

GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G.; BENDING, G.D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, **Ecosystems and Environment**, v.113, p.17-35, 2006.

GUTJAHR, C.; PARNISKE, M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p.593-617, 2013.

HARRISON, M. J. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, p.691-698, 2012.

HARRISON, M..J.. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.361-89, 1999.

HERRERA-MEDINA, M.J.; TAMAYO, M.I.; VIERHEILIG, H.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA-GARRIDO, J. M. The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.27, p.221-230, 2008.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

IFA, **International Fertilizer Industry Association**. Global fertilizer trade map, 2014. Disponível em: <<http://www.fertilizer.org/GlobalFertilizerTradeMap>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

IFA, **International Fertilizer Industry Association**. Assessment of fertilizer use by crop at the global level 2010-2010/11. Paris: IFA, 2013. Disponível em: <http://www.fertilizer.org/ItemDetail?iProductCode=9592Pdf&Category=STAT&WebsiteKey=411e9724-4bda-422f-abfc-8152ed74f306>. Acesso em: 28 jun. 2014.

IFADATA, 2014. Disponível em: <<http://www.fertilizer.org/Statistics>>. Acesso em: 28 jun. 2014.

JONER, E.J.; RAVNSKOV, S.; JAKOBSEN, I. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. **Biotechnology Letters**, v.22, p.1705-1708, 2000.

JUNG, S.C.; MARTINEZ-MEDINA, A.; LOPEZ-RAEZ, J.A.; POZO, M.J. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. **Journal of Chemical Ecology**, v.38, p.651-664, 2012.

KAHILUOTO, H.; KETOJA, E.; VESTBERG, M. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality in contrasting cropping systems agriculture. **Ecosystems and Environment**, v.134, p.36-45, 2009.

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

KOIDE, R.T.; KABIR, Z. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. **New Phytologist**, v.148, p.511-517, 2000.

KUHAD, R.C.; KOTHAMASI, D. M.; TRIPATHI, K.K.; SINGH, A. Diversity and functions of soil microflora in development of plants. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNE, D.; HAMPP, R. **Plant Surface Microbiology**. New York: Springer, 2004. p. 51-68

LAPIDO-LOUREIRO F.E.; MELAMED R. O fósforo na agroindústria brasileira. In: LAPIDO-LOUREIRO F.E.; MELAMED R.; FIGUEIREDO-NETO E.J. **Fertilizantes: agroindústria & sustentabilidade**, Rio de Janeiro: CETEM, 2008. CD-ROM.

LIU, A.; HAMEL, C.; HAMILTON, R.I. MA, B.L.; SMITH, D.L. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. **Mycorrhiza**, v.9, p. 331-336, 2000.

MAITI, D.; TOPPO, N.N.; VARIAR, M. Integration of crop rotation and arbuscular mycorrhiza (AM) inoculum application for enhancing AM activity to improve phosphorus nutrition and yield of upland rice (*Oryza sativa* L.). **Mycorrhiza**, v.21, p.659-667, 2011.

MIDC, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Exportações de commodities. 2014. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=1955>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

MIGUEL, F.B.; ESPERANCINI, M.S.T.; KITAGAWA, R. Rentabilidade e risco da produção de milho safrinha geneticamente modificado e convencional na região de Guaíra/SP. **Revista Energia na Agricultura**, v.29, n.1, p.64-75, 2014.

MORTON, J.B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, v.93, p.1810-195, 2001.

MOSSE, B. The establishment of vesicular–arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. **Journal of General Microbiology**, v.27, p.509-520, 1962.

MOSSE, B.; HEPPEL, C.M. Vesicular–arbuscular infections in root-organ cultures. **Physiological Plant Pathology**, v.5, p.215-223, 1975.

NAGAHASHI, G.; DOUDS, D.D.; FERHATOGLU, Y. Functional categories of root exudate compounds and their relevance to AM fungal growth. In: KOLTAI, H.;

KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 33-56

NAGAHASHI, G.; DOUDS, D.D.; FERHATOGLU, Y. Functional categories of root exudate compounds and their relevance to AM fungal growth. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 33-56

PELLEGRINO, E.; TURRINI, A.; GAMPER, H.A.; CAFA, G.; BONARI, E.; YOUNG, J.P.W. GIOVANNETTI, M. Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. **New Phytologist**, v.194, p.810-822, 2012.

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

PHILIPPOT, L.; GERMON, J.C. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In: BUSCOTAND, F.; VARMA, A. **Soil Biology**. New York: Springer, 2005. p.160-175.

PORCEL, R.; AROCA, R.; AZCÓN, R. RUIZ-LOZANO, J.M. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.389-404, 2006.

POZO, M.J.; JUNG, S.C.; LÓPEZ-RÁEZ, J.A.; AZCÓN-AGUILAR, C. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 193-256.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AROCA, R. Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 239-254.

SMITH, S.E.; READ, D. Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhizas. In: \_\_\_\_\_. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York: Elsevier Ltd, 2008 a. p.42-90.

SMITH, S.E.; READ, D. Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. In: \_\_\_\_\_. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York: Elsevier Ltd, 2008 b. p.146-186.

SMITH, S.E.; SMITH F.A.; JAKOBSEN, I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. **Plant Physiology**, v. 133, p.16-20, 2003.

STRULLU, D.G.; ROMAND, C. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.303, n.6, p.245-250, 1986.

STRULLU, D.G; ROMAND, C. Culture axénique de vésicules isolées partir d'endomycorhizes et ré-association in vitro à des racines de tomate. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.305, n.1, p.15-19, 1987.

SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. Mycorrhizal simbioses. In: \_\_\_\_\_. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.408-425.

USGS, **United States Geological Survey**. Mineral commodity summaries 2013. Reston, Virginia: USGS, 2013, p.14-190. Disponível em: <<http://pubs.er.usgs.gov/publication/mineral2013>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

#### 4 ADAPATAÇÃO DO FMA *Rhizophagus clarus* AO CULTIVO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO NO SOLO

Os FMAs do tipo *Glomus* incluem cerca de 110 espécies descritas, tornando-o um importante grupo da ordem Glomales (DALPE et al. 2005). Para o Brasil, foram registradas um total de 53 espécies deste grupo, com ocorrência em diferentes estados, entre estas espécies, *Rhizophagus clarus* (= *Glomus clarum*), *Rhizophagus diaphanus* (= *Glomus diaphanum*), *Claroideoglomus etunicatum* (= *Glomus etunicatum*), *Funneliformis geosporus* (= *Glomus geosporum*), *Glomus macrocarpum*, *Glomus microaggregatum* e *Glomus sinuosum* mostram uma maior frequência de ocorrência e distribuição geográfica em diferentes ambientes (de SOUZA et al., 2010). Este fato sugere, que *R. clarus* é uma espécie com elevada plasticidade fisiológica e potencial para produção biotecnológica de inoculantes já que pode se adaptar a diferentes ambientes. Até agora poucas espécies do grupo *Glomus* foram adaptadas ao cultivo *in vitro*; entre elas *Rhizophagus fasciculatus* (= *Glomus fasciculatum*) por Strullu e Romand (1986), *Gl. macrocarpum* e *Gl. versiforme* (DECLERCK et al., 1998), *Gl. deserticola* (MATHUR; VYAS, 1995), *Funneliformis constrictus* (= *Glomus constrictum*) (MATHUR; VYAS, 1999), *Claroideoglomus etunicatum* (= *Glomus etunicatum*) (PAWLOWSKA et al., 1999), *Funneliformis caledonius* (= *Glomus caledonium*) (KARANDASHOV et al., 2000), *Rhizophagus prolifer* (= *Glomus proliferum*) (DECLERCK et al., 2000), *Funneliformis mosseae* (= *Glomus mosseae*) (RAMAN et al., 2001), *Rhizophagus intraradices* (= *Glomus intraradices*) (DOUDS, 2002); já no Brasil o desenvolvimento *in vitro* de *Rhizophagus clarus* foi relatado por de Souza e Berbara (1999) e Costa et al. (2013). Para várias dessas espécies têm sido descrito o seu ciclo de vida; no entanto, existe pouca informação a respeito da manutenção da cultura axênica e de seu potencial de colonização, visando à produção de inoculantes.

A produção de inoculantes micorrízicos com base nas técnicas de cultivo *in vitro* exige não só a adaptação do fungo micorrízico à cultura axênica. Além disso, também é necessária uma avaliação da viabilidade dos propágulos obtidos nessas condições ao serem novamente inoculados ao solo (ADHOLEYA et al., 2005). A adaptação total desta tecnologia aos sistemas agrícolas também deve incluir a avaliação do desempenho do inóculo micorrízico frente a várias práticas de rotina, tais como o tratamento químico das sementes com fungicidas para o controle

de patógenos. Este tipo de prática pode controlar os patógenos do solo, mais também podem afetar fungos benéficos como os fungos micorrízicos arbusculares.

Assim, este capítulo tem como objetivo descrever o processo de adaptação do fungo micorrízico *Rhizophagus clarus* ao sistema *in vitro* e a dinâmica do seu desenvolvimento a partir de subcultivos; apresentar a avaliação do potencial de colonização do inóculo de *R. clarus* produzido *in vitro* em um substrato esterilizado e não esterilizado; bem como seu desempenho na colonização micorrízica após a inoculação em sementes tratadas com antifúngico.

#### 4.1 ADAPTAÇÃO DO FUNGO *Rhizophagus clarus* AO CULTIVO *IN VITRO*

##### 4.1.1 Cultivo de Raízes Hospedeiras

As raízes usadas como órgãos hospedeiros, correspondem a raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) transformadas com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes* segundo Chilton et al. (1982). As culturas de raízes foram mantidas e multiplicadas em meio mineral mínimo M (BÉCARD; FORTIN, 1988) a 25 °C no escuro. Para manter a viabilidade das raízes foram feitos subcultivos a cada 3 ou 4 semanas.

##### 4.1.2 Desinfecção de Propágulos

Neste trabalho, foram utilizados esporos como propágulos. Estes foram multiplicados em vasos com um substrato esterilizado (areia e solo 1 : 1) e *Brachiaria decumbens* como planta hospedeira em condições de casa de vegetação (25 °C, com luz natural). Após cinco meses de multiplicação em vasos, os esporos foram extraídos por peneiramento úmido e decantação (GERDERMAN; NICOLSON, 1963). Após a extração, os propágulos foram armazenados em câmara úmida a 4 °C durante oito dias antes da desinfecção, para induzir a quebra de dormência.

A desinfecção de propágulos foi feita utilizando um sistema de filtro acoplado a uma seringa de 50 mL. O procedimento de desinfecção consistiu em uma primeira lavagem com 100 mL de solução desinfetante composta por cloramina

T (2%) e estreptomicina (0.02%), segundo Mosse (1962), posteriormente foram feitas quatro lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Finalmente os esporos foram removidos cuidadosamente do sistema de filtração e transferidos a uma placa de Petri esterilizada contendo agar-água-MES e subsequentemente incubados para promover a germinação.

#### 4.1.3 Germinação dos Esporos

A germinação dos esporos foi promovida em agar-água-MES (10 mM)(CARR; HINKLEY, 1985) a diferentes pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,2). De sete a oito esporos desinfetados foram colocados na superfície do médio agar-água-MES distribuído em placas de Petri. Posteriormente as placas foram incubadas a 25 °C no escuro e avaliadas periodicamente ao microscópio estereoscópico (40X) para monitorar a germinação e eliminar contaminantes.

#### 4.1.4 Indução da Associação Micorrízica *in vitro*

Assim que observada a germinação de esporos, uma peça de gel contendo um esporo germinado foi transferida para uma placa contendo meio mínimo (M) e um fragmento (5 - 7 cm) de raiz (Ri-T-DNA) em crescimento ativo. Posteriormente as placas foram incubadas a 25 °C no escuro. Após a incubação, foram feitas avaliações periódicas ao microscópio estereoscópico para monitorar o estabelecimento de associação entre o fungo e a raiz.

#### 4.1.5 Subcultivo de *R. clarus in vitro*

Após a obtenção da micorriza *in vitro*, foram avaliados dois métodos de subcultura. No primeiro método, pequenos fragmentos de um centímetro quadrado de gel provenientes de uma cultura estabelecida contendo esporos, micélio e raízes colonizadas foram transferidas para uma placa com meio M e fragmentos (5 - 7 cm) de raiz (Ri-T-DNA). No segundo método, raízes colonizadas provenientes de uma cultura de aproximadamente 30 dias, crescendo ativamente, foram transferidas para novas placas com meio M. Cada um desses métodos foi

avaliado respeito a três aspectos do desenvolvimento de *R. clarus* no cultivo *in vitro*: crescimento da raiz, micélio extra-radicular, e produção de esporos.

O comprimento da raiz, micélio extra-radicular, e número de esporos foram avaliados em triplicata aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias de cultivo. O método de avaliação do comprimento do micélio e da raiz foi de acordo com Newman (1966).

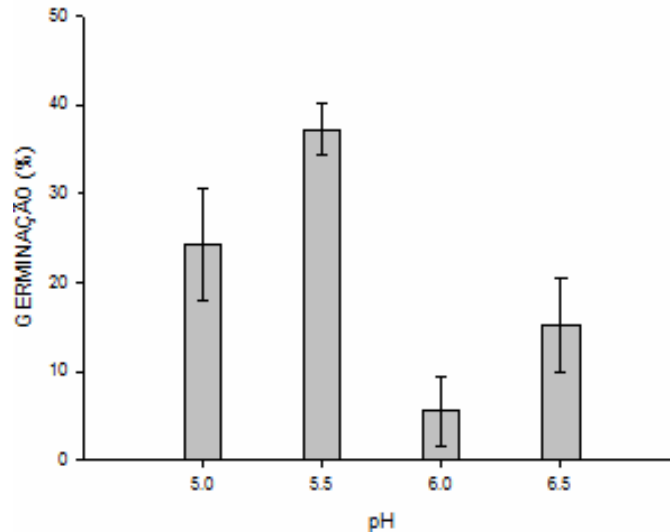
#### 4.1.7 Análise Estatística

O número de esporos produzidos nas subculturas foi ajustado ao modelo Gompertz de acordo com Declerck et al. (2001), no programa Sigma Plot 10.0.

#### 4.1.6 Resultados

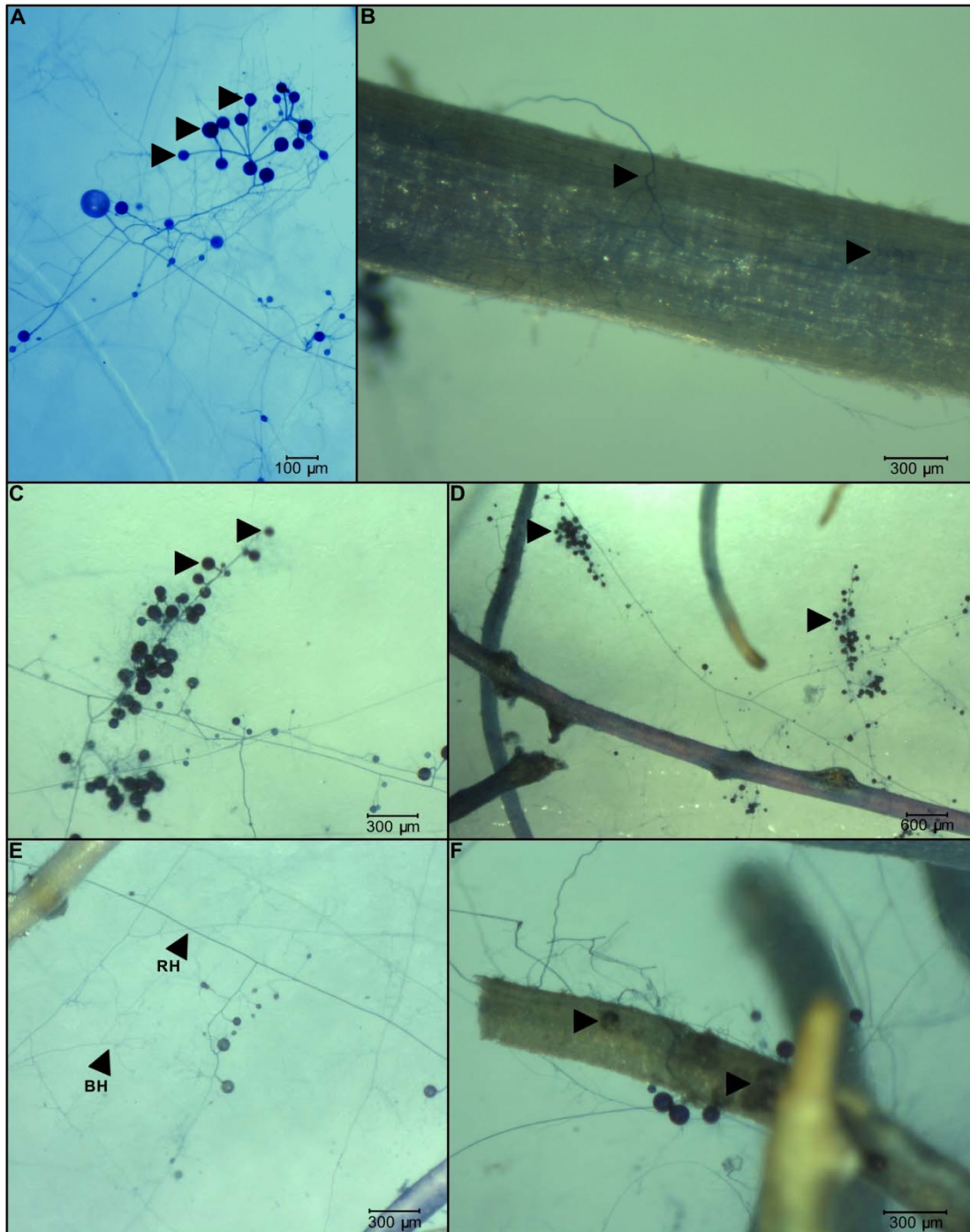
A maior porcentagem de germinação de esporos (37,2%) foi observada num pH de 5,5. Em outros pHs como 6,0 e 6,5 a porcentagem de germinação foi menor do que 20% e o crescimento do tubo germinativo parou poucos dias após a germinação (Figura 5).

**Figura 5** – Índice de germinação (%) de esporos desinfetados em agar-água-MES em diferentes pH.



Um crescimento ativo do micélio e a formação de algumas vesículas na fase pré-simbiótica foram observados nos esporos germinados em pH 5,5 (Figura 6A); e após 15-30 dias da transferência do esporos germinado para o meio MRS várias hifas com estruturas de infecção foram identificadas (Figura 6B). O desenvolvimento de micélio extra-radicular (Figura 6E) e a produção de esporos secundários foram observados após 45 dias de cultivo. Neste período observou-se um vigoroso desenvolvimento do micélio extra-radicular apresentando hifas de paredes espessas que se estendem pelo meio, denominadas “runner hyphae” (RH) e hifas ramificadas “branched hyphae” (BH). A produção de esporos secundários foi intensa nas regiões da placa com alto desenvolvimento de hifas RH (Figura 6C e 6D) com ramificações laterais. A esporulação intra-radicular foi observada após 120 dias de cultivo (Figura 6F).

**Figura 6** - Desenvolvimento *in vitro* de *R. clarus*: formação de vesículas na fase pré-simbiótica (A); contato da hifa com a raiz e formação da estrutura de infecção (B); produção de esporos (C,D); arquitetura do micélio extra-radical “runner hyphae” (RH) e “branched hyphae” (BH) (E); produção de esporos no interior da raiz (F).

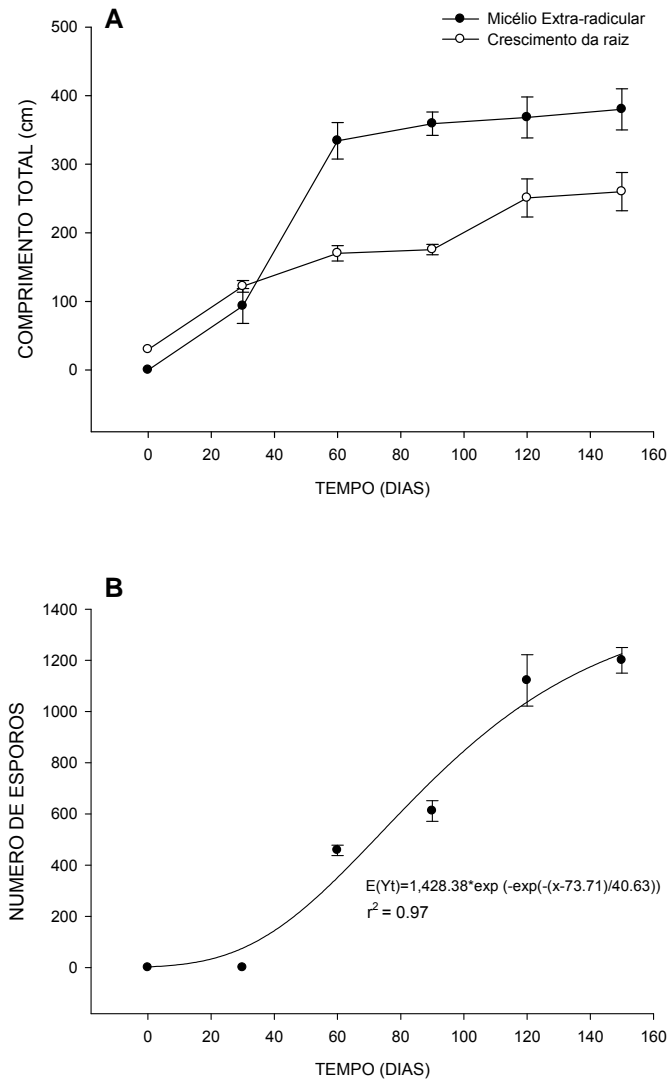


Nos métodos de subcultura, o comprimento do micélio extra-radicular aumentou ativamente após incubação no método de subcultura com fragmentos de gel (Figura 7A), já no método de subcultura com raízes colonizadas este aumento ocorreu depois de 30 dias de incubação (Figura 8A). O maior aumento do micélio extra-radicular se deu no intervalo de 30-60 dias após o subcultivo; no período seguinte entre os 90-150 dias seu crescimento não foi significativo, apenas acompanhando o crescimento da raiz. O comprimento da raiz foi maior no método de subcultura por fragmentos de gel.

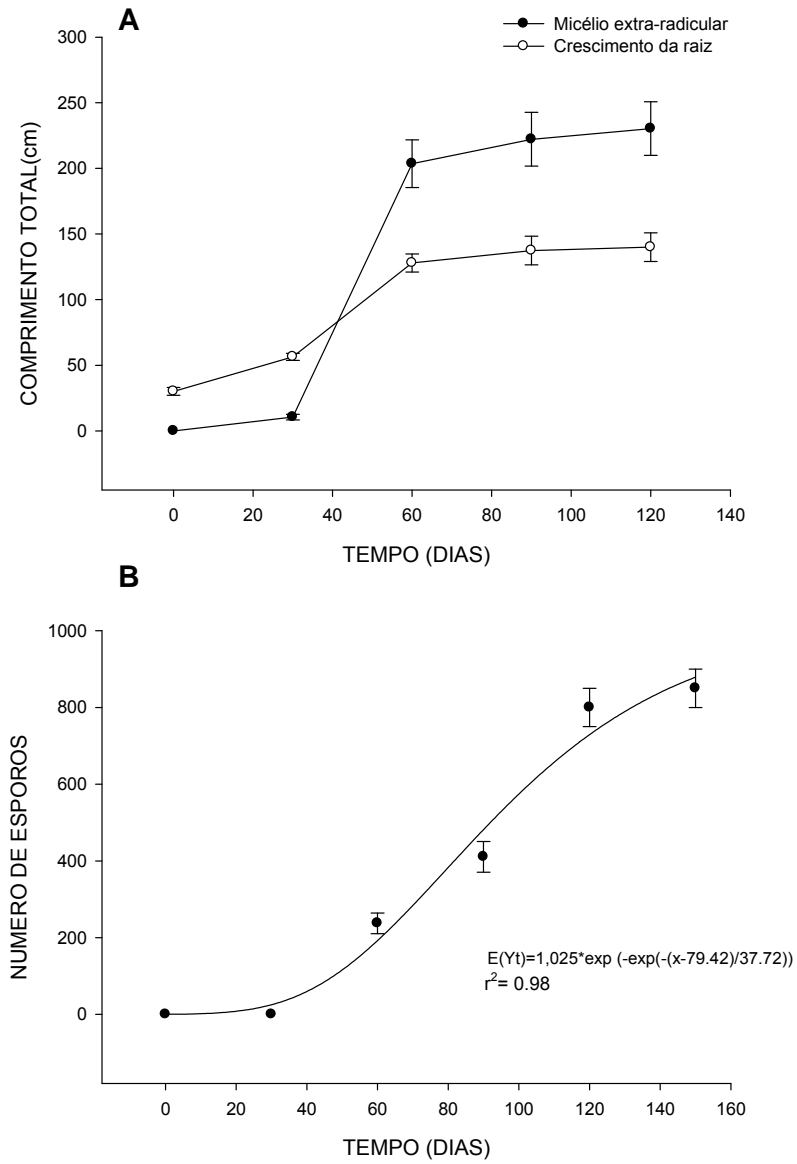
A produção de esporos apresentou uma dinâmica ajustada ao modelo Gompertz (Figura 7B, 8B). Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) estimado foi de 0,97 no método de subcultura por fragmentos de gel e de 0,98 no método de subcultura por raiz colonizada.

A produção de esporos e micélio extra-radicular foram maiores no método de subcultura por fragmentos de gel, com valores de 380 cm de comprimento total, e 1.200 esporos aos 150 dias de incubação; por outro lado, o método de subcultura de raiz colonizada apresentou um crescimento em torno de 230 cm de micélio extra-radicular e 850 secundários maduros no mesmo período.

**Figura 7** – Dinâmica de crescimento de *Rizophagus clarus in vitro* no método de subcultura por fragmentos de gel. Desenvolvimento de micélio extra-radicular (A); produção de esporos (B)



**Figura 8** – Dinâmica de crescimento de *Rhizophagus clarus in vitro* no método de subcultura por raiz colonizada. Desenvolvimento de micélio extra-radicular (A); produção de esporos (B)



## 4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO DO INÓCULO DE *Rhizophagus clarus* PRODUZIDO *IN VITRO*

### 4.2.1 Experimento 1: Potencial de Colonização

O potencial de colonização do inóculo de *R. clarus* produzido *in vitro* foi comparado com um inóculo convencional produzido em vasos de multiplicação com *Brachiaria decumbens*. Este experimento foi conduzido em casa de vegetação ( $25 \pm 2$  °C, com luz natural), no experimento foram utilizadas duas espécies vegetais de importância agrônômica, algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e soja (*Glycine max* L.). Como tratamentos foram considerados: i) inóculo *in vitro*; ii) inóculo convencional, e o controle sem inoculação.

O inóculo *in vitro* consistiu em 2 mL de uma mistura contendo 100 esporos, micélio raízes colonizadas partir de uma cultura axênica de *R. clarus* de quatro meses de idade. O inóculo convencional consistiu em 10 g de solo, contendo 100 esporos, micélio e raízes colonizadas provenientes dos vasos de multiplicação.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições por tratamento. Cada unidade experimental consistiu em um vaso de dois litros com substrato. O substrato utilizado foi uma mistura de areia e solo (1:1) em duas condições, esterilizado e não esterilizado. A esterilização do substrato foi feita por tinalização. As suas características químicas são apresentadas na Tabela 1.

A inoculação foi feita cobrindo o inóculo com uma camada de solo de 2 cm acima do qual as sementes foram semeadas. Para as plantas de soja, além de dois tipos de inóculo de *R. clarus* foi aplicado de um inoculante comercial de bactérias fixadoras de nitrogênio (Rizo Plus ® Rhizobacter) contendo duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079, SEMIA 5080).

O experimento foi conduzido durante dois meses. Após este período, foram coletadas amostras do sistema radicular para avaliação da colonização micorrízica, e a parte aérea para avaliação da biomassa e o conteúdo de fósforo e nitrogênio.

As amostras de raiz foram submetidas ao procedimento de coloração das estruturas micorrízicas segundo Phillips e Hayman (1970). A porcentagem de colonização micorrízica foi estimada pelo método de interseções em grid-line (Giovanetti e Mosse, 1980). Para a determinação da biomassa, as plantas foram coletadas, secas a 50 °C por 72 horas, e posteriormente pesadas. Após a determinação da biomassa, as amostras foram moídas para a quantificação do fósforo e o nitrogênio. A determinação do fósforo foi feita após digestão nitro-perclórica segundo o método de determinação de Murphy e Riley (1962). O N foi determinado por destilação micro-Kjeldahl após digestão sulfúrica segundo Sarruge e Haag (1974).

#### 4.2.2 Experimento 2: Colonização em Sementes com Tratamento Antifúngico

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação (25 ± 2 °C, com luz natural) com sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e de soja (*Glycine max* L.) tratadas com uma formulação química contra fungos patógenos de solo Baytan® (ingrediente ativo: tridiadimenol) e Standak® Top (ingrediente ativo: pirasclotrobina e metil tiofanato), respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições por tratamento. Cada unidade experimental consistiu em um vaso de dois litros com substrato. O substrato foi um solo Latossolo Vermelho não esterilizado. As suas características químicas são apresentadas na Tabela 1.

Nesse experimento foi utilizado um inóculo de *R. clarus* produzido in vitro como descrito no experimento 1. Foram considerados como tratamentos duas condições das sementes (tratadas e não tratadas), e dois métodos de inoculação: i) aplicação do inóculo como revestimento das sementes e; ii) cobrindo o inóculo com uma camada de solo de 2 cm acima do qual as sementes foram semeadas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por três meses. Após este tempo, foram avaliadas a colonização micorrízica e a biomassa da parte aérea.

**Tabela 1** - Características químicas dos substratos utilizados nos experimentos de casa de vegetação. (SE) substrato esterilizado; (SNE) substrato não esterilizado. (S) soma de bases; (CTC) capacidade de troca catiônica (V) saturação de bases; (SA) saturação por alumínio.

	P	C	pH	Al	H <sup>+</sup> Al	Ca	Mg	K	S	CTC	%	
	mg/dm <sup>3</sup>	g/ dm <sup>3</sup>									V	SA
SE	12,5	16,05	4,60	0,26	7,20	2,60	0,74	0,07	3,41	10,6	32,13	7,08
SNE	14,9	12,85	5,40	0,00	3,42	3,55	1,48	0,18	5,21	8,63	60,37	0,00
Solo	12,1	14,41	4,70	0,08	5,76	1,80	1,31	0,30	3,41	9,17	37,18	2,29
P-K: Mehlich I				Ca-Mg-Al: KCl M				pH: CaCl <sub>2</sub> 0.01 M				

#### 4.2.3 Análise Estatística

Os efeitos de dois tipos de inóculo, *in vitro* e convencional, sobre a biomassa da planta e absorção de nutrientes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as medias foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD) ao nível de probabilidade de  $p \leq 0,05$ . Para os dados de colonização micorrízica em substrato esterilizado foi realizado um teste t  $p \leq 0,05$  entre os dois tipos de inóculo. Estas análises foram feitas utilizando o programa ESTATISTICA 7.0.

#### 4.2.4 Resultados

Em substrato esterilizado com plantas de algodão não foram observadas diferenças entre os dois tipos de inóculo, estes apresentaram a mesma eficiência na colonização atingindo valores superiores a 80% após 60 dias de inoculação. Esta percentagem de colonização teve um efeito positivo no desenvolvimento das plantas (Tabela 2). Em plantas micorrizadas foi observado um aumento na produção de biomassa e na absorção de fósforo e absorção de nitrogênio, essas diferenças foram estatisticamente significativas em relação às plantas controle (Tabela 2).

Em substrato não esterilizado o inóculo produzido *in vitro* foi mais eficiente na colonização radicular, este atingiu 91% da colonização, 13% a mais do que o percentual alcançado por o inóculo convencional. No entanto, nestas condições não foram observadas diferenças na produção de biomassa nem na absorção de fósforo em plantas micorrizadas em relação ao controle sem inóculo micorrízicos. Absorção de nitrogênio foi maior em plantas com inóculo convencional (Tabela 2).

**Tabela 2** - Colonização do inóculo de *R. clarus* produzido *in vitro* em comparação com um inóculo convencional e seu efeito no desenvolvimento de plantas de algodão. (CM) colonização micorrízica; (B) biomassa da parte aérea; (P) conteúdo de fósforo na parte aérea; (N) conteúdo de nitrogênio na parte aérea. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ) e pelo teste t para colonização no substrato esterilizado ( $n=5$ ).

<b>Substrato esterilizado</b>				
Tratamentos	CM	B	P	N
	(%)	(g planta <sup>-1</sup> )	(mg planta <sup>-1</sup> )	(mg planta <sup>-1</sup> )
Controle	0,00	1,1±0,2b	0,2±0,1b	14±4b
I. Convencional	86,0±4,1a	4,0±1,0a	2,8±0,5a	48±7a
I. In Vitro	87,0±1,3a	4,7±0,5a	2,4±0,6a	54±3a
<b>Substrato não esterilizado</b>				
Tratamentos	CM	B	P	N
	(%)*	(g planta <sup>-1</sup> )	(mg planta <sup>-1</sup> )	(mg planta <sup>-1</sup> )
Controle	57±4c	3,5±0,6a	1,7±0,4a	47± 6b
I. Convencional	78±9b	3,8±0,7a	2,0±0,2a	49± 9a
I. In Vitro	91±3a	3,1±0,4a	1,6±0,2a	36± 4b

Em plantas de soja, o inóculo convencional e o *in vitro* mostraram a mesma eficiência na colonização radicular, superior a 60% após 60 dias de inoculação em substrato esterilizado. Esta percentagem de colonização foi observado com ou sem a inoculação de *Rhizobium*. Em plantas micorrizadas foi observado um efeito positivo na produção de biomassa e na absorção de fósforo e nitrogênio, essas diferenças foram significativas em relação às plantas controle sem inóculo micorrízicos. Plantas inoculadas com *Rhizobium* e micorrizadas apresentaram um aumento na massa de nódulos (Tabela 3).

Em substrato não-estérilizado o inóculo produzido *in vitro* foi mais eficiente na colonização radicular, este mostrou entre 60 - 70% de colonização. As plantas não apresentaram diferenças quanto à biomassa com e sem inóculo micorrízicos. Absorção de fósforo e a massa dos nódulos foram maiores em plantas com inóculo *in vitro*. Absorção de nitrogênio não foi significativamente diferente entre os tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Colonização do inóculo de *R. clarus* produzido *in vitro* em comparação com um inóculo convencional e seu efeito no desenvolvimento de plantas de soja. (CM) colonização micorrízica; (B) biomassa da parte aérea; (P) conteúdo de fósforo na parte aérea; (MN) massa dos nódulos; (N) conteúdo de nitrogênio na parte aérea. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ) e pelo teste t para colonização no substrato esterilizado ( $n=5$ ).

<b>Substrato Esterilizado</b>					
Tratamentos	CM (%)	B (g planta <sup>-1</sup> )	P ( $\mu\text{g}$ planta <sup>-1</sup> )	MN (g planta <sup>-1</sup> )	N (mg planta <sup>-1</sup> )
Controle	0,00	0,7 $\pm$ 0,2b	104,6 $\pm$ 47b	0,1 $\pm$ 0,08b	13,4 $\pm$ 6b
I. Convencional	62,0 $\pm$ 2a	1,4 $\pm$ 0,2a	510,4 $\pm$ 139a	0,8 $\pm$ 0,06a	30,0 $\pm$ 5ab
I. In Vitro	64,0 $\pm$ 3a	1,8 $\pm$ 0,5a	551,8 $\pm$ 145a	1,0 $\pm$ 0,2a	28,4 $\pm$ 9ab
<i>Rhizobium</i> .	0,00	0,5 $\pm$ 0,1b	66,2 $\pm$ 22 b	0,1 $\pm$ 0,2b	19,7 $\pm$ 5ab
Rhizobium.+ I. Convencional	62,8 $\pm$ 2,5a	1,5 $\pm$ 0,3a	503,3 $\pm$ 43a	0,9 $\pm$ 0,2a	33,3 $\pm$ 10a
Rhizobium + I. In Vitro	69,4 $\pm$ 1,2a	1,6 $\pm$ 0,3a	504,5 $\pm$ 131a	0,8 $\pm$ 0,1a	33,9 $\pm$ 7a

<b>Substrato Não Esterilizado</b>					
Treatments	CM (%)	B (g planta <sup>-1</sup> )	P ( $\mu\text{g}$ planta <sup>-1</sup> )	MN (g planta <sup>-1</sup> )	N (mg planta <sup>-1</sup> )
Controle	49,0 $\pm$ 2c	1,6 $\pm$ 0,1a	283,8 $\pm$ 79c	0,8 $\pm$ 0,1ab	29,9 $\pm$ 4,0a
I. Convencional	55,0 $\pm$ 2bc	1,4 $\pm$ 0,2a	367,1 $\pm$ 29bc	0,8 $\pm$ 0,1ab	24,5 $\pm$ 8,2a
I. In Vitro	62,0 $\pm$ 3ab	1,7 $\pm$ 0,2a	535,9 $\pm$ 75a	1,0 $\pm$ 0,2a	29,2 $\pm$ 3,6a
<i>Rhizobium</i> .	59,0 $\pm$ 5b	1,4 $\pm$ 0,1a	422,8 $\pm$ 49bc	0,6 $\pm$ 0,2b	24,8 $\pm$ 5,1a
Rhizobium + I. Convencional	59,0 $\pm$ 8bc	1,5 $\pm$ 0,2a	476,9 $\pm$ 76ab	0,8 $\pm$ 0,2ab	28,1 $\pm$ 5,2a
Rhizobium + I. In Vitro	70,0 $\pm$ 7a	1,7 $\pm$ 0,3a	507,3 $\pm$ 90ab	0,9 $\pm$ 0,1ab	29,1 $\pm$ 7,7a

No experimento com sementes tratadas quimicamente com fungicidas, os dois métodos promoveram um aumento na colonização micorrízica em relação ao controle sem inoculação. Em algodão o método de inoculação no solo foi mais eficiente do que a inoculação com recobrimento das sementes. (Tabela 4). Em sementes de soja os dois métodos apresentaram a mesma eficiência promovendo aumento na colonização micorrízica. Não foi observado nenhum efeito negativo significativo entre sementes tratadas e não tratadas quanto à colonização micorrízica. Quanto à produção de biomassa não foi observado um efeito sobre a produção de biomassa no algodão, já na soja as plantas micorrizadas apresentaram maior biomassa do que o controle sem inoculação (Tabela 4).

**Tabela 4** - Colonização e produção de biomassa em algodão e soja após a inoculação de *R. clarus* produzido *in vitro* em sementes tratadas quimicamente. (CM) colonização micorrízica; (B) biomassa. (ST) semente tratada; (SNT) semente não tratada. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=5$ .

Tratamentos		Algodão		Soja	
		CM (%)	B (g planta <sup>-1</sup> )	CM (%)	B (g planta <sup>-1</sup> )
Controle	ST	51.9±9.8c	3.6±0.5ab	64.7±7.4c	1.6±0.5b
	SNT	66.0±1.9bc	3.2±0.5ab	60.0±12.1c	2.6±1.5ab
Inoculação por revestimento	ST	76.0±11.3ab	3.1±0.4ab	89.7±7.6a	4.4±0.9ab
	SNT	74.0±3.5ab	4.2±0.4 <sup>a</sup>	84.2±7.3ab	5.7±2.3a
Inoculação no solo	ST	89.3±2.5a	2.3±0.4b	90.3±7.5a	4.5±1.7ab
	SNT	87.1±2.7a	3.0±0.6ab	86.0±5.6ab	5.8±0.4a

### 4.3 DISCUSSÃO

A sobrevivência dos esporos dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no solo tem sido associada à arquitetura grossa da parede e a sua capacidade de entrar em estado de dormência. No entanto, na fase de germinação e crescimento do micélio (fase pré-simbiótica) podem ser afetados por vários fatores físicos, químicos e biológicos (GIOVANNETI et al., 2010).

Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de FMA, a quebra da dormência dos esporos é considerada um fator importante, fazendo necessária a avaliação de diversos fatores, como por exemplo, o tempo e temperatura de armazenamento dos esporos, o pH do meio para germinação e a temperatura de incubação. Para o caso dos esporos de *R. clarus* o armazenamento em câmara úmida a 4 °C por 8 dias antes da desinfecção foi suficiente para quebrar a dormência dos esporos. Efeitos semelhantes foram observados na quebra da dormência em esporos *Rhizohagus intraradices* (= *Glomus intraradices*), em que o armazenamento de mais de 14 dias a 4 °C aumentou significativamente a percentagem de germinação de esporos (JOGE et al., 2002; ESKANDARI; DANESH, 2010).

Por outro lado, as espécies de FMA requerem uma determinada faixa de pH para a germinação e crescimento do micélio; esta condição pode variar entre espécies ou isolados da mesma espécie. Segundo alguns autores o pH neutro ou alcalino é ótimo para a germinação de esporos do gênero *Glomus* (HEPPER, 1984). No entanto, no presente estudo, a maior percentagem de germinação de esporos de *R. clarus* foi observada a um pH mais ácido (5,5). A cultura *in vitro* de *G. deserticola* em meio M, a um pH de 5,5, também tem sido bem sucedida (MATHUR; VYAS, 1999). Costa et al. (2013) descreveram o crescimento *in vitro* de *R. clarus* numa faixa de pH desde 4,0 a 6,5; observando um melhor desenvolvimento em pH 4,0. Neste contexto, é importante ressaltar que, independentemente de gêneros ou espécies cada isolado de FMA proveniente de um ambiente específico pode, de fato, representar um ecótipo adaptado às características peculiares do solo. Assim, fungos isolados de solos ácidos ou alcalinos requerem um pH de acordo com a sua origem no crescimento *in vitro* (FORTIN et al., 2002; GIOVANNETI et al., 2010).

Após a germinação dos esporos, o ciclo de vida no gênero *Glomus* inclui um estágio de pré-simbiótico, seguido pela colonização da raiz hospedeira denominada fase simbiótica (DALPE et al., 2005). A germinação de esporos do gênero *Glomus* e o alongamento do tubo germinativo não são afetados pela presença de planta hospedeira (GIOVANNETTI; SBRANA, 1998); razão pela qual foi possível a germinação dos esporos na ausência de raízes. No entanto, o crescimento das hifas ocorre em resposta aos exsudados antes do contato físico entre os simbiontes (Mosse, 1962). A produção de vesículas na fase pré-simbiótica de *R. clarus* foi descrita por Souza e Berbara (1999). Embora estes possam ser considerados esporos juvenis, sua capacidade de germinação nunca foi demonstrada (DALPE et al., 2005).

A presença de hifas RH está relacionada com a colonização do substrato e a raiz (DALPE et al., 2005). Além disso, de acordo com Bago et al. (1998), a presença de hifas ramificadas (BH), uma vez que a simbiose é estabelecida, pode estar relacionada com uma função de absorção de nutrientes e tem uma ocorrência generalizada nas culturas *in vitro* de vários FMA (BAGO; CANO, 2005). A diferenciação de esporos ocorreu ao longo das ramificações laterais das hifas RH, como descrito por de Souza e Berbara (1999).

Muitos estudos fornecem informações úteis sobre os aspectos genéticos, fisiológicos e morfológicos de fungos do gênero *Glomus in vitro*. Entretanto há pouca informação a respeito do desenvolvimento dos fungos em culturas contínuas para a produção de inóculo. O primeiro cultivo contínuo *in vitro* de FMA foi alcançado por Strullu e Romand (1986), utilizando fragmentos de raízes colonizadas como método de subcultura. O mesmo método foi usado por St-Arnaud et al. (1996) para o aumento do crescimento do micélio e produção de esporos de *G. intraradices* em sistema bicompartimental. Por outro lado, usando o método de subcultura por fragmentos de gel, foi obtido um aumento da produção de esporos de *G. intraradices* (DOUDS, 2002).

Neste estudo foi demonstrado que tanto fragmentos de raiz colonizada, como fragmentos de gel contendo propágulos do fungo, são adequados para a manutenção do cultivo *in vitro* de *R. clarus*. Uma maior produção de esporos foi observada no método de subcultura por fragmentos de gel, provavelmente

relacionado com uma maior quantidade de fragmentos de hifas em crescimento ativo no inóculo inicial. Estes fragmentos de hifas são estimulados pelo crescimento da raiz, proporcionando um maior desenvolvimento do micélio extra-radicular, e conseqüentemente uma maior colonização e produção de esporos.

A dinâmica da produção de esporos em fungos micorrízicos arbusculares é um parâmetro importante para a produção de inóculo. Declerck et al. (1996) relataram a ocorrência da esporulação de FMA em três fases: uma fase de baixa produção de esporos, um período de intensa produção de esporos e uma fase de platô. Neste trabalho, estas três fases são bem representadas pelo modelo Gompertz para os dois métodos de subcultura. De acordo com Declerck et al. (2001), as estirpes de FMA que tem um curto período de baixa produção de esporos; seguido de um período mais longo de alta produção de esporos; como se observa no presente caso, estaria mais bem adaptado para a esporulação e, portanto, para a produção em massa de inóculo. Isso indica um grande potencial deste isolado visando uma abordagem aplicada.

Nos experimentos de potencial de colonização foi observada uma boa capacidade de induzir colonização micorrízica no solo do inóculo de *R. clarus* produzido *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados por Vimard et al. (1999). Isto indica que o inóculo de *R. clarus* foi eficiente na competição com os FMA nativos no substrato não estéril e não foi influenciado negativamente pelas condições do solo. As diferenças na porcentagem de colonização entre o algodão e soja podem estar relacionadas com a dependência micorrízica de cada uma destas espécies. O aumento na absorção de P coincidiu com uma maior biomassa vegetal em plantas micorrizadas nos substratos esterilizados, demonstrando funcionalidade da associação micorrízica na absorção de nutrientes. Nas plantas de soja, a inoculação de micorrízica estimulou o desenvolvimento de massa de nódulos como observado por (WANG et al., 2011), demonstrando a ação sinérgica da colonização micorrízica e a fixação de nitrogênio.

Nenhum efeito significativamente repressivo da colonização micorrízica foi observado após a inoculação de *R. clarus* em sementes de algodão e soja tratadas com antifúngico, no entanto, para as duas espécies de plantas a colonização micorrízica foi maior no método de inoculação do solo comparado com o

método de inoculação por revestimento da semente. Os componentes ativos dos produtos utilizados no tratamento das sementes são, nos dois casos, fungicidas sistêmicos. As diferenças na colonização radicular nos dois métodos de inoculação podem estar relacionadas com um contato menos direto das estruturas do fungo micorrízico com os fungicidas ou uma baixa sensibilidade deste isolado de *R. clarus* a estes produtos. Alguns estudos têm sido feitos em relação a este assunto, mas os resultados em alguns casos são contraditórios. Contrariamente com nossos resultados Jin et al. (2013) mostraram que alguns fungicidas sistêmicos podem ter um impacto negativo sobre os fungos micorrízicos. Por outro lado, Borrows e Ahmed (2007) observaram que o tratamento de sementes com fungicidas não teve uma influência negativa na colonização micorrízica. Concordando com nossos resultados este estudo conclui que a inoculação micorrízica e o tratamento químico com antifúngicos podem ser compatíveis.

## REFERENCIAS

ADHOLEYA, A.; TIWARI, P.; SINGH, R. Large-scale inoculum production of arbuscularmycorrhizal fungi on root organs and inoculation strategies. In: Declerck, S.; Strullu, D.G.; Fortin, J.A. (Eds). **In vitro Culture of Mycorrhizas**, First ed. New York: Springer, 2005. p. 315-338.

BAGO, B.; CANO, C. Breacking myths on arbuscular mycorrhizas in vitro biology. In: Declerck, S.; Strullu, D.G.; Fortin, J.A. (Eds). **In vitro culture of Mycorrhizas**, First ed. New York: Springer, 2005. p. 111-138.

BÉCARD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, v.108, p.211-218, 1988.

BORROWS, R.L.; AHMED, I. Fungicide seed treatments minimally affect arbuscular–mycorrhizal fungal (AMF) colonization of selected vegetable crops. **International Journal of Biological Sciences**, v.7, p.417-420, 2007.

CARR, G.R.; HINKLEY, M.A. Germination and hyphal growth of *Glomus caledonicum* on water agar containing benomyl. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.313-316, 1985.

CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPE, J. *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genome of host plant root cell. **Nature**, v.295, p.432-434, 1982.

COSTA, F.A.; HADDAD, L.S.M.; KASUYA, M.C.M.; OTON, W.C.; COSTA, M.D.; BORGES, A.C. In vitro culture of *Gigaspora decipiens* and *Glomus clarum* in transformed roots of carrot: the influence of temperature and pH. **Acta Scientiarum**, v.35, p.315-323, 2013

DALPE, Y., de SOUZA, F. A.; DECLERCK, S. Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture. In: Declerck, S.; Strullu, D.G.; Fortin, J. A. (Eds) **In vitro culture of mycorrhizas**, First ed. New York: Springer, 2005. p. 49-71.

de Souza, F. A.; Berbara, R.L.L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v.91, p.343-350, 1999.

de SOUZA, F.A.; STÜRMER, S.L.; CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUIERA, J.; de SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds) **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**, 1. ed. Lavras: Editora UFLN, 2010. p.16-73

DECLERCK, S.; D'OR, D.; CRANENBROUCK, S.; LÉBOULENGÉ, E. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. **Mycorrhiza**, v.11, p.225-230, 2001.

DECLERCK, S.; STRULLU, D. G.; PLENCHETTE, C. In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycologia**, v.100, p.1237-1242, 1996.

DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; PLENCHETTE, C. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. **Mycologia**, v.90, p.579-585, 1998

DOUDS, D.D. Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. **Mycorrhiza**, v.12, p.163-167, 2002.

ESKANDARI, A., DANESH, Y.R. Study on life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using in vitro culturing technique. **Journal of Phytopathology**, v.2, p.69-75, 2010.

FORTIN, J.A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M.; COUGHLAN, A. P.; PICHÉ, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.80, p.1-20, 2002.

GERDEMANN, J.W.T; NICOLSON, H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular micorrhizal infections in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.

GIOVANETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth – physiological and genetic aspects. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. New York: Springer, 2010. p. 3-31.

GIOVANETTI, M.; SBRANA, C. Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi **Mycorrhiza**, v.8, p.123-130, 1998.

HEPPER, C.M. Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, p.154-156, 1984.

JIN, H.; GERMIDA, J.J.; WALLEY, F.L. Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. **Applied Soil Ecology**, v.72, p.22-30, 2013.

JUGE, C.; SAMSON, J.; BASTIEN, C.; COUGHLAN, A.P.; VIERHEILIG, H.; PICHÉ, Y. Breaking spore dormancy of the AM fungus *Glomus intraradices*. **Mycorrhiza**, v.12, p.37-42, 2002.

KARANDASHOV, V.; KUZOVKINA, I.; HAWKINS, H.J.; GEORGE, E. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. **Mycorrhiza**, v.10, p.23-28, 2000.

MATHUR, N.; VYAS, A. Improved biomass production, nutrient uptake and establishment of in vitro raised *Ziziphus mauritiana* by VA mycorrhiza. **Journal of Plant Pathology**, v.155, p.129-132, 1999.

MATHUR, N.; VYAS, A. In vitro production of *Glomus deserticola* in association with *Ziziphus nummularia*. **Plant Cell Reports**, v.14, p.735-737, 1995.

MOSSE, B. The establishment of vesicular–arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. **Journal of General Microbiology**, v.27, p.509-520, 1962.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v.27, p.31-36, 1962.

NEWMAN, E.I. A method of estimating the total length of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, v.3, p.139-145, 1966.

PAWLOWSKA, T.E.; DOUDS, D.D.; CHARVAT, I. In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycological Research**, v.103, p.1549-1556, 1999.

PHILLIPS, J.; HAYMAN, D. Improved producers for clearing roots and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p.158-160, 1970.

RAMAN, N.; SAHADEVAN, C.; SRINIVASAN, V. Growth of AM fungi on in vitro root organ culture of *Sorghum vulgare* and *Saccharum officinarum*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.39, p.1293-1298, 2001.

SARRUGE, J.R, HAAG, H.P. **Análise químicas em plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1974. 56 p.

ST-ARNAUD, M.; HAMEL, C.; VIMARD, B.; CARON, M.; FORTIN, J.A. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. **Mycorrhiza**, v.5, p.431-438, 1995.

STRULLU, D.G.; ROMAND, C. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - **Sciences de la Vie**, v.303, p.245-250, 1986.

VIMARD, B.; ST-ARNAUD, M.; FURLAN, V.; FORTIN, J. A Colonization potential of in vitro-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores compared with a root-segment inoculum from open pot culture. **Mycorrhiza**, v.8, p.335-338, 1999.

WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F.; YAN, X.; LIAO, H. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v. 21, p.173-18, 2011.

**ARTIGO**

**Effect of *Rhizophagus clarus* inoculation on the growth and yield of soybean and cotton in a field conditions**

## **Effect of *Rhizophagus clarus* inoculation on the growth and yield of soybean and cotton in a field conditions**

### **Abstract**

Nutrient availability is an important factor to crops production, and regular addition of chemical fertilizer is the most common practice to improve yield in agrosystem with intensive crops production. This practice strongly influences the nutrient turnover and soil microorganism dynamic. The use of some groups of microorganisms which has specific activity providing nutrients to plant is a good alternative for crops production. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhanced nutrient for plant nutrition especially phosphorus (P) improving plant growth and increasing crops production. Unfortunately, the use of AMF as inoculant in large scale is not widely used yet, due to several limitations to obtain a large amount of AM inoculums, such as low growth of AM fungi, few number of species domesticated for in vitro culture, high competition with native AMF. The objective of this work was test the effectiveness of *Rhizophagus clarus* inocula as alternative for P supply in soybean (*Glycine max* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). The experiments were carried out in microparcels and the treatments were: Fertilizer (N, P, K dose to each crop); AMI (*R. clarus* + N and K dose to each crop); AMI + NPK (*R. clarus* +N, P, K dose to each crop); and AMI + ½ NPK (*R. clarus* + half dose N, P, K to each crop) non-inoculated and non-fertilized plant was considered control. The parameters evaluated were AM root colonization and effect of inoculation on plant growth and yield in a field conditions. The results showed that AM inoculation increased the effect of fertilizer application in soybean, and in cotton *R. clarus* was more effective than chemical fertilizer.

*Key words: AM inoculum, Nutrient uptake, Seeds inoculation, Arbuscular mycorrhizal fungi, Glycine max* L., *Gossypium hirsutum* L.

## Introduction

Nutrient availability is crucial to plant growth and crops production and is influenced by several factors such as chemical and physical properties of soil, climate and crops type (Miransari 2011). Cotton and soybean are important crops in Brazil, they are extensively cultivated and represent around of 58% of total cultivated area (CONAB 2014). To maintain crops production in tropical soils require high amount of chemical fertilization which enhancing nutrient amount and availability for plant nutrition (Miransari 2011). The large use of chemical fertilizers causes serious impact on the environment (Tilman et al. 2002). The agricultural practices highly influenced soil microorganisms decreasing soil fertility and organic matter turnover (Altieri 1999). The natural reservoir of phosphorus (P) in the world is decreasing and the price have increased in the last decade (Fixen 2009), the challenge for crops production is change to sustainable practices, finding others alternatives for increase P availability for plant nutrition, like arbuscular mycorrhiza (AM) association (Barrios 2007).

Soil microorganisms have an important role contributing significantly on nutrient availability by biochemical transformations. Some of these microorganisms act directly on plant nutrition by establishment of symbiotic associations with plant roots (Bardgett 2005). The symbiosis between AM fungi and plant roots is one of the most known beneficial interactions occurred in soil (Smith and Smith 2011), playing an important role on crops production and nutrient turnover (Andrade 2004).

The AM increases the soil inorganic nutrients uptake mainly P (Neumann and George 2010). In addition, other benefits related to AM are the stability of soil aggregates (Rillig 2004), increase resistance of water stress (Garg and Chandel 2009) and protect against pathogens (Jung et al. 2012). The use o biofertilizer is considered a good alternative to replace or reduces chemical fertilizer use. Symbiotic microorganisms have been successfully used in soybean and actually *Bradyrhizobium* and others genera of symbiotic N-fixing bacteria are extensively used as biofertilizer in intensive agricultural system (Deaker et al. 2004). However in cotton culture there is no report about the use of AM inocula in a field conditions. In recent

years, the interest of AMF has been focused finding a viable method to optimized the AM inoculum production to use as inoculant in crop systems (Gianinazzi and Vosatka 2004) and few experiments were carried out to report AM response on crops yield in a field conditions (Romero and Bago 2010)

The objective of this work was tested the effectiveness of *R. clarus*, as alternative of nutrient supply in soybean (*Glycine max* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.), by evaluating the effect of this fungi on plant growth and yield in a field conditions.

## **Materials and methods**

### *Experimental area*

The experiments were carried out at Londrina city – PR, Brazil (23°55'46" S and 51°19'11" W) during summer (November to June). The climate is a humid subtropical, with rainfall in all seasons with relative humidity around 69% and 20 cm of precipitation, the average of temperature in this period is around 29.5 °C.

Two experimental areas were used (A1 and A2) with a soil of type Rhodic Ferralsol (FAO1994); or "Latossolo Vermelho" according to Brazilian classification. Soil chemical composition and the number of indigenous AM fungi were determined before sowed by wet sieving and decanting (Gerderman and Nicolson 1963) (Table 1).

**Table 1** - Soil properties of experimental areas. S: bases sum; CEC: cation-exchange capacity; V: saturation for bases; SA: Saturation for Al; MP: mycorrhizal propagules.

Área	P	C	pH	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>						%		MP Spores/g	
	mg dm <sup>3</sup>	g dm <sup>3</sup>		Al	H <sup>+</sup> Al	Ca	Mg	K	S	CEC	V		SA
A1	12.2	18.42	4.8	0.17	6.20	5.02	1.76	0.84	7.62	13.8	55.13	2.18	3
A2	17.3	17.45	5.0	0.00	5.76	4.15	1.72	0.56	6.43	12.2	52.74	0.00	4
P-K: Mehlich I			Ca-Mg-Al: KCl M					pH: CaCl <sub>2</sub> 0.01 M					

#### *Monoxenic culture of Rhizophagus clarus in root organ system*

The culture of transformed roots of *Daucus carota* by *Agrobacterium rhizogenes* with Ri-T-DNA was maintained by continuous subcultures of young colonized roots fragments with *R. clarus* (every 4-5 weeks at 25 °C, dark) at modified Strullu-Romand media (MRS) (Declerck et al. 1998).

Petri dishes with massive growth of *R. clarus* and colonized roots were used as crude inoculum. The procedure of inocula obtention and seeds inoculation used is the according to described in the patent INPI BR 10 2014 017389 7 – 15/07/2014

#### *Experimental design*

Two experiments were carried out with soybean on harvest 2012/13 (E1) using soybean var BRS 133 and 2013/14 (E2) with soybean var BRS 359 RR. The experiment was composed by four treatments: i) 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20 (Fertilizer) ; ii) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:0:20 (AMI) ; iii) *R. clarus* plus 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20 (AMI + NPK) ; and iv) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20 (AMI + ½ NPK) and non-AM and non-fertilizer was considered as control. In soybean the nitrogen (N) supply in all treatments were a commercial inoculant (Rizo Plus® Rhizobacter) composed by *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 and SEMIA

5080) according to the manufacturer's recommendation. In the treatments that were supply only K the source used was KCl.

One experiment was carried out with cotton in A2 area during December to June (2013/2014), and was sowed the cultivar FM 975WS. The experiment was composed by one control non-AM and non-fertilizer and four treatments: T1) 200 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; T2) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> PK 0:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; T3) *R. clarus* plus 200 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; and T4) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea.

The experiments were arranged in completely randomized blocks design with five replicates with ten plants per treatment. Each replicate was in plots of 5 x 8 m (40 m<sup>2</sup>) with 0.45 m between rows, and the density was ten plants per linear meter. In each plot were considered two lateral lines of edge.

The statistical analysis were performed based on the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (HSD) at level of  $p \leq 0.05$ . The analysis were carried with STATISTICA 7.0 software.

#### *Harvest and evaluations*

The effect of *R. clarus* inoculum on plant growth was considered by influence on plant height, biomass production and soybean or cotton lint yield. The total plant height was measured from the soil surface to the insertion of last leaf and shoot dry weight was determined after draying at 50 °C by 72 h. The N and P uptake of shoot tissues was evaluated according Murphy and Riley (1962) and Sarruge and Haag (1974), respectively.

The percentage of AM colonization was estimated by grid-line method (Giovanetti and Mosse, 1980) after fresh roots staining (Phillips and Hayman 1970), and relative mycorrhizal dependency (RMD) was determined by equation described bellow (Plenchete et al1983).

$$RMD = \frac{(\text{Dry mass } R. \text{clarus mycorrhizal plant}) - (\text{Dry mass native mycorrhizal plants})}{(\text{Dry mass } R. \text{clarus mycorrhizal plant})} \times 100$$

The soybean root was sampled at 30 days after emergence (DAE). Five plants per treatment of each plot were randomly collected and evaluate the early AM colonization. After 80 DAE the second sampling was evaluated AM colonization, total shoot height and dry weight, shoot N and P concentration. Soybean grain was harvest after 120 days DAE, dried at room temperature and weighted.

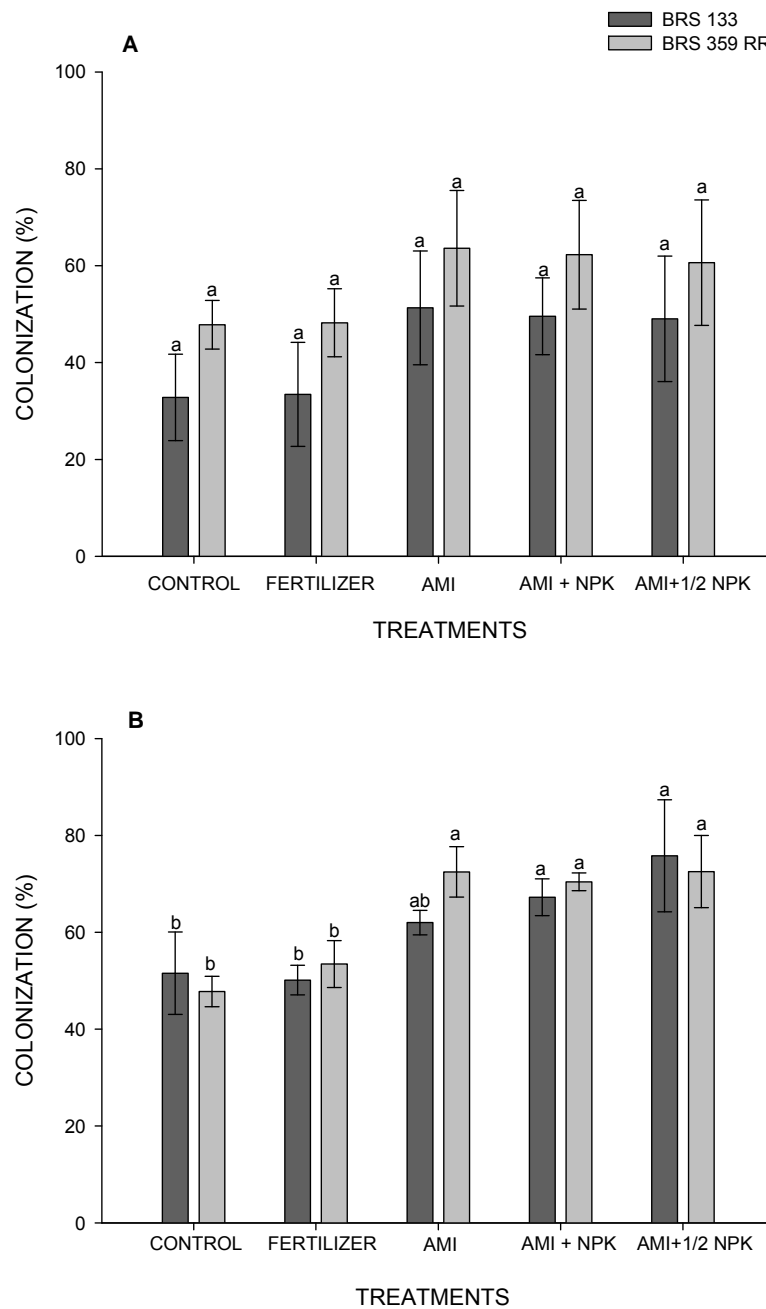
The cotton plants and roots were sampled at 120 days after DAE. Five plants per treatment of each plot were randomly collected and evaluate de AM colonization, total shoot height, dry weight, shoot N and P concentration. Cotton yield was estimated at 190 DAE by count of opened and unopened bolls in twenty plants in central rows of each plot.

## Results

### *Soybean experiments*

The data of soybean is related to last harvest that was sowed BRS 359RR variety, except for AM colonization. The response of BRS 133 and BRS 359RR varieties were the same by *R. clarus* inoculation at the both evaluation times. After 30 DAE *R. clarus* increased AM colonization on soybean plants around 20 % when compared with non-inoculated plants and among treatments no differences was observed (Fig 1).

At 80 DAE, all AM treatment showed significative differences when compared with non-AM fertilized plant and control. *R. clarus* colonization was highest (70 %) for two cultivars. Plants inoculated with *R. clarus* showed values of root colonization 20 % more than non-inoculated plants (Fig 1).



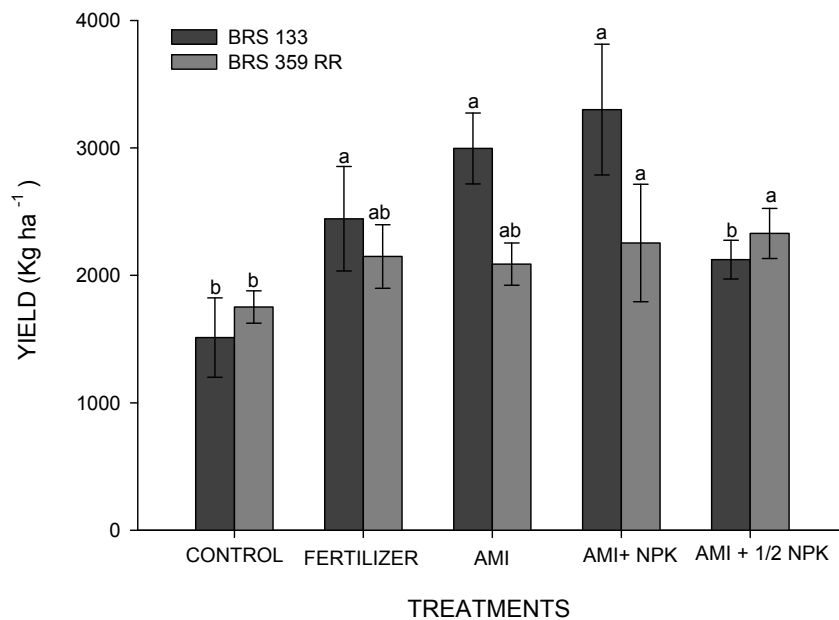
**Fig 1** - Effect of *R. clarus* on root colonization of two varieties of soybean at 30 days (A) and 80 days (B). (Control) non-AM and non-fertilizer; (Fertilizer) 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:0:20; (AMI + NPK) *R. clarus* plus 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI + ½ NPK) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20. Columns followed by the same letter are not significantly different among treatments, in the same variety as determined by Tukey test (n = 5) at  $p < 0.05$ . Bars represent standard error of means

Differences in N and P uptake was significant in AM plants when compared with control. The combination of AMI + PK highly increased N and P uptake around 24% more when compared with soybean only fertilized and associated with native AMF, the same effect was observed on biomass (Table 2). The inoculation of *R. clarus* in non-fertilized soybean did not show significant differences when compared with fertilized plants associated with native AM in all parameters evaluated. On the other hand, control soybean was smaller than Fertilizer, AMI + K and AMI + 1/2 PK treatments showed significant differences in relation to control but, did not differ from each in plant biomass and nutrient uptake, except for height (Table 2).

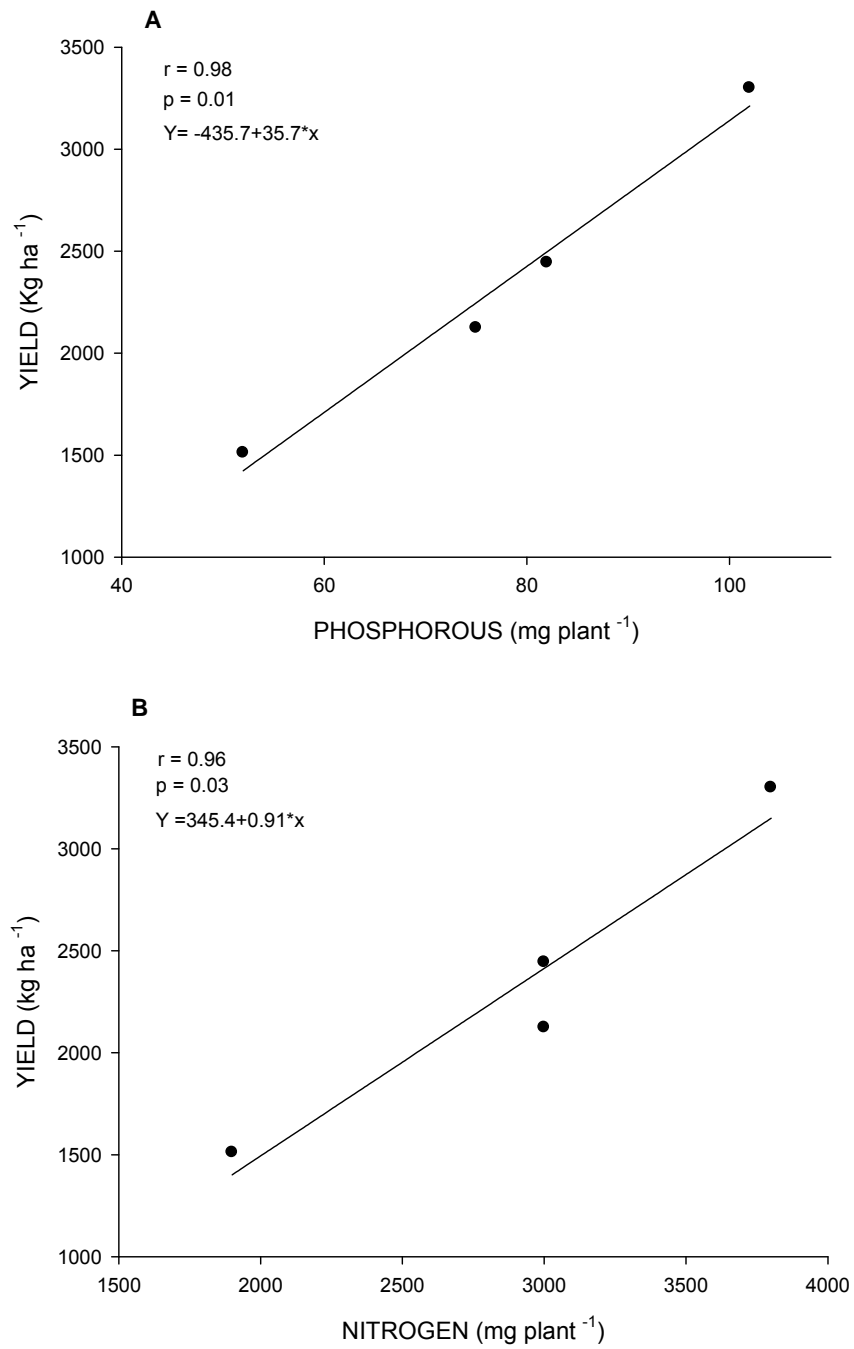
**Table 2** - Effect of AM inoculation on height, biomass and nutrients uptake in soybean plants at 80 DAE. (Control) non-AM and non-fertilizer; (Fertilizer) 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:0:20; (AMI + NPK) *R. clarus* plus 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI + ½ NPK) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20. Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by Tukey test.

Treatments	Height cm	Biomass g plant <sup>-1</sup>	P mg plant <sup>-1</sup>	N mg plant <sup>-1</sup> (x10)	RMD %
Control	64± 5a	21.4 ± 11c	52± 29c	190± 90c	--
Fertilizer	64±8a	32.4 ± 10ab	82± 30ab	300± 80ab	--
AMI	62± 7a	28.9 ± 7ab	73± 13ab	280± 50ab	26
AMI+ NPK	57± 6a	40.0 ± 8a	102± 25a	380± 90a	47
AMI + ½ NPK	65± 11a	28.6 ± 9ab	75± 24ab	300 ± 90ab	26

The *R. clarus* inocula increased grain yield of two soybean cultivars. The cultivar BRS 133 did not show any differences among AMI+PK, *R. clarus* plants and fertilizer plant associated with native AM fungi. For the soybean BRS 359 the best grain yield was observed in AMI+PK and AMI+1/2PK (Fig 2). The soybean BRS 133 showed high correlation ( $r= 0.98$ ;  $p= 0.01$ ) between grain yield and P uptake (Fig 3A). The same results were observed with grain yield and N uptake ( $r= 0.96$  ;  $p= 0.03$ )(Fig 3B).



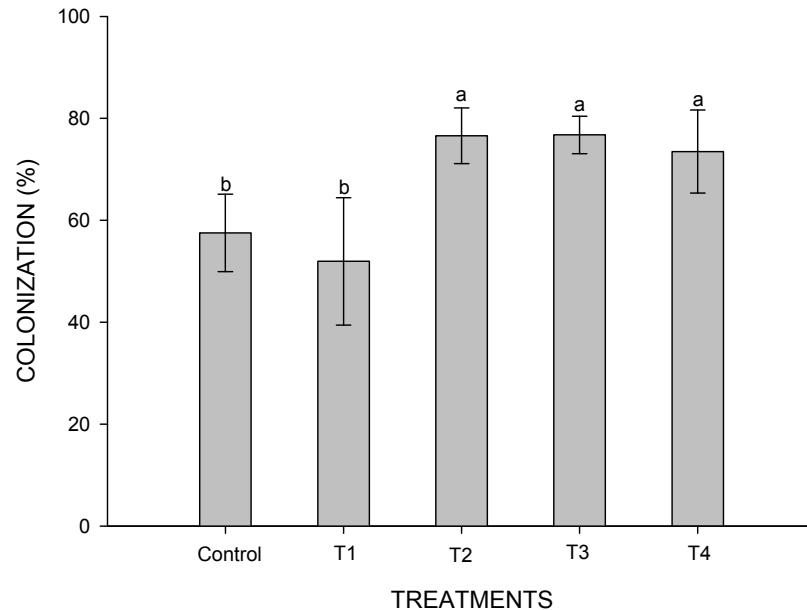
**Fig 2 -** Effect of AM inoculation on grain yield of two cultivars of soybean. (Control) non-AM and non-fertilizer; (Fertilizer) 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:0:20; (AMI + NPK) *R. clarus* plus 200 kg ha<sup>-1</sup> NPK 0:20:20; (AMI + ½ NPK). Columns followed by the same letter are not significantly different between treatments for each soybean variety ( $p < 0.05$ ) was determined by Tukey test. Bars represent standard error of means.



**Fig 3 -** Correlation between shoot nutrients uptake and grain yield of soybean var BRS133. (A) Shoot P uptake and grain yield. (B) Shoot N uptake and grain yield

### Cotton experiment

The *R. clarus* inocula increased around 30% of root colonization in the absence or presence of fertilizer doses when compared with plant associated with native AM fungi at 120 DAE (Fig 4).



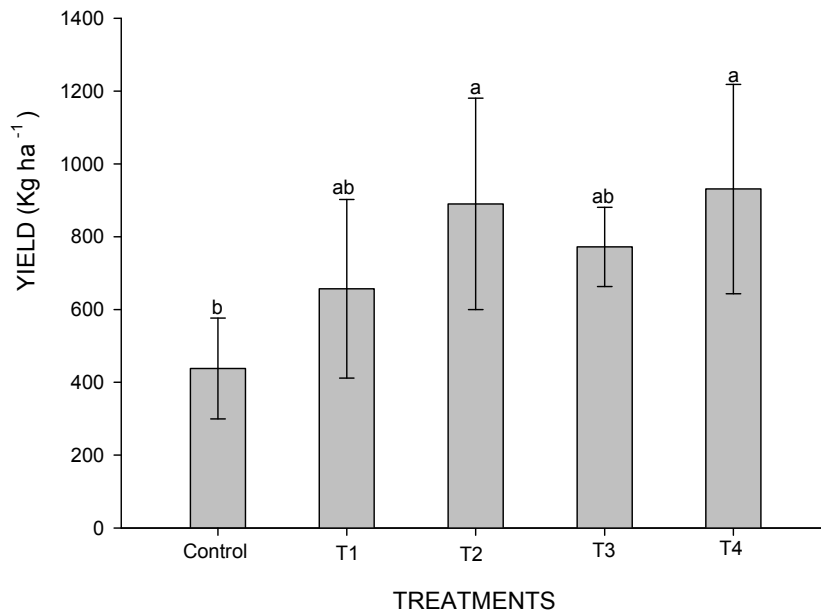
**Fig 4 -** Effect of AM inoculation on root colonization in cotton at 120 days after emergence (DAE). (Control) non-AM and non-fertilizer; (T1) 200 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T2) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> PK 0:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T3) *R. clarus* plus 200kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T4) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea. Columns followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) between treatments by Tukey test. Bars represent standard error of means for each treatment.

Cotton plant height did not show significant differences among treatment even with control plant. The biomass was lower in control plants when compared with all treatments and not differ among them. P uptake showed the same differences found in biomass. The N uptake was significant different in plants inoculated with *R. clarus* in presence or absence of P when compared with control plants (Table 3). The RMD was not observed significant differences in plants inoculated with *R. clarus*.

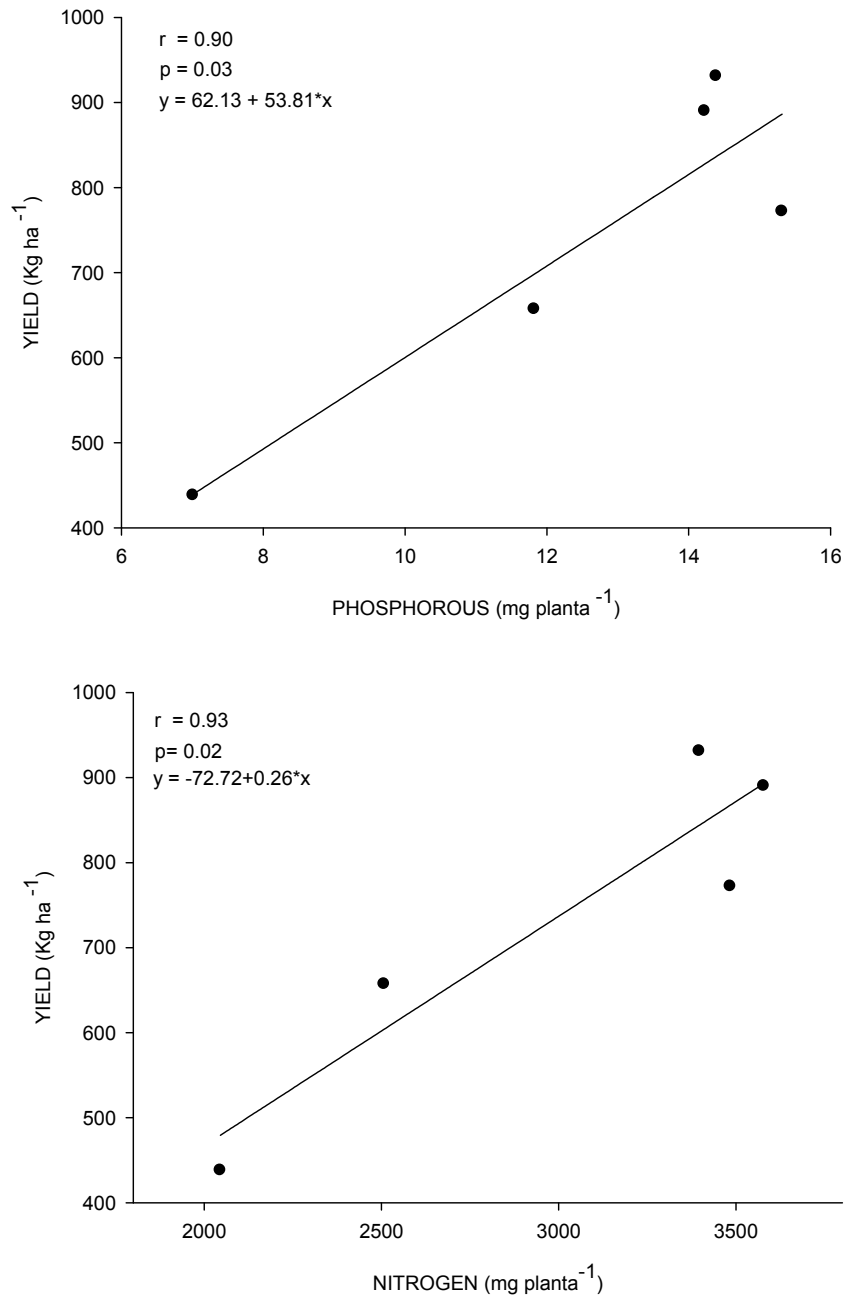
**Table 3** - Effect of *R. clarus* inoculation on total shoot height, biomass, P and N shoot uptake of cotton plants at 120 DAE. (Control) non-AM and non-fertilizer; (T1) 200 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T2) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> PK 0:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T3) *R. clarus* plus 200kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T4) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea. (RMD) relative mycorrhizal dependency. Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by Tukey test.

Treatments	Height Cm	Biomass g plant <sup>-1</sup>	P mg plant <sup>-1</sup>	N mg plant <sup>-1</sup> (x10)	RMD %
Control	139.7 ± 15 <sup>a</sup>	48 ± 12 <sup>b</sup>	7 ± 2 <sup>b</sup>	204.6 ± 50 <sup>b</sup>	---
T1	137.7 ± 11 <sup>a</sup>	59 ± 15 <sup>ab</sup>	12 ± 4 <sup>ab</sup>	250.8 ± 60 <sup>ab</sup>	---
T2	129.0 ± 14 <sup>a</sup>	87 ± 15 <sup>a</sup>	14 ± 2 <sup>a</sup>	357.8 ± 50 <sup>a</sup>	45
T3	143.0 ± 5 <sup>a</sup>	81 ± 18 <sup>a</sup>	15 ± 4 <sup>a</sup>	348.4 ± 90 <sup>a</sup>	41
T4	136.3 ± 21 <sup>a</sup>	82 ± 24 <sup>a</sup>	14 ± 3 <sup>a</sup>	339.7 ± 90 <sup>ab</sup>	41

The *R. clarus* inocula did not increase lint cotton yield among treatments except when compared with control (Fig 5). A correlation ( $r = 0.90$ ) between P uptake and lint cotton yield showed significant differences ( $p < 0.02$ ). The correlation between N uptake showed high correlation ( $r = 0.96$ ) and significant difference was also observed ( $p < 0.03$ ) (Fig 6).



**Fig 5 -** Effect of *R. clarus* inoculation on lint cotton yield. (Control) non-AM and non-fertilizer; (T1) 200 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T2) *R. clarus* plus 65 kg ha<sup>-1</sup> PK 0:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T3) *R. clarus* plus 200kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea; (T4) *R. clarus* plus 100 kg ha<sup>-1</sup> PK 20:20 + 200 kg ha<sup>-1</sup> urea. Columns followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) as determined by Tukey ( $n = 5$ ). Bars represent standard error of mean.



**Fig 6 -** Correlation between shoot nutrients uptake and lint cotton yield. (A) Shoot P uptake and lint cotton yield. (B) Shoot N uptake and lint cotton yield.

## Discussion

The inoculation of *R. clarus* increased plant growth and yield of two varieties of soybean and cotton. Apparently the inocula produced in vitro was more competitive than native AM fungi, once inoculated plant increased AM colonization, P and N shoot uptake. The soybean and cotton showed different response for *R. clarus* inocula, first at all in soybean there is a triple interaction (*Bradyrhizobium* – *R. clarus* – plant root) and the inocula tested was infective and effective since was inoculated together with symbiotic bacteria.

The success of AM inoculation in agricultural soils can be determined by many factors such as species compatibility, habitat niche available for AM fungi and capacity of competition with native fungi (Verbruggen et al. 2013). Compatibility is an important point for AMF inoculation whereas some isolates could be host 'specialists', while others are 'generalists' (Öpik and Moora 2012). The inocula of *R. clarus* tested was generalist once enhanced both plant growth and yield. In this way AMF that is considered plant host generalist have high establishment effect in several crops (Öpik and Moora 2012), the results showed that soybean and cotton was effectively colonized, this indicate a low specificity by host plant by *R. clarus*.

In the experiments, mycorrhizal colonization in control plant was around 50% indicating that the agricultural soils support an active endogenous AMF community. The adaptation and competition capacity against endogenous AM fungi of *R. clarus* was high. The problem to obtain effective AM inocula to use in large scale is exactly this factors that the inocula showed, good infectivity and affectivity capacity and high competition power in a field conditions.

As well known the P soil availability is one the most important factor of the AM fungi regulation and this characteristic is directly related with the roll of P uptake in the mutualistic AM symbiosis (Smith 2003; Breullin et al. 2010; Gutjahr and Parniske 2013). Our results shown that in soybean and cotton, the moderate phosphate soil availability in experimental areas (12 and 17 mg dm<sup>3</sup>) did not inhibit root colonization of native AM population and inoculum of *R. clarus*. The

effectiveness of AM inoculation in greenhouse experiments with phosphate fertilization showed that moderate phosphate availability can allow mycorrhizal colonization and promoting plant growth (Schroeder and Janos 2005, Taffouo et al. 2013, Xie et al. 2014) and the same responses was found in a field conditions in soybean (Maddox and Soileau 1991, Karaca et al., 2013,)

On other hand, P soil availability can be determined by soil chemical characteristics; that influence phosphate solubility. In acid soils the phosphate level available is reduced by immobilization, even with fertilizer applications making unavailable to plant (Busman et al. 2002). Rhodic Ferralsol soils of experimental area shown low pH and can adsorbed phosphate and AM fungi has important role on the enhanced P uptake and availability including P from chemical fertilization.

Plants with high P requirements shows high RMD index (Plenchete et al. 1983). Cotton showed high RMD (45%) than soybean (26%) when inoculated with *R. clarus* in the presence or absence of fertilizer. In contrast, when P was added in the recommended dose in combination with AM inoculation this index decreases to 41% in cotton and increase to 47% in soybean, suggesting that the gain of biomass was related with P availability from fertilized that *R. clarus* provide to plant root. The same results were found by Thompson et al. (2012).

The fact P and N uptake increased in both crops, it may be related to *R. clarus* association as observed by others Authors (Allen at al. 2003, Barea et al. 2005). AM fungi improved plant nutrition increasing grain yield in soybean and cotton lint production, the positive correlation between plant nutrition and yield was found in this study. A positive linear relationship between P and yield also was observed by Manhata et al. (2014) in soybean when inoculated with AM. The effect of *R. clarus* on cotton growth and yield found agree with Thompson et al. (2012) that found an increase of cotton seeds yield when inoculated with *G. mosseae*. However is the first time that was evaluated *R. clarus* inocula obtained in axenic conditions on field conditions.

In conclusion, the inocula of *R. clarus* tested showed great competitively against endogenous AM, and also increased plant growth and yield. The *R. clarus* obtained in vitro tested in the field was efficient to start early AM infection in seedlings improving AM colonization in soybean and cotton. The inoculum of *R. clarus* help

plant to take P from fertilizer and showed high potential to use in intensive agriculture system in large areas in tropical soils, increasing P supply and crop production.

## References

- Allen MF, Swenson W, Querejeta, JI, Egerton-Warburton LM, Treseder KK (2003) Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annu Rev Phytopathol* 41:271-303
- Altieri MA (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agr Ecosyst Environ* 74:19-31
- Andrade G (2004) Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma A, Abbott L, Werne D, Hampp R (Eds) *Plant Surface Microbiology*. Springer, New York, pp. 51-68.
- Bardgett RD (2005) Organism interactions and soil processes. In: Bardgett RD (Ed). *The biology of soil a community and ecosystem approach*. Oxford University press, New York, pp 57-85
- Barea JM, Azcón R, Aguilar AC (2005) Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: BUSCOTAND F, VARMA A (Eds) *Soil Biology*. Springer, New York, pp.195-208
- Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druege U, Hause B, Bucher M, Kretschmar T, Bossolini E, Kuhlemeier C, Martinoia E, Franken P, Scholz U, Reinhardt D (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia* hybrid and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J* 64: 1002-1017
- Busman L, Lamb J, Randall G, Rehm G, Schmitt M (2002) The nature of phosphorus in soils. Regents of the University of Minnesota. <http://www.extension.umn.edu/agriculture/nutrient-management/phosphorus/the-nature-of-phosphorus/>. Accessed 26 June 2014
- Conab (2014) Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, Safra 2013/14, pp.1-80.

- Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR (2004) Legume seed inoculation technology: a review, *Soil Biol Biochem* 36:1275-1288
- Garg N, Chandel S (2010) Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions, a review. *Agron Sustain Dev* 30: 581599.
- Gerdemann JWT, Nicolson H (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Myc Soc* 46: 235-244.
- Gianinazzi S, Vosátka M (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Can J Bot* 82: 1264-1271
- Giovanetti M, MOSSE B (1980) Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular micorrhizal infections in roots. *New Phytol* 84:489-500
- Gutjahr C, Parniske M (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Biol* 29:593-617
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JÁ, Pozo MJ (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol* 38:651-664.
- Karaca H, Uygur Vi, Özkan A, Kaya Z (2013) Effects of mycorrhizae and fertilization on soybean yield and nutrient uptake. *Commun Soil Sci Plan* 44:2459-2471
- Maddox JJ, Soileau JM (1991) Effects of phosphate fertilization, lime amendments and inoculation with VA-mycorrhizal fungi on soybeans in an acid soil. *Plant Soil* 134: 83-93
- Mahanta D, Rai RK, Mishra SD, Raja A, Purakayastha TJ, Varghese E (2014) Influence of phosphorus and biofertilizers on soybean and wheat root growth and properties. *Field Crops Res.* doi: 10.1016/j.fcr.2014.06.016
- Miransari, M (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 875-885.
- Murphy J, Riley JPA (1962) Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31-36

- Neumann E, George E (2010) Nutrient uptake: the arbuscular mycorrhiza fungal symbiosis as a plant nutrient acquisition strategy. In: Koltai H, Kapulnik Y (Eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer, New York, pp 137-167
- Öpik M, Moora M (2012) Missing nodes and links in mycorrhizal networks. *New Phytol* 194: 304-306.
- Pellegrino E, Turrini A, Gamper HA, Cafa G, Bonari E, Young JPW, Giovannetti M (2012) Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. *New Phytol* 94: 810-822
- Phillips J, Hayman D (1970) Improved procedures for clearing roots and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Brit Mycol Soc* 55: 158-160
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983) Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility: Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199-209
- Romero CC, Bago A. (2010) Inoculante aséptico de micorrización de micorrización y procedimientos de aplicación en condiciones in vitro y ex vitro. Patent WO 2007/014974.
- Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J Soil Sci* 84: 355-363.
- Sarruge JR, HAAG HP (1974) *Análise químicas em plantas*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pp 1-56
- Schroeder MS, Janos DP (2005) Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza* 15: 203-216
- Smith SE, Smith FA (2011) Mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol* 62: 227-50

- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* 133:16-20
- Taffouo VD, Ngwene B, Akoa A, Franken P (2013) Influence of phosphorus application and arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, foliar nitrogen mobilization, and phosphorus partitioning in cowpea plants. *Mycorrhiza*. doi:10.1007/s00572-013-0544-5
- Thompson JP, Seymour NP, Clewett TG (2012) Stunted cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fully recovers biomass and yield of seed cotton after delayed root inoculation with spores of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*). *Australas Plant Path* 41:431-437.
- Verbruggen E, van der Heijden MGA, Rillig MC, Kiers T (2013) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytol* 197:1104-1109.
- Xie X, Wenga B, Cai B, Dong Y, Yan C (2014) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth and nutrient uptake of *Kandelia obovata* seedlings in autoclaved soil. *Appl Soil Ecol* 75:162-171

**PATENTE**

**Processo de produção e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares**

INPI BR 10 2014 017389 7 – 15/07/2014

## RESUMO

### **Processo de produção e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares**

Campo de aplicação: Agricultura

A presente invenção trata do estabelecimento de um processo de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associado a raízes de cenoura transformadas *in vitro*. Este processo inovador permite a redução do tempo e o aumento da multiplicação de propágulos por indução da diferenciação celular, assim como a introdução de um substrato inerte de argila expandida ou vermiculita que funciona como veículo do inoculante otimizando o processo de inoculação para o cultivo intensivo agrícola de todas as plantas cultiváveis. Além destes benefícios, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares permite a total ou parcial substituição do fósforo da adubação com comprovada eficiência agrônômica.

## **RELATÓRIO DESCRITIVO**

### **Processo de produção e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

001 A presente invenção trata do estabelecimento de um processo de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associado a raízes de cenoura transformadas *in vitro*. Este processo inovador permite a redução do tempo e o aumento da multiplicação de propágulos por indução da diferenciação celular, assim como a introdução de um substrato inerte de argila expandida ou vermiculita que funciona como veículo do inoculante otimizando o processo de inoculação para o cultivo intensivo agrícola de todas as plantas cultiváveis. Além destes benefícios, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares permite a total ou parcial substituição do fósforo da adubação com comprovada eficiência agrônômica.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

002 Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são organismos biotróficos obrigatórios, que se associam com raízes de plantas vasculares terrestres, epífitas, aquáticas e também com rizóides e de talos de briófitas e outros vegetais formando uma relação mutualística denominada micorriza arbuscular (MA) (de Souza et al. 2010).

003 A MA é a mais conhecida interação entre microrganismos e plantas, e tem um papel muito importante na produtividade vegetal e na ciclagem dos nutrientes (Andrade, 2004; Giri et al., 2005). Esta associação é desenvolvida nas raízes das plantas quando o fungo coloniza as células do córtex acessando aos produtos celulares das plantas.

004 A contribuição do fungo à simbiose é complexa, mas em termos gerais, considera-se a transferência de nutrientes do solo a planta, especialmente fosfatos, como o aporte mais importante nesta relação (Deubel e Merbach, 2005). Por sua vez, a planta proporciona ao fungo simbionte (heterotrófico) compostos carbonados provenientes da fotossíntese, assim como um habitat protegido (Harrison, 1999).

005 Dos benefícios que as MA produzem nas plantas hospedeiras, podem se destacar: ajudam na nutrição, crescimento e desenvolvimento; melhoram a sua tolerância frente ao estresse causado por deficiência hídrica e aos agentes patogênicos e facilitam sua adaptação em solos com baixa disponibilidade de nutrientes (Sylvia et al., 1999). Estes benefícios são a base fundamental que permite às plantas uma melhor adaptação ao meio, maior competitividade e uma maior produtividade.

006 O benefício das MA no crescimento vegetal está relacionado com a facilidade de maior absorção de nutrientes minerais do solo principalmente o fósforo. Os FMA podem ajudar as plantas a incrementar a captação de nutrientes de forma direta ou indireta. De forma direta, as micorrizas aumentam a absorção de nutrientes e água do solo devido ao seu micélio externo que explora um maior volume de solo além das raízes. O fungo estende o campo de absorção da raiz além da zona de influência radicular e permite incrementar a sua superfície de captação (Barea et al,

2005). Além disso, a absorção mais eficiente das raízes micorrizadas é devida também a uma aceleração da dissociação de fosfatos insolúveis no solo, assim como outros elementos de baixa mobilidade. Os benefícios dos fungos micorrízicos na captação de fósforo (P) são de essencial importância, pois este é um elemento limitante por sua baixa disponibilidade na forma solúvel no solo, especialmente em solos tropicais.

007 Apesar do grande número de estudos sobre o efeito benéfico dos FMA no desenvolvimento vegetal, seu uso ao nível comercial e sua aplicação à agricultura em grande escala são bastante limitados devido a sua natureza biotrófica obrigatória. No Brasil a produção de inoculantes micorrízicos é limitada a uma pequena escala em universidades e centros de pesquisa aonde normalmente se utiliza a multiplicação de MA em vasos com variados tipos de plantas hospedeiras, dentro das quais as gramíneas são as mais usadas, estas são plantadas em substratos ou misturas de substratos como solo, areia, vermiculita e turfa entre outros (Barreto e Siquiera, 2009).

008 O desenvolvimento mundial da pesquisa na propagação de fungos micorrízicos tem gerado metodologias para o cultivo de MA em meio sintético com raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas como órgãos hospedeiros, possibilitando a obtenção de culturas axênicas com potencial para a produção em grande escala de inoculantes de MA.

009 A cultura axênica de MA tem sido bastante melhorada desde os estudos pioneiros feitos no começo da década dos sessenta por Mosse (1962), seguidos por vários estudos nas décadas dos 70as e 80as como os de Mosse e Hepper (1975); Hepper (1981); Strullu e Romand (1986, 1987) e, Becard e Fortin (1988). Esta

metodologia traz várias vantagens sobre os métodos convencionais de cultivo em vaso, permitindo a produção de inóculos puros, estéreis, com alta quantidade de massa fúngica (hifas e esporos) e livres de propágulos contaminantes (Adholeya et al, 2005).

010 A partir desta técnica têm sido desenvolvidos inoculantes a base de fungos micorrízicos arbusculares, entre estes alguns protegidos por patentes como a WO 2007/014974, um inoculante asséptico de micorriza e suas respectivas aplicações *in vitro* e *ex vitro* e; WO 2013/098829, que descreve o processo de produção biofertilizante a base de micorrizas.

### SUMARIO DA INVENÇÃO

011 Em termos gerais a principal novidade desta invenção é o estabelecimento de um processo de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições axênicas que permite a redução do tempo e o aumento da produção de propágulos, assim como a introdução de um substrato inerte de argila expandida ou vermiculita que funciona como veículo dos propágulos otimizando o processo de inoculação para o cultivo intensivo agrícola, permitindo a substituição total ou parcial do fósforo da adubação pela a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares com comprovada eficiência agronômica.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

012 O inóculo objeto desta invenção contém especialmente propágulos do fungo micorrízico arbuscular do gênero *Glomus spp.*

013 A adaptação deste fungo às condições de multiplicação *in vitro* consiste numa série de etapas propostas na metodologia já existente para o estabelecimento de culturas axênicas de fungos MA utilizando raízes de cenoura transformadas com o plasmídeo Ri T-DNA.

014 O processo de produção do inóculo inclui adaptação do fungo micorrízico ao desenvolvimento num meio bifásico (uma fase solidificada e uma fase líquida) em recipientes de vidro com tampa hermética com capacidade entre 100 e 500 mL. A fase sólida consiste na combinação dos sais e as vitaminas do meio de cultura MRS com a modificação do agente solidificante o fitogel e sua concentração variando entre 0,5% – 1,5%. A fase líquida consiste na combinação dos sais e as vitaminas do meio de cultura MRS com a modificação da proporção da fonte de carbono variando entre 0,01% – 2%. Neste meio de crescimento o fungo alcança um maior desenvolvimento de propágulos (hifas-esporos-raízes colonizadas) em comparação com o método convencional (meio semi-solidificado) em um período de 30 a 90 dias, diminuindo assim o tempo requerido para a obtenção de uma alta quantidade de massa fúngica (Figura 1). A produção do inóculo pode ser feita também partir da utilização unicamente da fase solidificada.

015 A aplicação deste inóculo aos sistemas agrícolas é feita através da inoculação de sementes ou da utilização de substratos inertes com veículos dos propágulos fúngicos e raízes colonizadas.

016 O inóculo para sementes contém um *pool* de propágulos de *R. clarus* composto por esporos, micélio e raízes micorrizadas (colonizadas) provenientes do cultivo asséptico, uma matriz de polissacarídeo de origem microbiano e turfa. Cada 100 g a 1.000 g de *pool* de propágulos são misturados com uma quantidade que varia entre 10-2.500 g de matriz de polissacarídeo e 2-15 g de turfa.

017 A porção de turfa pode incluir um inóculo de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas para o caso de leguminosas ou de vida livre para plantas não leguminosas.

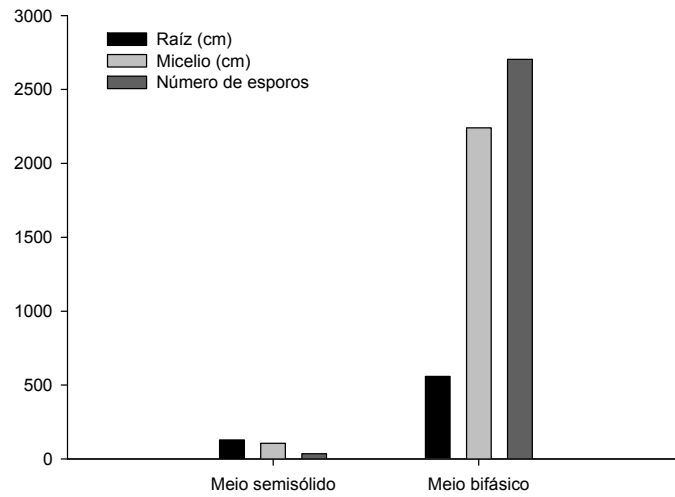
018 O meio de cultura contendo um substrato inerte de argila expandida ou vermiculita que funciona como veículo dos propágulos consiste numa mistura deste substrato previamente esterilizado com o meio de cultura solidificado no qual o fungo se desenvolve, esta mistura tem uma proporção de substrato que varia entre 2% - 80%. Nestas condições as estruturas fúngicas se desenvolvem dentro dos grânulos de argila expandida facilitando sua posterior recuperação, preparação do inóculo e aplicação em campo (Figura 2).

019 Estes inóculos apresentam uma alta aplicabilidade em sistemas agrícolas extensivos de todas as plantas cultiváveis. Como exemplo do seu desempenho em condições de campo pode se observar um aumento na porcentagem da colonização micorrízica em plantas de soja (*Glicine max* L.) provenientes de sementes inoculadas com *R. clarus*.

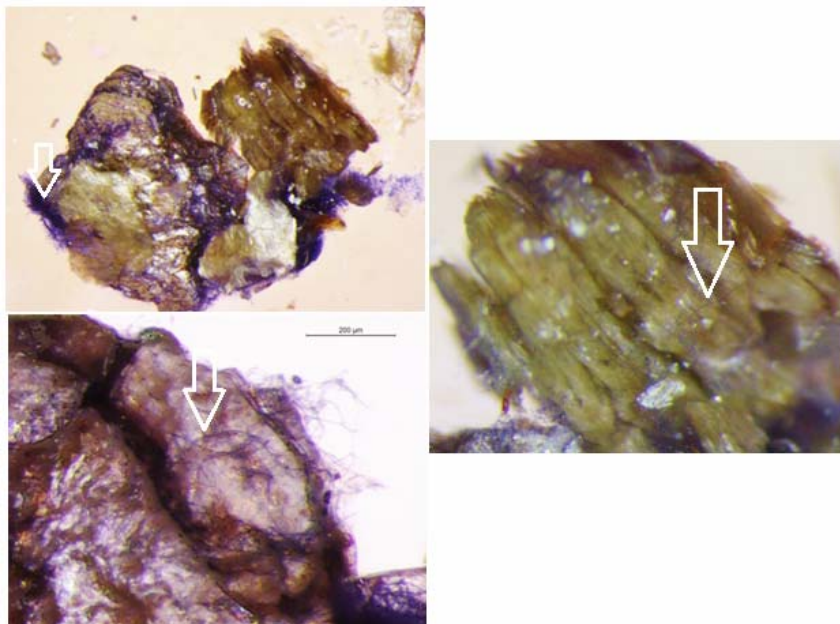
020 A inoculação destas sementes promoveu um incremento entre 20-30% na produção de grãos inclusive chegando a ser mais eficiente do que o manejo com adubação. Isto indica seu alto potencial para a substituição de adubos fosfatados (Figura 3).

## DESENHOS E ESQUEMAS

**Figura 1** - Produção de propágulos da cultura do fungo micorrízico *Glomus clarum*.



**Figura 2** - Desenvolvimento do fungo micorrízico *Glomus clarum* nos grânulos de argila expandida.



**Figura 3** - Eficiência de colonização do inóculo de *Glomus clarum* em condições de campo e seu efeito no aumento da produção de grãos de soja.

