

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## EFEITO DE DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS DA MESMA COMUNIDADE MICORRÍZICA NO CRESCIMENTO E ABSORÇÃO DE FÓSFORO EM SOJA E TREVO VERMELHO<sup>(1)</sup>

S. L. STÜRMER<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Experimentos que testam a eficiência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) provenientes de uma mesma amostra de solo complementam os estudos de diversidade taxonômica por promover relações funcionais dentro das comunidades micorrízicas. Neste estudo, isolados fúngicos de três comunidades distintas foram avaliados quanto a sua eficiência em aumentar a produção de biomassa e teor de P em dois hospedeiros micotróficos. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito de 13 isolados de FMA pertencentes às comunidades JA205, MN414 e VA105, para testar a hipótese de que pelo menos um isolado de cada comunidade micorrízica seria eficiente para a soja. Todos os três isolados da comunidade JA205 e *Glomus clarum* da comunidade VA105 aumentaram a produção de biomassa seca em relação às plantas não micorrizadas. Os isolados da comunidade MN414 não influenciaram na produção de biomassa seca. A concentração de P, no entanto, foi significativamente aumentada por 7 dos 13 isolados em relação às plantas-controle. No segundo experimento, avaliou-se o efeito da inoculação separada e da co-inoculação de isolados das comunidades VA105 e MN414 em trevo. A colonização pelos cinco isolados de ambas as comunidades aumentou significativamente a produção de biomassa seca e conteúdo de P no trevo, com exceção de *Scutellospora calospora* MN414C que teve efeito apenas no conteúdo de P. A co-inoculação de isolados nem sempre produziu maior benefício do que a inoculação com isolados em separado. Plantas colonizadas com *S. verrucosa* VA105B + *Glomus clarum* VA105D produziram quantidade significativamente maior de biomassa do que plantas inoculadas com *S. verrucosa* apenas, mas não diferiram daquelas inoculadas com *G. clarum*. No outro extremo, a produção de biomassa seca e conteúdo de P não foram significativamente diferentes em plantas inoculadas com *Glomus* sp. MN414B +

<sup>(1)</sup> Parte integrante da Tese de Doutorado do autor, apresentada ao Programa de Ph.D. em Genetics and Developmental Biology na West Virginia University, USA. Apoio financeiro - CNPq. Recebido para publicação em setembro de 2003 e aprovado em junho de 2004.

<sup>(2)</sup> Professor do Departamento de Ciências Naturais - DCN, Universidade Regional de Blumenau - FURB. Caixa Postal 1507. CEP 89010-971 Blumenau (SC). E-mail: sturmer@furb.br

***Gigaspora gigantea* MN414D** daquelas inoculadas com cada isolado separadamente. O teste da eficiência relativa de isolados fúngicos originados de uma mesma comunidade representa um primeiro passo para a adoção das estratégias de manejo de fungos nativos versus inoculação com isolados exóticos, visando aumentar a produtividade em ecossistemas naturais ou agrícolas.

**Termos de indexação:** fungos micorrízicos arbusculares, co-inoculação, soja, trevo, eficiência, comunidade micorrízica, esporos, colonização radicular.

**SUMMARY:** *EFFECT OF DIFFERENT FUNGAL ISOLATES FROM THE SAME MYCORRHIZAL COMMUNITY ON PLANT GROWTH AND PHOSPHORUS UPTAKE IN SOYBEAN AND RED CLOVER*

*Experiments testing the efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) originating from the same soil sample complement studies of taxonomic diversity by assessing functional relationships within mycorrhizal communities. In this study fungal isolates from three distinct communities were evaluated regarding their efficiency to increase dry biomass production and P content in two mycotrophic hosts. In the first experiment, the effect of 13 AMF isolates from the JA205, MN414, and VA105 communities were screened in order to test the hypothesis that at least one isolate of each mycorrhizal community was efficient for soybean. All three isolates from the JA205 community and *Glomus clarum* from the VA105 community increased the biomass production compared to non-mycorrhized plants. No isolate from the community MN414 had a significant effect compared to control plants. Phosphorus content, however, was significantly increased by 7 out of 13 isolates compared to control plants. In the second experiment, it was evaluated the effect of single inoculation or co-inoculation using isolates from communities VA105 and MN414 in red clover. Colonization by 5 isolates from both communities significantly increased dry biomass production and P content in red clover, with exception of *Scutellospora calospora* MN414C that had an effect only on P content. Co-inoculation of isolates did not necessarily confer a higher benefit to plants than inoculation with a single isolate. Plants colonized by *S. verrucosa* VA105B + *Glomus clarum* VA105D produced significantly larger quantities of biomass than plants inoculated with only *S. verrucosa*, but dry biomass production and P content did not differ from those inoculated with *G. clarum*. Conversely, dry biomass production and P content of plants inoculated with *Glomus* sp. MN414B + *Gigaspora gigantea* MN414D were not significantly different from those inoculated with each isolate separately. Testing the relative efficiency of fungal isolates originating from the same community represents a first step to adopt strategies of management of native fungi versus inoculation with exotic fungi aiming to increase productivity in natural or agricultural ecosystems.*

*Index terms:* arbuscular mycorrhizal fungi, co-inoculation, mycorrhizal community, spores, root colonization, soybean, clover, efficiency.

## INTRODUÇÃO

Dentre os benefícios que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs<sup>2</sup>) propiciam às plantas nativas e cultivadas, destaca-se o aumento no crescimento da parte aérea e do potencial reprodutivo (Smith & Read, 1997). Esses benefícios são atribuídos primariamente ao aumento na absorção e transporte de fósforo pelas hifas fúngicas além da zona de depleção radicular no solo. A planta hospedeira, por outro lado, fornece a única fonte de carbono para o crescimento do fungo e sua reprodução (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). A habilidade relativa dos isolados de FMAs para aumentarem o crescimento

vegetal e, ou, reprodução num solo deficiente em fósforo é conhecida como eficiência simbiótica (Abbott & Robson, 1981). Diferenças na eficiência entre isolados de FMAs são causadas por uma multitude de variáveis, tais como: a taxa de colonização radicular (Abbott & Robson, 1981), abundância das hifas externas no solo e distribuição do micélio (Graham et al., 1982) e atividade e longevidade das hifas (Sylvia, 1988). Propriedades do solo, tais como pH (Skipper & Smith, 1979), temperatura (Schenck & Smith, 1982) e níveis de fósforo (Schubert & Hayman, 1986) também impactam na eficiência.

Em muitos estudos, a eficiência tem sido interpretada como uma propriedade da espécie

fúngica, porém grandes diferenças entre isolados da mesma espécie têm sido identificadas e medidas. Por exemplo, sete isolados de *Glomus macrocarpum* diferiram significativamente na habilidade de aumentar o crescimento em pimentão (Hass & Krikun, 1985). Similarmente, diferentes isolados geográficos de *Glomus mosseae* variaram em aumentar as relações hídricas de *Agropyron smithii* (Stahl & Smith, 1984). Dois isolados de *Glomus mosseae*, originados de um ambiente méxico e árido, aumentaram a produção da matéria seca da parte aérea de soja, mas esse benefício não foi observado para um isolado de ambiente semi-árido (Bethlenfalvay et al., 1989). Em cafeeiro, Saggin Júnior & Siqueira (1995) observaram que a eficiência simbiótica diferiu para isolados de *Glomus etunicatum*, sendo encontrados isolados dessa espécie com alta e baixa eficiência.

Na maioria dos estudos, a eficiência tem sido medida apenas para isolados propagados em cultura pura. Os fungos, porém, formam comunidades complexas dentro do sistema radicular das plantas no campo (Brundrett, 1991). Desta forma, experimentos que envolvam mais do que um isolado fúngico em um único hospedeiro refletirão, provavelmente, melhor os processos que ocorrem naturalmente. Competição interespecífica tem sido medida como uma função de esporulação diferenciada por parte desses fungos (Daft, 1983; Daft & Hogarth, 1983) e pela formação de pontos de entrada em raízes sendo colonizadas (Wilson, 1984). Apesar dessas interações, uma mistura de isolados fúngicos tem demonstrado prover um benefício no crescimento maior do que isolados fúngicos colonizando as raízes sozinhos (Daft, 1983).

Nos estudos relativos à eficiência simbiótica dos FMAs, os isolados fúngicos comparados frequentemente são originados de diferentes condições ambientais (e.g., tipo de solo, hospedeiro, localidade) e não pertencem a mesma comunidade fúngica. Os resultados, desta forma, não provêm de informações sobre a proporção relativa de fungos eficientes e não-eficientes dentro de uma mesma comunidade micorrízica. Dissecar uma comunidade fúngica micorrízica e testar a eficiência relativa de cada membro da comunidade tem importantes implicações. Primeiro, o benefício líquido das comunidades fúngicas nos seus hospedeiros determina a estabilidade da simbiose no tempo. Morton (2000) conjecturou que a comunidade fúngica precisa ter um efeito líquido positivo nas plantas (a maior unidade de seleção) para a simbiose ser mantida em 80 % de todas as linhagens de plantas durante 400 milhões de anos. Um efeito líquido negativo para algumas linhagens vegetais pode explicar o porquê de a simbiose ter sido perdida esporadicamente em tempos mais recentes por algumas plantas (Trappe, 1987). Segundo, a manipulação dos fungos, para otimizar os benefícios em ecossistemas naturais ou agrícolas, envolve o

manejo das comunidades nativas ou introdução de um inoculante fúngico. Cada estratégia depende de um completo conhecimento da eficiência de genótipos fúngicos nativos ou introduzidos.

Para fungos que serão provavelmente utilizados como inóculo (como isolados ou como uma comunidade fúngica), uma questão de importância maior é se a eficiência obtida para determinado hospedeiro padrão permanecerá a mesma para outros hospedeiros e em diferentes ambientes no qual o inóculo será aplicado. Apenas um estudo envolvendo os mesmos isolados fúngicos, testados em diferentes solos e em sete casas de vegetação separadas, tem abordado o assunto (Sylvia et al., 1993). Os resultados mostraram que apenas isolados com extremos em eficiência (aqueles com eficiência alta ou aqueles com eficiência baixa) não variaram significativamente com as mudanças de hospedeiro e condições de casa de vegetação, exceto aqueles que apresentaram eficiência intermediária.

Neste estudo, isolados fúngicos de três comunidades diferentes foram estabelecidos em cultura e então usados como inóculo para acessar a diversidade fisiológica expressa pela eficiência relativa num hospedeiro padrão. As seguintes hipóteses específicas foram testadas: (a) pelo menos um isolado de cada comunidade efetivamente aumentará o crescimento vegetal; (b) fungos com eficiência alta ou baixa expressarão respostas similares, independentemente do hospedeiro; (c) isolados não-eficientes não apresentarão um efeito detrimental para o crescimento vegetal, quando um isolado eficiente estiver também presente na micorriza, e (d) uma mistura de isolados de FMA da mesma comunidade aumentará o crescimento vegetal e nutrição de fósforo mais do que cada isolado colonizando as raízes sozinho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados fúngicos

Os dois experimentos de eficiência foram realizados em casa de vegetação e câmara de crescimento na Division of Plant and Soil Sciences da West Virginia University, estado de West Virginia, nos Estados Unidos. Os isolados fúngicos usados neste estudo foram obtidos da International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, West Virginia University, EUA). Treze isolados foram estabelecidos de três comunidades micorrízicas distintas, designadas como VA105, JA205 e MN414 (Quadro 1). A comunidade VA105 foi originada das rizosferas de *Ammophila sp.* e *Solidago sp.* ocorrendo em dunas de Assateague Island, Virginia, EUA (solo com pH 6,2-6,8 e com < 10 mg dm<sup>-3</sup> de P). A comunidade JA205 foi isolada da rizosfera de

*Triticum aestivum* de uma estação experimental em Hokkaido, Japão (solo com pH 6,1 e 24 mg dm<sup>-3</sup> de P). Os fungos da comunidade MN414 foram isolados da rizosfera de *Andropogon* sp. crescendo num campo abandonado de 60 anos em Cedar Creek, Minnesota, EUA (solo com pH 5,1 e < 15 mg dm<sup>-3</sup> de P). Culturas puras foram estabelecidas usando esporos provenientes de culturas armadilhas estabelecidas com solo nativo de cada um dos três sítios de acordo com os métodos de Morton et al. (1995). A quantidade de inóculo de cada isolado foi aumentada, utilizando *Sorghum sudanense* semeado em potes plásticos de 1,2 kg e cultivados por 3-4 meses com o substrato de crescimento descrito abaixo. Potes que continham apenas substrato esterilizado foram também semeados com *S. sudanense* para produzir inóculo não micorrizado a ser utilizado no tratamento-controle nos experimentos de eficiência.

O substrato de crescimento utilizado na produção de inóculo e nos experimentos de eficiência foi um solo de textura franco-arenosa misturado (1:2, v/v) com areia quartzita (tamanho médio do grão = 0,9 mm), esterilizado por autoclavagem por duas vezes, a 120 °C, por uma hora, com um intervalo de 24 h entre os ciclos. Carbonato de cálcio foi adicionado ao solo para obter um pH final de 6,2, assim como 21 e 40 mg dm<sup>-3</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

### Ensaio de infectividade

O potencial de inóculo de cada isolado foi medido pelo método de percentagem de infecção média de

Moorman & Reeves (1979) e então ajustado por diluição com solo para equalizar a infectividade de cada isolado no início de cada experimento de eficiência. Para a realização do experimento 1 com soja, o inóculo de cada isolado foi diluído 1:1 com o substrato de crescimento estéril, sendo a mistura colocada em cone-tainers<sup>TM</sup> (Stuewe and Sons, Inc., Corvallis, Oregon) de 100 cm<sup>3</sup>. Três sementes de sorgo (*Sorghum vulgare* L.) foram colocadas em cada cone e apenas uma planta foi deixada após emergência das plântulas. Após três semanas, as raízes das plantas foram separadas do substrato pela imersão do conteúdo do cone em água. As raízes foram coradas de acordo com o método de Koske & Gemma (1989), e o potencial de inóculo determinado pela colonização radicular obtida de acordo com o método da intersecção das linhas de Giovannetti & Mosse (1980).

O inóculo de cada isolado, a ser usado no experimento 2 com trevo, foi diluído 1:5 (v/v) com substrato estéril, colocado em cone-tainers de 100 cm<sup>3</sup> e semeado com trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.). Três plântulas foram deixadas em cada cone e regadas com uma solução que continha o inóculo comercial de *Rhizobium trifolii*. As plantas cresceram por três semanas e as raízes foram processadas e avaliadas para colonização micorrízica, como descrito acima.

### Experimento 1 - Eficiência de isolados em soja

Um experimento de eficiência foi realizado, utilizando-se soja (*Glycine max* L.), variedade Ark Centennial, como espécie hospedeira, o substrato de

**Quadro 1. Espécies fúngicas recuperadas de culturas armadilhas estabelecidas do solo rizosférico de três comunidades de plantas**

Comunidade Espécie de FMA	Código do isolado no INVAM
Comunidade VA105	
<i>Scutellospora fulgida</i> Koske & Walker	VA105A
<i>Scutellospora verrucosa</i> Koske & Walker	VA105B
<i>Gigaspora gigantea</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	VA105C
<i>Glomus clarum</i> Nicolson & Schenck	VA105D
<i>Entrophospora</i> sp.	VA105E
Comunidade JA205	
<i>Archaeospora trappei</i> (Ames & Linderman) Morton & Redcker	JA205B
<i>Glomus mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	JA205C
<i>Glomus</i> sp.	JA205E
Comunidade MN414	
<i>Acaulospora mellea</i> Schenck, Spain, Sieverding & Howeler	MN414A
<i>Glomus</i> sp.	MN414B
<i>Scutellospora calospora</i> Koske & Walker	MN414C
<i>Gigaspora gigantea</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	MN414D
<i>Glomus</i> sp.	MN414E

crescimento, descrito anteriormente, e 12 isolados de FMAs provenientes das três comunidades. O inóculo de cada um dos 13 isolados foi diluído 1:5 (v/v) com o substrato estéril e colocado em 'Deepots' (Stuewe and Sons, Inc., Corvallis, Oregon) de 750 cm<sup>3</sup>. Uma "comunidade artificial" (CA) foi incluída como um controle positivo e foi estabelecida por misturar 150 mL de cada um dos seguintes isolados fúngicos: *Acaulospora mellea* CL358, *Glomus mosseae* FL156, *Glomus clarum* FL979A e *Gigaspora gigantea* NC119A.

Após emergência, as plântulas foram regadas com uma solução comercial de *Bradyrhizobium* para soja (Lipha Tec., Inc., Milwaukee, Wisconsin) e mantidas em casa de vegetação com luz suplementar (130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e temperatura ambiente variando de 15 °C (noite) a 35 °C (dia). Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado com 14 tratamentos e cinco repetições. Após sete semanas, as plantas foram colhidas e 0,5 g do sistema radicular foi amostrada aleatoriamente para medir a colonização radicular e o restante colocado para secar a 65 °C juntamente com a parte aérea. As amostras de raiz foram coloridas de acordo com o método de Koske & Gemma (1989), enquanto a colonização micorrízica foi medida pelo método de Giovannetti & Mosse (1980). O comprimento de raiz micorrizada foi calculado para cada repetição baseado na massa total de raiz seca.

O conteúdo de fósforo foi medido usando o método de digestão em câmara selada (Anderson & Henderson, 1986) com algumas modificações. Aproximadamente 0,25 g da parte aérea seca foi colocada em vasos de teflon com paredes reforçadas, 3 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado e a mistura incubada em temperatura ambiente por 15 min. Os vasos de teflon foram colocados em microondas e programados para digestão completa dos tecidos. Água deionizada foi adicionada à digestão final para alcançar 25 mL e a solução filtrada usando-se papel filtro Whatman #42. O fósforo foi então analisado por meio de espectroscopia de plasma.

#### Experimento 2 - Eficiência de isolados em trevo

O experimento de eficiência de isolados, inoculados sozinhos ou em combinação, utilizou trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) como planta hospedeira. Os isolados foram selecionados baseados na absorção de fósforo em soja (experimento 1). Os tratamentos foram: inoculação com *S. verrucosa* VA105B e *G. clarum* VA105D, sozinhos ou juntos (VA105B + D); inoculação com *Glomus sp.* MN414B, *S. calospora* MN414C e *Gigaspora gigantea* MN414D, sozinhos ou em todas as possíveis combinações (MN414B + C, MN414B+D e MN414C + D). Dois tratamentos adicionais, designados 'comunidade VA105' e 'comunidade MN414', foram incluídos por combinar todos os isolados de cada comunidade. O experimento seguiu o delineamento

inteiramente casualizado com 12 tratamentos e cinco repetições.

O inóculo de cada isolado foi diluído 1:5 (v/v) com o substrato de crescimento esterilizado e colocado em Deepots de 750 cm<sup>3</sup>. Após a emergência, três plantas foram deixadas em cada pote e regadas com uma suspensão de *Rhizobium trifolii*. As plantas foram cultivadas em uma câmara de crescimento com intensidade luminosa de 245  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ao nível do pote, fotoperíodo de 14 h e temperatura ambiente variando de 21 a 28 °C.

Após oito semanas, a parte aérea e as raízes foram processadas, como descrito acima para soja, exceto que 0,25 g de raízes foi usada para medir a colonização micorrízica. O conteúdo de fósforo da parte aérea foi analisado pelo método de Kjeldahl usando ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para a digestão dos tecidos vegetais num bloco digestor (Lowther, 1980). Após a digestão, o fósforo foi medido por meio da análise colorimétrica por injeção de fluxo num Lachat Quickchem 8000L.

#### Análises estatísticas

Os dados de produção de matéria seca e conteúdo de fósforo foram testados quanto à homogeneidade da variância pelo teste de Levene antes da ANOVA. A porcentagem de fósforo na parte aérea foi transformada (arco-seno da raiz quadrada) antes da análise. Quando a homogeneidade da variância não foi obtida, mesmo após as transformações, os dados foram ordenados e submetidos à análise dos ranks. Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa JMP® (SAS, 1995).

## RESULTADOS

### Experimento 1

A colonização micorrízica foi observada em todas as raízes de soja em todos os tratamentos, com exceção do controle e dos tratamentos com *Scutellospora fulgida* VA105A e *Gigaspora gigantea* VA105C (Quadro 2). Esses isolados perderam a infectividade durante o experimento e, desta forma, foram removidos das análises estatísticas. O comprimento de raiz micorrizada foi maior nas plantas inoculadas com *Glomus clarum* VA105D e *Entrophospora sp.* VA105E, com 2663 e 1164 cm de raiz colonizada, respectivamente.

Todos os três isolados da comunidade JA205 aumentaram significativamente a produção de matéria seca da parte aérea da soja em relação à das plantas-controle (Figura 1). A matéria seca da parte aérea das plantas colonizadas pelos isolados da comunidade MN414 não diferiu estatisticamente do controle não micorrizado. Apenas *Glomus clarum* VA105D, originado da comunidade VA105,

**Quadro 2. Comprimento de raiz micorrizada em plantas de soja com sete semanas de idade. Os números representam média  $\pm$  desvio-padrão**

Comunidade	Tratamento		Comprimento de raiz micorrizada (cm)
	Isolado		
JA205	<i>Archaeospora trappei</i> JA205B		99,7 $\pm$ 33,2
	<i>Glomus mosseae</i> JA205C		378,6 $\pm$ 49,8
	<i>Glomus</i> sp. JA205E		356,9 $\pm$ 40,8
MN414	<i>Acaulospora mellea</i> MN414A		214,5 $\pm$ 55,2
	<i>Glomus</i> sp. MN414B		591,6 $\pm$ 58,8
	<i>Scutellospora calospora</i> MN414C		71,1 $\pm$ 10,0
	<i>Gigaspora gigantea</i> MN414D		786,9 $\pm$ 86,7
	<i>Glomus</i> sp. MN414E		304,0 $\pm$ 83,6
VA105	<i>Scutellospora verrucosa</i> VA105B		26,6 $\pm$ 12,1
	<i>Glomus clarum</i> VA105D		2663,0 $\pm$ 103,3
	<i>Entrophospora</i> sp. VA105E		1164,2 $\pm$ 166,6
Comunidade Artificial (CA)	<i>A. mellea</i> CL358, <i>G. mosseae</i> FL156 <i>Gigaspora gigantea</i> NC119A, <i>Glomus clarum</i> FL979		568,8 $\pm$ 42,8

aumentou significativamente a massa de matéria seca da parte aérea relativa ao controle não micorrizado (Figura 1).

A colonização micorrízica teve um impacto maior na absorção de fósforo do que na produção de matéria seca da parte aérea em soja (Figura 2). Todos os isolados da comunidade JA205, com exceção de *Archaeospora trappei* JA205B, aumentaram o conteúdo de P na parte aérea (Figura 2). Plantas associadas com os isolados *Acaulospora mellea* MN414A, *Glomus* sp. MN414B, *Glomus clarum* VA105D e *Entrophospora* sp. VA105E absorveram 2-3 vezes mais fósforo que as plantas não micorrizadas (Figura 2).

Em cada comunidade fúngica, pelo menos dois isolados aumentaram a produção de matéria seca da parte aérea e o conteúdo foliar de fósforo das plantas de soja relativamente às plantas-controle não micorrizadas. A colonização pela 'comunidade artificial' aumentou significativamente tanto a produção de matéria seca como o conteúdo de P na soja (Figuras 1 e 2).

## Experimento 2

As plantas do tratamento-controle não apresentaram colonização micorrízica e o maior nível de colonização foi observado em plantas inoculadas com a comunidade VA105, *Glomus clarum* VA105D e *Gigaspora gigantea* MN414D (Quadro 3). Para a maioria dos isolados fúngicos, o comprimento de raiz colonizada variou de 36 a 80 cm.

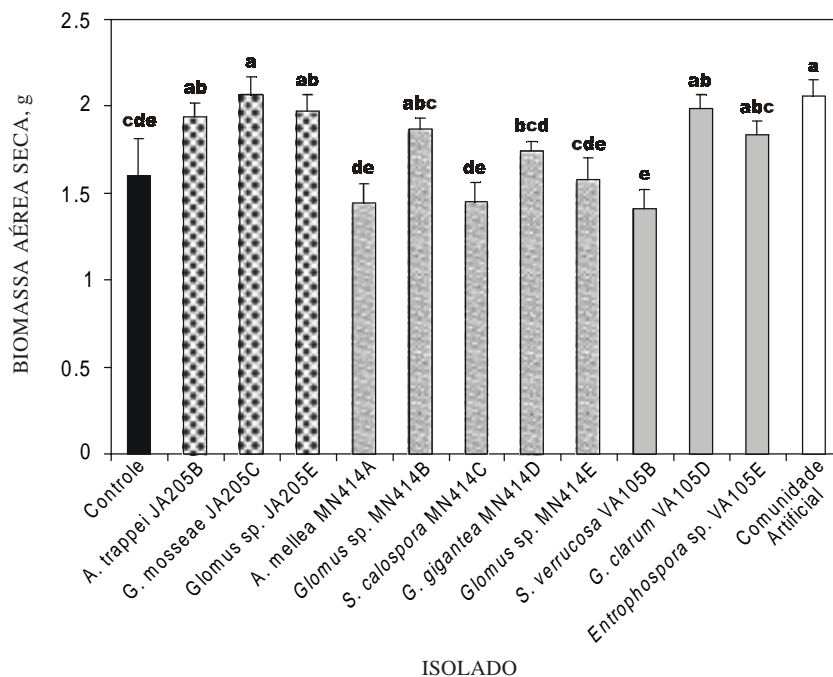
Na comunidade VA105, as plantas de trevo vermelho colonizadas por *Scutellospora verrucosa* e *Glomus clarum* produziram significativamente mais matéria seca da parte aérea e apresentaram maior

percentagem de P foliar do que as plantas-controle (Figuras 3 e 4). *Glomus* sp. e *Gigaspora gigantea* da comunidade MN414C também aumentaram a produção de matéria seca vegetal e propiciaram maior conteúdo de P na parte aérea do que as plantas-controle. A colonização radicular do trevo por *S. calospora* MN414C aumentou significativamente a absorção de P, mas não aumentou a produção de matéria seca da parte aérea da planta.

Co-inoculação de dois isolados nem sempre produziu um maior benefício do que isolados inoculados sozinhos. A matéria seca da parte aérea das plantas colonizadas com *S. verrucosa* VA105B + *Glomus clarum* VA105D foi significativamente diferente das plantas inoculadas com *S. verrucosa* sozinha, mas não das plantas associadas com *G. clarum* (Figura 3). As plantas colonizadas com isolados *S. verrucosa* VA105B + *Glomus clarum* VA105D, contudo, tiveram um conteúdo de fósforo significativamente maior na parte aérea relativamente a plantas colonizadas por cada um desses isolados sozinhos (Figura 4). As plantas associadas com *Glomus* sp. MN414B + *S. calospora* MN414C produziram mais biomassa e tiveram um conteúdo de fósforo maior do que plantas associadas com *S. calospora* sozinha, mas elas não foram diferentes das plantas inoculadas com *Glomus* sp. em separado (Figuras 3 e 4). A matéria seca da parte aérea e o conteúdo de P das plantas colonizadas por *Glomus* sp. MN414B + *Gigaspora gigantea* MN414D não diferiu estatisticamente dos valores das plantas colonizadas por cada um desses isolados em separado. As plantas colonizadas com *S. calospora* MN414C + *G. gigantea* MN414D não foram diferentes das plantas inoculadas com *S. calospora* sozinha, mas produziram significativamente menos

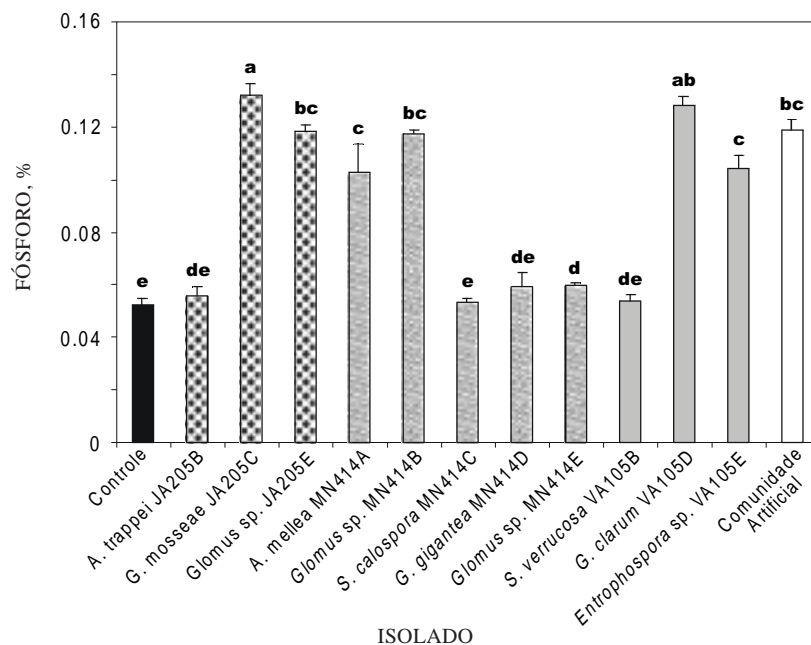
**Quadro 3. Comprimento de raiz micorrizada em plantas de trevo vermelho com oito semanas de idade. Os números representam média  $\pm$  desvio-padrão**

Comunidade	Tratamento Isolado	Comprimento de raiz micorrizada (cm)
VA105	<i>Scutellospora verrucosa</i> VA105B	79,5 $\pm$ 22,1
	<i>Glomus clarum</i> VA105D	250,2 $\pm$ 34,7
	<i>S. verrucosa</i> VA105B + <i>G. clarum</i> VA105D	154,7 $\pm$ 25,2
	Comunidade VA105 ( <i>S. fulgida</i> VA105A, <i>S. verrucosa</i> VA105B, <i>Gigaspora gigantea</i> VA105C, <i>G. clarum</i> VA105D e <i>Entrophospora</i> sp. VA105E)	425,5 $\pm$ 187,8
MN414	<i>Glomus</i> sp. MN414B	50,8 $\pm$ 6,7
	<i>Scutellospora calospora</i> MN414C	60,3 $\pm$ 1,5
	<i>Gigaspora gigantea</i> MN414D	232,7 $\pm$ 43,8
	<i>Glomus</i> sp. MN414B + <i>S. calospora</i> MN414C	36,0 $\pm$ 4,2
	<i>Glomus</i> sp. MN414B + <i>G. gigantea</i> MN414D	57,2 $\pm$ 5,4
	<i>S. calospora</i> MN414C + <i>G. gigantea</i> MN414D	66,9 $\pm$ 27,2
	Comunidade MN414 ( <i>A. mellea</i> MN414A, <i>Glomus</i> sp. MN414B, <i>S. calospora</i> MN414C, <i>Gigaspora gigantea</i> MN414D e <i>Glomus</i> sp. MN414E)	68,8 $\pm$ 14,4

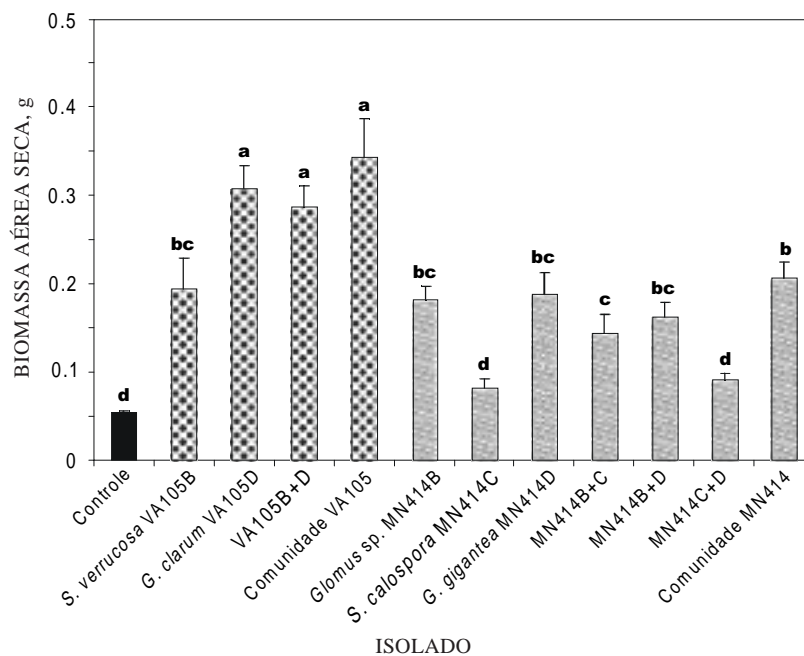
**Figura 1. Biomassa aérea seca de plantas de soja inoculadas com isolados de FMAs originados de três comunidades distintas. Colunas representam a média de cinco repetições e barras representam o erro-padrão.**

matéria seca da parte aérea do que plantas associadas com *G. gigantea* sozinha (Figura 3). Por outro lado, o conteúdo de fósforo das plantas associadas com os isolados *S. calospora* MN414C + *G. gigantea* MN414D não se mostrou diferente do das associadas apenas com *G. gigantea* MN414D, mas foram maiores que os daquelas inoculadas com *S. calospora* MN414C (Figura 4).

A colonização com fungos da comunidade VA105 aumentou a produção de matéria seca em trevo relativo à colonização com *S. verrucosa* VA105B sozinha, mas não em relação com *G. clarum* VA105D (Figura 3). O conteúdo de fósforo foliar foi significativamente maior em plantas associadas com a comunidade VA105 do que naquelas associadas com os isolados *S. verrucosa* VA105B ou *Glomus*



**Figura 2.** Conteúdo de fósforo na parte aérea de plantas de soja inoculadas com isolados de FMA originados de três comunidades distintas. Colunas representam a média de cinco repetições e barras representam o erro-padrão.



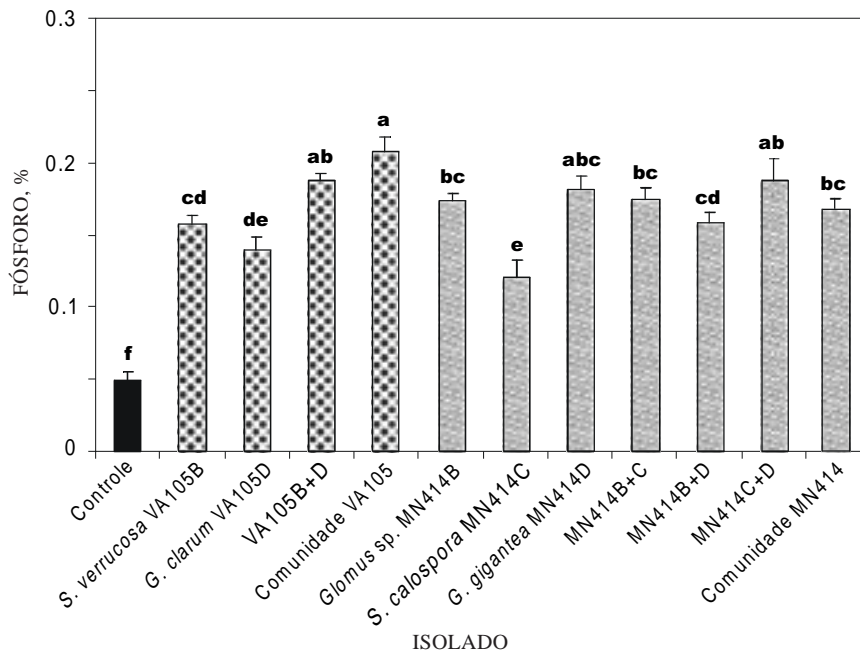
**Figura 3.** Biomassa aérea seca de plantas de trevo vermelho inoculadas com FMAs isolados ou em combinação. Colunas representam a média de cinco repetições e barras representam o erro-padrão.

*clarum* VA105D inoculados separados. As plantas associadas com a comunidade MN414 não diferiram em produção de matéria seca ou conteúdo de P das plantas colonizadas por *Glomus* sp. MN414B ou *G. gigantea* MN414D sozinhas; além disso, elas tiveram uma maior produção de matéria seca e conteúdo de P do que *S. calospora* MN414C sozinha (Figuras 3 e 4).

## DISCUSSÃO

O experimento de eficiência em soja testou a hipótese de que pelo menos um isolado em cada comunidade de fungos micorrízicos efetivamente promove a produção de matéria seca da parte aérea. A biomassa das plantas e absorção de fósforo são





**Figura 4.** Conteúdo de fósforo na parte aérea de plantas trevo vermelho inoculadas com FMA isolados ou em combinações. Colunas representam a média de cinco repetições e barras representam o erro-padrão.

medidas comuns avaliadas quando a eficiência micorrízica está sendo testada (Abbott & Robson, 1984). Usando a produção de matéria seca como um critério, todos os isolados da comunidade JA205 e o isolado *Glomus clarum* da VA105D da comunidade VA105 foram eficientes em relação aos controles. Nenhum dos fungos na comunidade MN414 apresentou evidência de eficiência. Por outro lado, o conteúdo de P foliar aumentou com a colonização micorrízica de pelo menos dois isolados de cada uma das três comunidades fúngicas. Esses resultados mostram que o benefício líquido da simbiose micorrízica, na qual todos os fungos de cada comunidade estão presumidamente colonizando as raízes, será positivo em pelo menos um ou ambos desses parâmetros.

As plantas inoculadas com diferentes fungos apresentam respostas diferenciadas em relação às duas variáveis medidas neste estudo. Por exemplo, três FMAs co-ocorrendo na mesma comunidade influenciaram diferencialmente o tamanho e as características de crescimento clonal de duas espécies de *Prunella*: *Glomus geosporum* e um *Glomus* sp. produziram uma resposta similar em relação à área foliar total, porém o número de ramificações do estolão de *Prunella* foi maior em plantas colonizadas por *G. geosporum* do que com *Glomus* sp. (Streitwolf-Engel et al., 1997). Neste trabalho, de maneira similar, no experimento com soja, o isolado *Archaeospora trappei* JA205B promoveu o crescimento da planta, mas não o aumento do conteúdo de P foliar, enquanto *Acaulospora mellea* MN414A promoveu absorção de

P, mas não teve nenhum efeito mensurável na produção de matéria seca da parte aérea.

Uma das razões para as interações diferenciais entre hospedeiro-fungo provavelmente seja a compatibilidade entre os genótipos da planta e do fungo. A soja é tipicamente cultivada em solos com níveis elevados de P ou com aplicações de fertilizantes com alto teor de P. A comunidade fúngica JA205 foi diferente das demais porque todos os seus membros efetivamente aumentaram o crescimento da soja e, ou, absorção de P. Essa comunidade se originou de uma estação experimental onde os níveis de fósforo no solo ( $24 \text{ mg dm}^{-3}$ ) foram relativamente maiores do que os solos das outras duas comunidades ( $< 15 \text{ mg dm}^{-3}$ ); desta forma, esses isolados podem estar mais adaptados às condições favoráveis para crescimento e reprodução da soja. Se essa premissa for verdadeira, os resultados obtidos neste estudo contradizem a hipótese de Johnson (1993) que a fertilização seleciona, com o tempo, fungos mutualistas menos benéficos. Contudo, o experimento de eficiência em soja neste estudo mediu os benefícios diretamente, enquanto Johnson (1993) baseou os resultados na presença e abundância da esporulação como uma medida da colonização e do benefício potencial.

Os resultados de biomassa e o conteúdo de P em ambos os hospedeiros testados corroboram a hipótese de que cada um dos extremos de eficiência apresentado por um isolado fúngico (eficiência alta ou baixa) é conservado quando se mudam as condições ambientais de hospedeiro e solo. Por exemplo, *Glomus clarum* VA105D foi altamente

eficiente em promover o crescimento da parte aérea e absorção de P em soja e trevo, enquanto *S. calospora* MN414C apresentou uma eficiência baixa para o crescimento da parte aérea medido em ambas as espécies hospedeiras. O amplo estudo de Sylvia et al. (1993) enfatiza esse aspecto conservador dos dois extremos: eficiência alta ou baixa. Respostas intermediárias foram mais variáveis e não puderam ser preditas por nenhum experimento. Desta forma, é a magnitude da eficiência - se um isolado apresenta uma eficiência alta, baixa ou intermediária - que pode explicar por que um isolado fúngico difere entre espécies hospedeiras (Streitwolf-Engle et al., 1997) ou em diferentes solos (Anderson et al., 1994).

A hipótese de que isolados fúngicos com baixa eficiência não inibiriam o crescimento vegetal, quando co-inoculados com um isolado eficiente, é corroborada pelo experimento com trevo vermelho, onde isolados selecionados, provindos de diferentes comunidades, foram testados sozinhos ou juntos. Um efeito aditivo no conteúdo foliar de P foi evidente, quando *S. verrucosa* VA105B e *Glomus clarum* VA105D formaram micorrizas conjuntamente. Uma tendência contrária foi observada com os isolados fúngicos da comunidade MN414, onde o eficiente *Glomus* sp. MN414B, juntamente com o isolado não-eficiente *Scutellospora calospora* MN414C, produziu matéria seca similar à de plantas colonizadas por *Glomus* sp. sozinho.

Esses dados indicam que processos interativos que impactam as respostas de eficiência ocorrem entre os isolados de FMAs co-colonizando um sistema radicular. Parte dessas interações indubitavelmente envolve a extensão do desenvolvimento micorrízico, o qual poderia afetar a magnitude da resposta do hospedeiro. Um isolado fúngico pode formar micorriza desproporcionalmente por ocupar primeiro o espaço radicular disponível para colonização (Wilson, 1984). No experimento com trevo vermelho, o isolado menos eficiente da comunidade MN414 pode ter um crescimento mais rápido do que o isolado eficiente. Diferenças na taxa de formação de unidades de colonização também podem ser um fator diferencial no desenvolvimento da micorriza (Wilson & Trinick, 1983), embora esse fator possa ser negligenciado no experimento com trevo vermelho, visto que a infectividade de cada isolado foi equalizada. As interações entre fungos micorrízicos certamente ocorrem na natureza, quando eles formam comunidades complexas ou quando isolados fúngicos são co-inoculados. A natureza e a intensidade dessas interações dependem tanto das propriedades intrínsecas de cada fungo, bem como dos efeitos do solo e do hospedeiro. Esses fatores, no entanto, são difíceis de medir, visto que o fungo não pode ser separado da sua planta hospedeira.

A performance das plantas associadas com todos os membros de cada comunidade fúngica foi igual ou superior à das plantas colonizadas pelo isolado mais

eficiente de cada comunidade, baseado na biomassa foliar, conteúdo de P foliar, ou ambas as medidas. Esses dados, contudo, não são suficientemente robustos para concluir que uma mistura de fungos (inóculo misto) consistentemente beneficiará as plantas de melhor forma do que isolados fúngicos (inóculo puro). A co-inoculação, algumas vezes, produziu respostas aditivas, mostrando que os resultados são fortemente dependentes da composição de cada mistura. Outro estudo revela que combinar isolados fúngicos pode eliminar uma performance pobre de um isolado e prover resultados mais consistentes (Daft & Hogarth, 1983). Além disso, a performance de uma mistura de isolados pode ser atribuída a determinado isolado, como demonstrado por Paula et al. (1988), que atribui a eficiência de populações mistas de FMAs à presença de um isolado de *Glomus etunicatum* no inóculo. Testar a eficiência dos isolados separados e em conjunto consiste de uma estratégia necessária para caracterizar completamente a performance de qualquer mistura de inoculante para aplicações em campo.

Dissecar uma comunidade micorrízica pelo cultivo de todos os seus membros fúngicos e testar cada isolado individualmente ou em mistura selecionadas é uma tarefa difícil, o que explica a ausência de tais estudos até o momento. Gavito & Varela (1995), por exemplo, pretenderam cultivar e testar 14 espécies de uma comunidade fúngica associada com milho, mas eles obtiveram sucesso com apenas duas espécies. Neste estudo, apenas de três a cinco espécies foram isoladas das comunidades, mas é provável que outros fungos menos agressivos e que não estavam esporulando possam estar presentes na comunidade original, visto que três a cinco espécies de FMAs podem ser consideradas uma comunidade micorrízica relativamente simples (Morton et al., 1995).

Apesar disso, segundo os resultados, fungos eficientes estão presentes em todas as comunidades examinadas, indicando que o manejo de fungos nativos pode ser uma estratégia mais útil na maioria dos habitats do que a introdução de espécie exóticas em inóculos comerciais. Do ponto de vista prático, a eficiência líquida de toda a comunidade fúngica pode ser testada a partir do inóculo produzido em culturas armadilhas, não havendo a necessidade de cultivar e testar cada espécie fúngica separada. Por outro lado, se um inóculo misto for ineficiente, pesquisas adicionais podem ser desenvolvidas para determinar a eficiência e infectividade de cada isolado fúngico.

## CONCLUSÕES

1. Pelo menos um isolado de cada comunidade de FMA foi eficiente em aumentar a biomassa foliar e o conteúdo foliar de P das plantas hospedeiras. Alguns isolados diferencialmente promoveram

aumento na matéria seca, enquanto outros isolados aumentaram o conteúdo de P.

2. As respostas de isolados com eficiência alta ou eficiência baixa foram consistentes em ambos os hospedeiros testados, soja e trevo vermelho.

3. A co-ocorrência de isolados fúngicos eficientes e não-eficientes, originados da mesma comunidade micorrízica, resultou em um efeito aditivo ou neutro na biomassa foliar e conteúdo de P relativamente a cada isolado sozinho. As plantas colonizadas por cada par de isolados mostraram um aumento na biomassa foliar e conteúdo foliar de P relativamente às plantas-controle não micorrizadas.

4. Comparando a comunidade fúngica total relativamente aos isolados de cada comunidade, ambas as comunidades testadas (VA105 e MN414) tiveram uma performance igual ou superior à do isolado mais eficiente, usando biomassa foliar e, ou, conteúdo foliar de P como critério de eficiência.

5. Um benefício líquido foi observado em plantas de trevo vermelho colonizadas por duas das comunidades fúngicas relativamente ao controle não micorrizado.

#### AGRADECIMENTOS

O autor gostaria de agradecer a West Virginia Agricultural and Forestry Experiment Station, pela possibilidade de realizar o trabalho; ao CNPq – Brasília/Brasil, pela bolsa de doutorado para a pesquisa de dissertação do Ph.D.; a Bill Wheeler, pela ajuda nos experimentos, e ao Dr. Joseph B. Morton, pela ajuda nas discussões e comentários no manuscrito.

#### LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi in field soils. *Austr. J. Agric. Res.*, 32:621-630, 1981.
- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. In: POWELL, C.L.I. & BAGYARAJ, D.J., eds. *VA Mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.113-130.
- ANDERSON, D.L. & HENDERSON, L.J. Sealed chamber digestion for plant nutrient analyses. *Agron. J.*, 78:937-939, 1986.
- ANDERSON, R.C.; HETRICK, B.A.D. & WILSON, G.W.T. Mycorrhizal dependence of *Andropogon gerardii* and *Schizachyrium scoparium* in two prairie soils. *Am. Midl. Nat.*, 132:366-376, 1994.
- BETHLENFALVAY, G.J.; FRANSON, R.L.; BROWN, M.S. & MIHARA, K.L. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Physiol. Plant.*, 76:226-232, 1989.
- BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res.*, 21:171-213, 1991.
- DAFT, M.J. The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. *Plant Soil*, 71:331-337, 1983.
- DAFT, M.J. & HOGARTH, B.G. Competitive interactions amongst four species of *Glomus* on maize and onion. *Trans. British Mycol. Soc.*, 80:339-345, 1983.
- GAVITO, M.E. & VARELA, L. Response of "criollo" maize to single and mixed species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 176:101-105, 1995.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:489-500, 1980.
- GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G. & MENGE, J.A. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. *New Phytol.*, 91:183-189, 1982.
- HAAS, J.H. & KRIKUN, J. Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytol.*, 100:613-621, 1985.
- JOHNSON, N.C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecol. Appl.*, 3:749-757, 1993.
- KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 92:486-505, 1989.
- LOWTHER, J.R. Use of a single sulfuric acid hydrogen peroxide digest for the analysis of *Pinus radiata* needles. *Comm. Soil Sci. Plant Ann.*, 11:175-188, 1980.
- MOORMAN, T. & REEVES, F.B. The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid West. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. *Am. J. Bot.*, 66:14-18, 1979.
- MORTON, J.B. Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales. In: BACON, C.W. & WHITE Jr., J.F., eds. *Microbial endophytes*. New York, Marcel Dekker, 2000. p.121-140.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P. & BEVER, J.D. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can. J. Bot.*, 73:S25-S32, 1995.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H. & OLIVEIRA E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos micorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. *R. Bras. Ci. Solo*, 12:25-31, 1988.
- SAGGIN JÚNIOR, O.J. & SIQUEIRA, J.O. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 19:221-228, 1995.
- SAS INSTITUTE. JMP® Statistics and Graphics Guide. Cary, NC, 1995.
- SCHENCK, N.C. & SMITH, G.S. Responses of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytol.*, 92:193-201, 1982.

- SCHUBERT, A. & HAYMAN, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XVI. Effectiveness of different endophytes at different levels of soil phosphate. *New Phytol.*, 103:79-90, 1986.
- SKIPPER, H.D. & SMITH, G.W. Influence of soil pH on the soybean-endomycorrhiza symbiosis. *Plant Soil*, 53:559-563, 1979.
- SMITH, S.E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 39:221-244, 1988.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press, 1997. 605p.
- STAHL, P.D. & SMITH, W.K. Effects of different geographic isolates of *Glomus* on the water relations of *Agropyron smithii*. *Mycologia*, 76:261-267, 1984.
- STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. & SANDERS, I. Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from calcareous grasslands. *J. Ecol.*, 85:181-191, 1997.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 20:39-43, 1988.
- SYLVIA, D.M.; WILSON, D.O.; GRAHAM, J.H.; MADDOX, J.J.; MILLNER, P.P.; MORTON, J.B.; SKIPPER, H.D.; WRIGHT, S.F. & JARSTFER, A.G. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25:705-713, 1993.
- TRAPPE, J.M. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G.R., ed. *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Boca Raton, CRC Press, 1987. p.5-25.
- WILSON, J.M. Competition for infection between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 97:427-435, 1984.
- WILSON, J.M. & TRINICK, M.J. Infection, development and interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 93:543-554, 1983.