

MICORRIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS EM FUNÇÃO DE INÓCULOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES¹

ANTONIO ALBERTO ROCHA OLIVEIRA, OLMAR BALLER WEBER² e ANA CHRISTINA GUIMARÃES M. DA SILVA³

RESUMO - Estudou-se, em casa de vegetação, a eficiência de dois tipos de inóculo de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA) sobre o estabelecimento da associação e o crescimento de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), limão 'Rugoso da Flórida' (*C. jambhiri* Lush) e limão 'Rugoso da Flórida FM' (*C. jambhiri* Lush). Foram aplicados 50 ml de solo contendo micélio, fragmentos de raízes colonizadas e propágulos suficientes para fornecer 500 clamidósporos por planta e 50 ml de suspensão contendo aproximadamente 1.000 clamidósporos dos fungos MVA *Glomus mosseae* (Nic. & Gerd.) e *Glomus etunicatum* (Becker & Gerd.) por planta. A altura das plantas foi maior em todos os tratamentos com o inóculo composto de solo, raízes e esporos, especialmente na associação *G. etunicatum* e limão 'Rugoso da Flórida FM'. O maior incremento de peso da matéria seca foi observado nas plantas que receberam inóculo de solo + propágulos, independentemente do fungo MVA e do porta-enxerto utilizados.

Termos para indexação: *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Citrus limonia*, *Citrus jambhiri*, limão 'Cravo', limão 'Rugoso', limão 'Rugoso da Flórida', limão 'Rugoso da Flórida FM'.

MYCORRHIZAL INFECTION AND CITRUS ROOTSTOCKS GROWTH IN FUNCTION OF INOCULUM TYPE OF MVA FUNGI

ABSTRACT - A greenhouse study was made on the efficiency of two inoculum types of mycorrhizal vesicular-arbuscular (MVA) fungi on the establishment of symbiotic association and on the growth of 'Rangpur' lime (*Citrus limonia* Osbeck), 'Flórida' rough lemon (*C. jambhiri* Lush) and 'Florida FM' rough lemon (*C. jambhiri* Lush). The inocula of *Glomus mosseae* (Nic. & Gerd.) and *G. etunicatum* (Becker & Gerd.) consisted of: 1) 50 ml of soil containing mycelium, fragments of infected mycorrhizal roots and propagules enough to provide 500 chlamydozoospores per plant and 2) 50 ml of suspension containing approximately 1,000 chlamydozoospores of the MVA fungi per plant. The plant height was greater in all treatments with inoculum composed of soil, infected mycorrhizal roots and spores, especially in the association between *G. etunicatum* and 'Florida FM' rough lemon. The highest increase of dry weight was observed in plants inoculated with soil plus propagules, independently of the MVA fungus and rootstocks utilized.

Index terms: *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Citrus limonia*, *Citrus jambhiri*, 'Rangpur' lime, 'Florida' rough lemon, 'Florida FM' rough lemon.

INTRODUÇÃO

As micorrizas do tipo vesículo-arbuscular (MVA) são ubíquas em raízes da maioria das plantas cultivadas e benéficas ao crescimento da planta hospedeira, especialmente em solos de

baixa fertilidade (Gerdemann 1975). As plantas cítricas, por possuírem um sistema radicular do tipo magnolóide, com pêlos absorventes pouco desenvolvidos, mostram-se altamente dependentes das micorrizas para a absorção do P em solos com baixa disponibilidade desse mineral (Baylis 1970). Essa dependência é definida por Gerdemann (1975) como o grau pelo qual uma planta é carente da condição micorrízica para produzir seu máximo crescimento ou rendimento em um determinado nível de fertilidade do solo. Em solos fumigados ou esterilizados e que

¹ Aceito para publicação em 19 de dezembro de 1991.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMP). Caixa Postal 007, CEP 44380 Cruz das Almas, BA.

³ Enga. - Agra., Bolsista do CNPq.

Posteriormente receberam inóculo de fungos micorrízicos, a resposta de crescimento dos citros pode ser incrementada entre 120 e 2.600%, como reflexo da melhor nutrição mineral proporcionada por esses simbioses. Mesmo em solo natural, a eficiência de várias espécies micorrízicas tem-se evidenciado como maior estímulo ao desenvolvimento das plantas cítricas quando comparadas com as que não receberam inóculo (Menge et al. 1978).

Dentre os citros existe variação na dependência micorrízica, que é influenciada pela cultivar empregada e pela espécie de fungo MVA inoculado, além de outros fatores do solo (Graham & Syvertsen 1985, Edriss et al. 1984). Tem sido demonstrado que o limão 'Rugoso', a laranja 'Azeda' e a tangerina 'Cleópatra' estão entre as espécies cítricas mais dependentes de micorrização (Levy & Krikun 1980, Menge et al. 1978), o que não implica falta de resposta dos demais porta-enxertos tais como laranja-doce, limão 'Cravo' e citranges, que também apresentam graus variáveis de dependências à associação (Marx et al. 1971).

Um dos aspectos da utilização prática das micorrizas VA é a escolha do método de inoculação. Como o fungo não cresce em meio de cultura artificial, o inóculo deve ser produzido em plantas multiplicadoras e aplicado na forma de suspensão de esporos ou alíquotas de solo contendo esporos e fragmentos de raízes colonizadas (Hayman et al. 1981, Manjunath & Bagyaraj 1981). Vários autores têm tentado padronizar o inóculo básico de fungos MVA para uso em larga escala na agricultura (Hatting & Gerdemann 1975, Hall 1976, Biermann & Linderman 1983, Elmes et al. 1984, Ferguson & Menge (1986), comparando diferentes métodos da inoculação de fungos MVA em citros, destacaram a rapidez na colonização radicular proporcionada pela inoculação em solo + raízes micorrizadas e a pureza e uniformidade de inóculo obtido com a suspensão de esporos. Segundo Nemeč (1983), a maioria dos métodos de inoculação baseiam-se no emprego de esporos, esporocarpos, fragmentos de raízes infectadas e micélio externo, variando a maneira de aplicação que pode ser em sementes pré-germina-

das, em contato com raízes de plantas ou disperso diretamente no solo.

O presente trabalho objetivou comparar a efetividade simbiótica de dois fungos micorrízicos vesículo-arbusculares aplicados em três porta-enxertos de citros, mediante dois tipos de inóculo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de agosto de 1986 a março de 1987, em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura da EMBRAPA, em Cruz das Almas, Bahia.

Como substrato utilizou-se material da camada arável (0 a 20 cm) de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico com teor baixo de P (6 ppm de P). O solo foi misturado a igual volume de areia de rio, ambos previamente fumigados com brometo de metila na dosagem de 80 cc/m³ de substrato.

Foi adotado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com cinco repetições em esquema fatorial, com dois fungos MVA, dois métodos de inoculação desses fungos e três porta-enxertos de citros.

As plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), limão 'Rugoso da Flórida' (*C. jambhiri* Lush) e limão 'Rugoso da Flórida FM' (*C. jambhiri* Lush) receberam a inoculação dos fungos micorrízicos VA *Glomus mosseae* (Nic. & Gerd.) e *Glomus etunicatum* (Becker & Gerd.) durante o transplante da sementeira para vasos contendo 4 kg de substrato. Foram testados dois tipos de inóculo: 1) 50 ml de solo contendo micélio, fragmentos de raízes colonizadas e propágulos suficientes para fornecer 500 clamidósporos por planta. 2) 50 ml de suspensão contendo aproximadamente 1.000 clamidósporos dos fungos MVA. Acrescentou-se um tratamento controle com ausência dos fungos MVA e padronização da microflora da suspensão original após passagem em peneira de 0,037 mm de abertura. Cada parcela experimental consistia de um vaso contendo uma planta que era semanalmente fertilizada com 100 ml de solução de Hoagland sem P.

Aos seis meses do transplante, o ensaio foi colhido, e avaliaram-se os seguintes parâmetros: altura das plantas, produção de esporos no solo, colonização de raízes, e peso da matéria seca da parte aérea e das raízes. A extração de clamidósporos foi efetuada através de flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins 1964) e peneiramento úmido seqüencial. A quantificação desses esporos foi efetuada em lâmina de

contagem de Peter com auxílio de microscópio. A infecção micorrízica foi estimada pela técnica de observação de segmentos de raízes (Giovannetti & Mosse 1980) após clareamento e coloração destas conforme metodologia de Phillips & Hayman (1970). As plantas colhidas foram separadas em parte aérea e sistema radicular e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, até atingir peso constante, sendo então determinado o peso da matéria seca.

Os resultados foram analisados estatisticamente, aplicando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% para comparação das médias dos tratamentos. Os dados oriundos de contagens foram transformados em \sqrt{x} , e os valores percentuais, convertidos para arco seno $\sqrt{\%/100}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os valores expressos na Fig. 1, verifica-se que a produção de esporos na rizosfera das plantas e a infecção micorrízica foram mais acentuadas com a utilização do inóculo constituído de solo + propágulos do que a inoculação com a suspensão de esporos. Esses resultados estão em consonância com os obtidos por Biermann & Linderman (1983) e Graham & Fardelmann (1986). Esses autores comentam que o sucesso da inoculação com raízes colonizadas se deve ao rápido crescimento das hifas dos segmentos infectados e à presença de vesículas nas raízes senescentes, que freqüentemente têm suas paredes engrossadas, convertendo-se em clamidósporos. Outros autores (Manjunath & Bagyaraj 1981, Biermann & Linderman 1983) apontam também a maior densidade de unidades infectivas representadas pelos esporos, hifas e vesículas como responsáveis pela superioridade da inoculação com raízes colonizadas, e, de acordo com Abbott & Robson (1981, 1984), com conseqüente redução do tempo da infecção micorrízica. Também, em estudo realizado por Mosse (1962), ficou evidenciado que a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* favorece a micorrização de plantas.

A altura das plantas foi maior em todos os tratamentos com o inóculo composto de solo, raízes e esporos, em comparação com as plantas

infectadas somente com a suspensão de esporos, e às testemunhas (Fig. 2). Apesar da baixa resposta de crescimento à inoculação com a suspensão de esporos, observa-se uma tendência de maior altura das plantas infectadas dessa forma em relação às plantas sem inoculação, especialmente quando se utilizou *Glomus etunicatum* associado ao limão 'Rugoso da Flórida FM'. Nota-se que esse fungo foi mais eficaz em promover o incremento em altura dos porta-enxertos, principalmente quando infectados com o composto solo + propágulos. Isto confirma resultados obtidos anteriormente, de que o limão 'Rugoso' é bastante dependente da condição micorrízica (Nemec 1978, Levi & Krikum 1980). Conforme Menge et al. (1978), a menor quantidade de raízes absorventes desse porta-enxerto está inversamente correlacionada com sua maior dependência de micorrização.

O efeito mais significativo, observado no limoeiro 'Rugoso da Flórida FM', pode ser atribuído à maior afinidade à micorrização com a espécie nativa (*G. etunicatum*), tendo em vista que esse porta-enxerto, além do seu maior grau de dependência micorrízica (Tabela 1), adaptado à simbiose com espécies endógenas, foi obtido de seleção local do limão 'Rugoso da Flórida'.

O peso da matéria seca das raízes e da parte aérea dos três porta-enxertos estudados mostrou variação em função dos fungos testados e do tipo de inóculo empregado (Tabela 2). Com relação aos fungos MVA inoculados, observa-se que a maior variação de peso ocorreu com a inoculação de *G. etunicatum*, sendo menores as diferenças nas plantas infectadas com *G. mosseae*, ambas comparadas com as testemunhas. Nesse parâmetro de avaliação também foi evidenciada a maior dependência de micorrização do limão 'Rugoso da Flórida FM'. Constatou-se, também, que, independentemente do fungo MVA e do porta-enxerto utilizados, o inoculante via solo, embora contendo a metade do número de clamidósporos que o inóculo via suspensão de esporos, induziu maior incremento no peso da matéria seca do que esse último tipo de inóculo. Esses dados estão em concordância com as pesquisas de vários autores (Hall 1976,

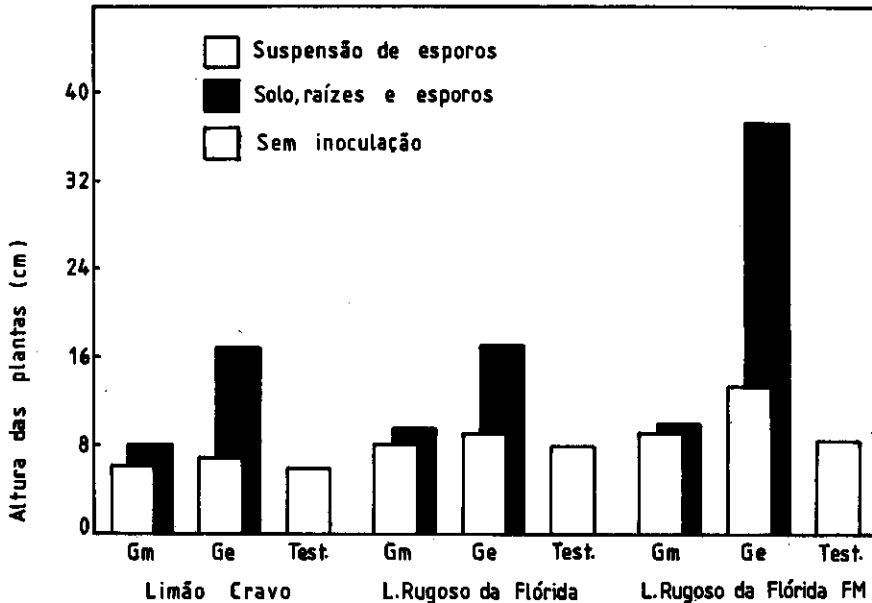


FIG. 1. Produção de esporos na rizosfera e taxa de colonização micorrízica das plantas de limão 'Cravo' (A), limão 'Rugoso da Flórida' (B) e limão 'Rugoso da Flórida FM' (C), com os dois tipos de inóculo dos fungos micorrízicos *Glomus mosseae* (Gm) e *G. etunicatum* (Ge).

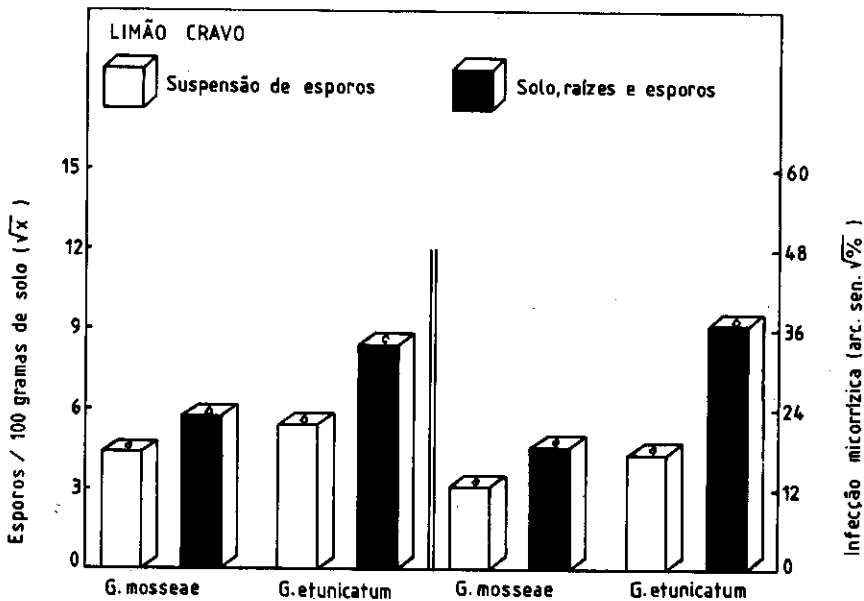


FIG. 2A. Altura das plantas dos três porta-enxertos inoculados com os dois tipos de inóculo dos fungos micorrízicos *Glomus mosseae* (Gm) e *G. etunicatum* (Ge). Test. = testemunha sem inoculação de fungo MVA. Distâncias mínimas significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, foram de 5,3 cm. (Figs. 2A, 2B, 2C).

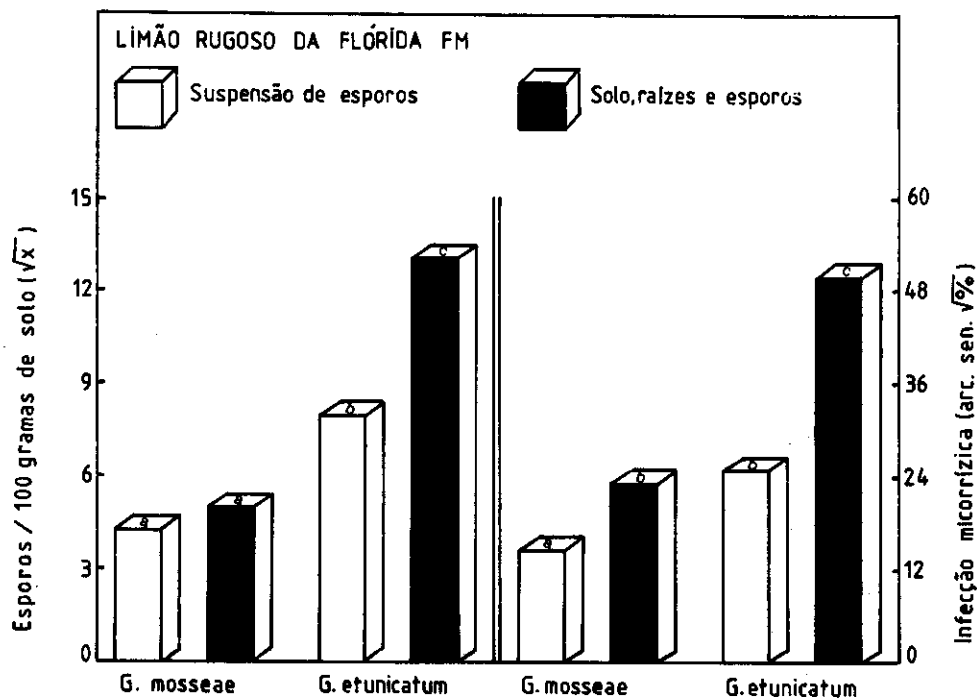


FIG. 2B. A mesma legenda da Fig. 2A.

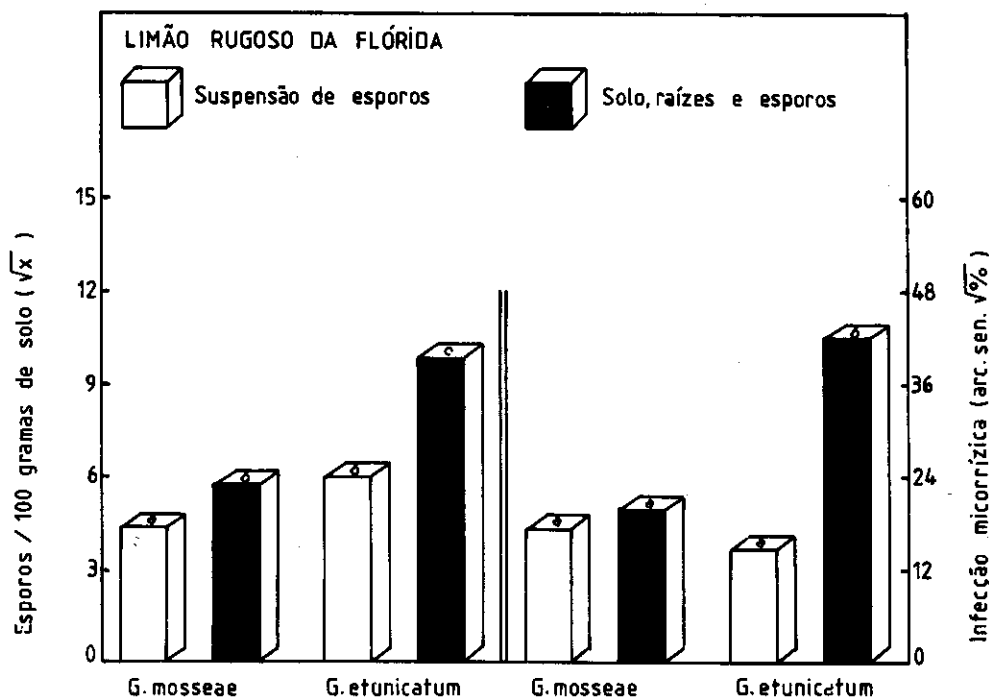


FIG. 2C. A mesma legenda da Fig. 2A.

TABELA 1. Dependência micorrízica dos três porta-enxertos em função da altura das plantas e em relação aos tipos de inóculo dos fungos MVA.

Porta-enxertos	Dependências micorrízica ¹			
	<i>Glomus mosseae</i>		<i>Glomus etunicatum</i>	
	Inóculo de solo ²	Suspensão de esporos ³	Inóculo de solo ²	Suspensão de esporos ³
Limão 'Cravo'	1,45	1,11	3,11	1,25
Limão 'Rugoso da Flórida'	1,19	1,05	2,36	1,13
Limão 'Rugoso da Flórida FM'	1,20	1,01	4,31	1,52

¹ Dependência micorrízica = $\frac{\text{Altura das plantas inoculadas}}{\text{Altura das plantas não inoculadas}}$

² Inóculo de solo = Solo, raízes, micélio e clamidósporos

³ Suspensão de clamidósporos.

TABELA 2. Peso da matéria seca da raiz e parte aérea de plantas de limão 'Cravo', limão 'Rugoso da Flórida' e limão 'Rugoso da Flórida FM' inoculadas com dois tipos de inóculo de dois fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA)¹.

Fungos MVA	Tipo de inóculo	Limão 'Cravo'		Limão 'Rugoso da Flórida'		Limão 'Rugoso da Flórida FM'	
		Peso da matéria seca (g)		Peso da matéria seca (g)		Peso da matéria seca (g)	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
<i>Glomus etunicatum</i>	Inóculo de solo ²	5,2a	7,8a	6,1a	8,6a	8,8a	11,6a
	Suspensão de esporos ³	2,0b	3,3bc	3,0b	5,1b	5,3b	8,0b
<i>Glomus mosseae</i>	Inóculo de solo	2,1b	3,6b	3,2b	5,5b	3,4c	5,1c
	Suspensão de esporos	1,2c	3,0c	2,3c	4,3c	2,7d	4,8c
Testemunha	-	1,0c	2,2d	2,1c	4,0c	2,4d	4,6c
DMS		0,6	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7
CV (%)		12,0	7,8	6,3	6,7	11,1	7,6

¹ Médias comparadas na coluna, seguidas por letras idênticas, não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

² Solo, raízes, micélio e clamidósporos.

³ Suspensão de clamidósporos.

Powell 1976, Ferguson & Menge 1986), que verificaram maior eficiência infectiva do inóculo contendo solo, esporos, hifas e raízes colonizadas, destacando que, no conjunto, esse tipo de inóculo fornecia adequado número de propágulos para o estabelecimento da associação micorrízica. De acordo com Powell (1976) e Manjunath & Bagyaraj (1981), a veiculação desses propágulos via solo pode favorecer a germinação dos esporos em função da atividade da microbiota desse substrato. Por outro lado, sabe-se que na obtenção dos esporos isolados existe o inconveniente de se suspender esses propágulos em solução de sacarose, o que certamente inviabiliza grande número de esporos, em virtude do estresse osmótico a que são submetidos nesse processo (Furlan et al. 1980), e a conseqüente colonização por hiperparasitas. Microrganismos contaminantes têm sido observados na superfície de esporos desses fungos (Daniels & Menge 1980, Varma et al. 1981, MacDonald et al. 1982).

CONCLUSÕES

1. O uso de inóculo constituído de solo, esporos, micélio e raízes colonizadas por fungos micorrízicos teve efeito mais significativo sobre a taxa de colonização micorrízica e o crescimento dos porta-enxertos que a inoculação com a suspensão de esporos.

2. O fungo micorrízico *Glomus etunicatum*, independentemente do tipo de inóculo utilizado e do porta-enxerto testado, destacou-se como simbionte mais eficiente em promover o crescimento das plantas cítricas.

3. Os porta-enxertos estudados apresentaram diferenças quanto à dependência micorrízica aos fungos MVA inoculados. O limão 'Rugoso da Flórida FM' mostrou-se mais dependente à condição micorrízica, especialmente em associação com *G. etunicatum*.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.32, p.631-639, 1981.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The effect of root density, inoculum placement and infectivity of inoculum on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, v.97, p.285-299, 1984.
- BAYLIS, G.T.S. Root hairs and phycomycetous mycorrhizas in phosphorus deficient soil. *Plant Soil*, v.33, p.713-716, 1970.
- BIERMANN, B.; LINDERMAN, R.G. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*, v.95, p.97-105, 1983.
- DANIELS, B.A.; MENGE, J.A. Hyperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, v.70, p.584-588, 1980.
- EDRISS, M.H.; DAVIS, R.M.; BURGER, D.W. Increased growth responses of Citrus by several species of mycorrhizal fungi. *Horticultural Science*, v.19, p.537-538, 1984.
- ELMES, R.P.; HEPPER, C.M.; HAYMAN, D.S.; O'SHEA, J. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots grown by the nutrient film technique as inoculum for field sites. *Annals of Applied Biology*, v.104, p.437-441, 1984.
- FERGUSON, J.J.; MENGE, J.A. Response of Citrus seedlings to various field inoculation methods with *Glomus deserticola* in fumigated nursery soils. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.111, p.288-292, 1986.
- FURLAN, V.; BARTSHI, H. FORTIN, J.A. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Transactions of the British Mycological Society*, v.75, p.336-338, 1980.
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J.G.; CLARKSON, D.T.; (Eds.). *The development and function of roots*. London: Academic Press, 1975. p.575-591.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, v.84, p.489-500, 1980.
- GRAHAM, J.H.; FARDELMANN, D. Inoculation of Citrus with root fragments containing chlamydospores of the mycorrhizal fungus

- Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Botany*, v.64, p.1739-1744, 1986.
- GRAHAM, J.H.; SYVERTSEN, J.P.; Host determinants of mycorrhizal dependency of Citrus rootstocks seedlings. *New Phytologist*, v.101, p.667-676, 1985.
- HALL, I.R. Response of *Coprosma robusta* to different forms of endomycorrhizal inoculum. *Transactions of the British Mycological Society*, v.67, p.409-411, 1976.
- HATTING, M.J.; GERDEMANN, J.W. Inoculation of Brazilian sour orange seed with an endomycorrhizal fungus. *Phytopathology*, v.65, p.1013-1016, 1975.
- HAYMAN, D.S.; MORRIS, E.J.; PAGE, R.J. Methods for inoculating field crops with mycorrhizal fungi. *Annals of Applied Biologist*, v.99, p.247-253, 1981.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, v.48, p.692, 1964.
- LEVY, Y.; KRIKUN, J. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations recovery from water stress. *New Phytologist*, v.85, p.25-31, 1980.
- MACDONALD, R.M.; CHANDLER, M.R.; MOSSE, B. The occurrence of bacterium-like organelles in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, v.90, p.659-663, 1982.
- MANJUNATH, A.; BAGYARAJ, D.J. Components of VA mycorrhizal inoculum and their effects on growth of onion. *New Phytologist*, v.87, p.355-363, 1981.
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C.; CAMPBELL, W.A. Effect of endomycorrhizae formed by *Endogone mosseae* on growth of Citrus. *Mycologia*, v.63, p.1222-1226, 1971.
- MENGE, J.A.; JOHNSON, E.L.V.; PLATT, R.G. Mycorrhizal dependency of several Citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytologist*, v.81, p.553-559, 1978.
- MOSSE, B. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology*, v.27, p.509-520, 1962.
- NEMEC, S. Inoculation of Citrus in the field with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Florida. *Tropical Agricultural*, Trinidad, v.60, p.97-101, 1983.
- NEMEC, S. Response of six citrus rootstocks to three species of *Glomus* mycorrhizal fungus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v.91, p.10-104, 1978.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment for infection. *Transactions of the British Mycological Society*, v.55, p.158-163, 1970.
- POWELL, C.L. Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. *Transactions of the British Mycological Society*, v.66, p.439-445, 1976.
- VARMA, A.J.; JINGH, K.; LALL, V.K. Lumen bacteria from endomycorrhizal spores. *Current Microbiology*, v.6, p.207-221, 1981.