

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E PATÓGENOS RADICULARES DE CITROS

ID-27868

Antonio Alberto Rocha Oliveira¹; Cláudia Melo da Paixão²; Robélia Tosta Dias Amorim³

¹Pesquisador - Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA

²Mestre em Ciências Agrárias/UFBA, Cruz das Almas-BA

³Eng. Agr. Escola de Agronomia/UFBA, Cruz das Almas-BA

INTRODUÇÃO

A produtividade de um pomar de citros depende em grande parte da qualidade da muda usada na sua implantação. Assim, a muda cítrica é considerada o insumo mais importante na formação de um pomar, sendo de interesse dos viveiristas e técnicos a obtenção de mudas sadias, vigorosas, de crescimento rápido, bem como portadoras de uma rizomassa desenvolvida.

Diversos fatores podem influenciar o desenvolvimento das mudas e, dentre eles, o grande número de doenças que incide sobre a cultura, das quais, mais de 52 são atribuídas a fungos e bactérias. Dentre os fungos que afetam a cultura dos citros, o gênero *Pythium* destaca-se como patógeno de grande importância. Esse fungo é amplamente distribuído no mundo, atacando partes subterrâneas das plantas ou partes destas que se desenvolveram próximas ao solo, causando diferentes tipos de doenças, tais como: podridão de sementes, estiolamento de pré e pós-emergência, podridão de raízes e podridão mole de órgãos suculentos. Estratégias de manejo consistem, dentre outras, no uso de porta-enxertos resistentes, uso de práticas culturais que minimizem a exposição da suscetibilidade do tecido do enxerto ao fungo e na fumigação do solo antes do plantio. A aplicação de fungicidas sistêmicos pode provocar boa supressão da doença, mas nem sempre é desejável devido ao alto custo, probabilidade de desenvolvimento de resistência e potencial de risco ao ambiente (Rossetti, 1991).

Nos anos recentes, vem se multiplicando o número de pesquisas que fazem uso do método de controle biológico, notadamente o uso de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) para o controle de diversas fitomoléstias (Zambolim, 1991; Fontes, 1992; Guillemain et al., 1994). Esses fungos formam associações mutualísticas com as raízes das plantas e ocorrem na maioria das espécies em condições naturais, sendo responsáveis pela maior absorção de água e nutrientes do solo pelas plantas (Zambolim & Siqueira, 1985). O efeito benéfico é devido, principalmente, à formação de micélio externo à raiz que, constituindo uma superfície adicional, permite melhor distribuição das raízes no solo, aumentando, com isso, a retirada de elementos minerais pouco móveis, como o fósforo. Das frutíferas estudadas nos últimos anos, as plantas cítricas foram identificadas como as mais dependentes dos FMAs e que também redundaram em melhores respostas, principalmente em solos com baixo nível de fósforo disponível na solução, o que caracteriza os principais solos brasileiros utilizados para a citricultura (Hoffmann et al., 1996).

O efeito de FMAs, em relação aos fitopatógenos, depende de quais organismos se estabelecem primeiro no tecido das raízes (Siqueira, 1994). O efeito protetor ocorre quando ambos os microrganismos estão simultaneamente presentes na rizosfera ou na raiz da planta, sendo que a pré-colonização da raiz pelo fungo micorrízico garante uma proteção mais eficiente. Assim, este efeito deve começar durante a fase inicial de desenvolvimento do vegetal e continuar durante todo ciclo da cultura (Silveira, 1992). Efeitos benéficos foram observados em plantas de tomate cultivar "Pusa Ruby", em termos de redução de danos causados por *Pythium aphanidermatum*, quando inoculado com *Glomus fasciculatum*. Quando *Glomus* foi inoculado simultaneamente ou duas semanas antes do fitopatógeno, a incidência de "damping-off" foi reduzida e o peso da raiz aumentada, em relação à inoculação micorrízica duas semanas depois do fitopatógeno. Este resultado sugere que FMAs podem colonizar e proteger plantas de tomate de "damping-off", quando a mesma ainda não está infectada por *P. aphanidermatum* (Hedge & Rai, 1984). Em outro trabalho, Eyer & Sundaraju (1993), estudando gengibre, observaram que os FMAs foram favoráveis ao crescimento das plantas reduzindo a porcentagem de infecção por *P. aphanidermatum*. Calvet et al. (1993) citam que *Glomus mosseae* inoculado em cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.) protegeu a planta de *Pythium ultimum*, havendo aumento de biomassa vegetal. St-Arnaud (1994) observou que a inoculação de *G. intraradices* com *Pythium ultimum* não afetou a biomassa de *Tagetes patula* e em plantas jovens não afetou a colonização das raízes por *Glomus*. A inoculação conjunta dos dois microrganismos fez reduzir o número de propágulos do patógeno e aumentou rapidamente o mecanismo de resistência à doença. Davis & Menge (1980) demonstraram que, em solos fertilizados com 6 g de P/g de solo, o total de

peso seco de citros micorrizados com *Glomus fasciculatum* foi maior que na condição não inoculada. Esse estudo sugere que plantas cítricas micorrizadas são eficientes no controle de *Phytophthora* em condições de baixa fertilidade.

Dessa forma, o emprego de plantas cítricas micorrizadas oferece grandes possibilidades de exploração, pois pode resultar em mudas mais precoces, com maior desenvolvimento, mais tolerantes à fitopatógenos e ao estresse do transplantio e do ambiente, a um menor custo de produção por reduzir gastos com defensivos agrícolas e fertilizantes, contribuindo desta forma para a biodiversidade e sustentabilidade agrícola. Entretanto, na cultura dos citros, a literatura nacional e internacional sobre interação entre estes fungos simbióticos e aqueles patogênicos é muito escassa em resultados de pesquisa. Assim, buscou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de FMAs nativos e/ou *Gigaspora margarita* e de *Pythium aphanidermatum* no desenvolvimento e nutrição de mudas cítricas, em substrato natural e autoclavado, bem como obter informações complementares sobre a viabilidade da utilização de porta-enxerto tangerina 'Cleópatra' como alternativa ao limão 'Cravo'.

Ensaio

O experimento foi conduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, localizada no município de Cruz das Almas, Estado da Bahia, no período abril a setembro de 1999, sob condições de casa de vegetação. Como substrato foi utilizado uma mistura de latossolo amarelo distrófico, coletado na área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, com um solo arenoso coletado no campo da Central de Tratamentos de Efluentes (CETREL) e uma parte de areia grossa lavada coletada em rio, numa proporção de 1:1:1 (v:v:v).

Os tratamentos constaram de solo natural, para que fosse garantida a presença de espécies nativas de fungos micorrízicos bem como a microbiota natural do substrato e de solo autoclavado. A esterilização foi feita em autoclave durante uma hora à pressão de uma atmosfera, a 120°C.

Sementes de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck CV) e tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) foram retiradas de frutos maduros originados de uma única planta apropriada para matriz, cultivada no pomar da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. A sementeira foi realizada em casa de vegetação, empregando-se como recipientes, sementeiras de isopor que foram preenchidas com areia previamente autoclavada, numa pressão de 1 atmosfera por 1 hora a 120 °C. Em cada abertura foi colocada uma semente para obtenção dos porta-enxertos. Duas semanas pós-germinação, as plântulas foram selecionadas de acordo com a altura e o número de folhas, dois a três pares definitivos, sendo, então, transplantadas para os vasos que já continham o substrato.

A espécie de fungo micorrízico arbuscular utilizada, *Gigaspora margarita*, procedente da coleção de FMAs do Laboratório de Nematologia e Microbiologia do Solo da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, foi multiplicada, durante cinco meses, em vasos contendo uma mistura de solo de baixa fertilidade: areia grossa lavada: turfa (1:1:1 v:v:v) autoclavada, em condições controlada de casa de vegetação, utilizando-se sorgo (*Sorgum vulgare*) como planta multiplicadora.

O inóculo foi constituído por 20 g da mistura de solo que foi pesada de forma a fornecer aproximadamente 900 esporos por vaso, micélio e raízes infectadas. Visando fornecer aos tratamentos não inoculados com *G. margarita* a população de outros microrganismos existentes no inóculo utilizado no experimento com este fungo usado, uniformizando, assim, a microbiota entre os tratamentos, todos os vasos não inoculados com *G. margarita* receberam 10 mL de um filtrado do inóculo isento de propágulos de FMAs. Esse filtrado foi obtido a partir de 20 g do substrato dos "vasos de cultivo" usado na multiplicação dos FMAs em 1 litro de água deionizada e peneiramento úmido em peneira de 400 "mesh" (0,037 µm de abertura) com a finalidade de reter propágulos de FMAs e deixar passar os outros microrganismos presentes na microbiota desse substrato.

No ato do transplantio das mudas para os vasos, foi realizada a inoculação com o FMA. Fez-se um orifício central no substrato, simulando plantio de mudas em cova e no fundo deste orifício, distribuiu-se um pouco do inóculo. Colocou-se, então, a muda, ao mesmo tempo em que se distribuiu o restante do inóculo ao redor e sobre as raízes da mesma, permitindo-se, desta forma, um contato íntimo. De forma semelhante à descrita na inoculação com FMAs, procedeu-se à inoculação com o filtrado usado nos tratamentos sem FMAs.

Amostras de mudas de limão 'Cravo' com sintomas semelhantes àqueles causados por "damping off" foram coletadas e trazidas para o laboratório de Fitopatologia. A partir das lesões nas mudas selecionadas, obtiveram-se diferentes isolamentos. No preparo do inóculo, triturou-se o conteúdo das placas (cultura pura com fungos com 18 dias de idade) acrescido de 200 mL de água deionizada, durante dois minutos, em liquidificador, aumentando-se gradativamente a velocidade até o máximo. Do preparado de *P. aphanidermatum* foi retirado uma amostra de 1 mL para contagem em hemacitômetro de Rosenthal estimando-se, assim, a densidade de $3,4 \times 10^5$ esporângios mL⁻¹ e, a partir desta, a concentração da suspensão a ser utilizada foi ajustada para 10^4 esporângios mL⁻¹.

A inoculação de *P. aphanidermatum* foi realizada juntamente com a de *G. margarita*, simultaneamente ao transplante das mudas, através da aplicação de 50 ml de uma suspensão contendo hifas, zoósporos e esporângios distribuídos uniformemente sobre as raízes na superfície do substrato ao redor das plantas. Para as testemunhas, sem fitopatógenos, triturou-se meio de cultura sem fungos, e obedecendo procedimento idêntico ao do tratamento com inoculação do fungo, inoculou-se o preparado no mesmo volume da suspensão.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 2x2x2x2 com quatro repetições, perfazendo um total de 64 vasos. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso plástico contendo uma muda.

O experimento foi conduzido durante, aproximadamente, cinco meses, sendo avaliados: altura das plantas, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, comprimento de raiz, densidade de esporos e colonização micorrízica.

Para determinação da colonização micorrízica, usaram-se apenas as radículas, que foram lavadas em água destilada e cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm. O descoramento e a coloração das raízes foram realizados a partir da metodologia de Phillips & Hayman (1970) que foi modificada empregando-se KOH 10 % em banho-maria a 90 °C durante 40 minutos, água alcalina durante 15 minutos, HCl 3 % em 5 minutos, 12 horas em azul-de-tripano a 0,05 %.

A percentagem de segmentos colonizados foi determinada pela visualização sob microscópio estereoscópio de 50 segmentos radiculares de aproximadamente 1 cm de comprimento dispostos em lâminas de vidro contendo glicerina e cobertas com lamínulas, com base em metodologia proposta por Giovannetti & Mosse (1980). O comprimento total das raízes foi determinado pelo método da intersecção linear em placa quadriculada, de acordo com Newman (1966). Para esta determinação, foram utilizadas radículas e raízes mais grossas também cortadas em aproximadamente 1 cm de comprimento.

Os esporos foram extraídos em 50 g de substrato úmido através de peneiramento e centrifugação em solução de sacarose 50 % por 5 e 1 minuto, respectivamente (Gerdemann & Nicolson, 1963; Pacioni, 1992). Em seguida foram colocadas em placas de Petri quadriculadas e através de lupa estimou-se a densidade total de esporos (Giovannetti & Mosse, 1980). Sub-amostras pesando 50 g de substrato úmido foram colocadas em estufa a 60 °C, durante 2 dias, para obtenção de peso da matéria seca e, por regra de três, obteve-se o número de esporos por grama de substrato seco.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%, para comparação das médias conforme o delineamento experimental utilizado, através do programa estatístico SAEG (Ribeiro Junior, 2001).

Densidade de esporos de FMAs e colonização micorrízica

Ocorreram diferenças significativas em relação a todos os tratamentos isoladamente. Na Figura 1, são apresentados os dados sobre densidade de esporos micorrízicos na rizosfera e taxa de colonização micorrízica dos porta-enxertos, aos 150 dias pós-semeadura.

A pequena quantidade de esporos observada no tratamento testemunha, substrato autoclavado e não inoculado, pode ser predominantemente refúgio da esterilização, estando inviável, já que a colonização micorrízica foi praticamente ausente neste tratamento.

Nos tratamentos com *G. margarita*, observou-se tendência de maior esporulação em substrato natural, o que, possivelmente, deve ser devido à presença de fungos nativos já adaptados ao substrato mais a introdução de *G. margarita*, que, também, apresentou boa adaptação. Além disso, como os esporos de *Gigaspora* são grandes, a quantidade produzida é menor em comparação com a de outras espécies, justificando-se a menor densidade de esporos dos tratamentos autoclavados.

Nas plantas sem *Pythium*, a densidade de esporos foi maior para o limão 'Cravo', entretanto, na presença deste patógeno, verificou-se menores valores em praticamente todos os tratamentos.

Pelos dados de colonização apresentados por *G. margarita* em substrato autoclavado, para os dois porta-enxertos, acima de 98 e 48%, na ausência e presença de patógenos, respectivamente, evidencia-se que os propágulos deste fungo eram viáveis e estavam em quantidades suficientes para garantir a colonização das radículas e resposta da planta.

Os fungos nativos apresentaram colonização acima de 45 e 40% na ausência e presença do patógeno, respectivamente, evidenciando, também, estabelecimento no substrato e boa capacidade de colonização das raízes dos porta-enxertos cítricos. *G. margarita* promoveu maior colonização micorrízica em substrato autoclavado ou em substrato natural, comparada aos fungos nativos isoladamente. Entretanto, os maiores valores de colonização foram observados em substrato autoclavado, podendo-se inferir que os FMAs nativos reduziram os efeitos proporcionados por *G. margarita*, visto que, na ausência destes fungos, a resposta à inoculação foi significativamente maior para as

duas variedades. Segundo Brundrett & Juniper (1995), fatores como emissão múltipla de tubos germinativos e o grande tamanho dos esporos favorecem a viabilidade e capacidade de colonização das espécies de *Gigaspora*.

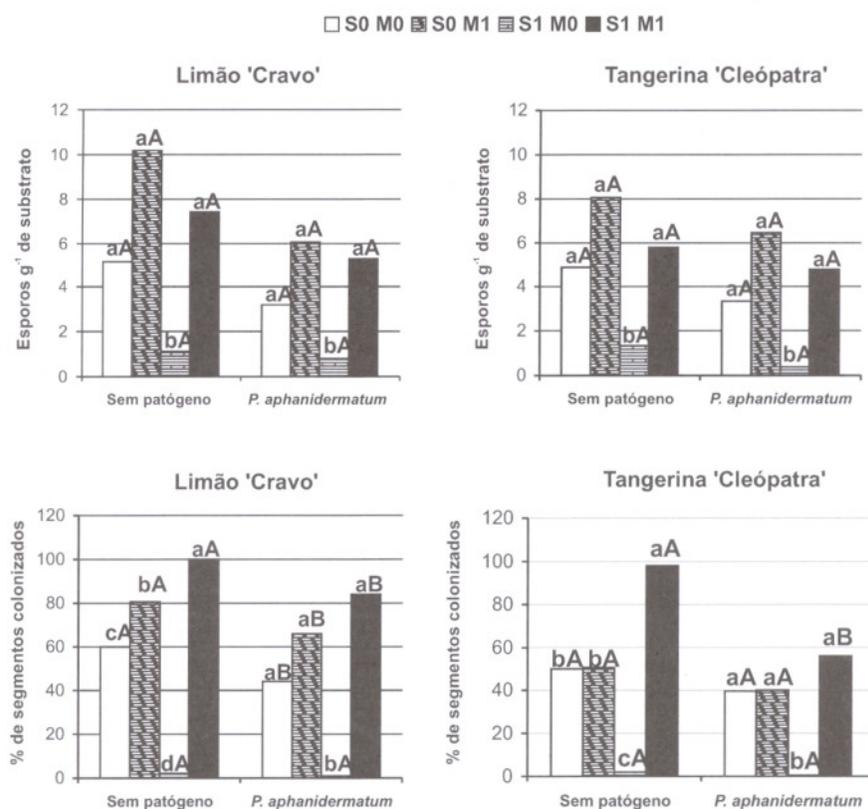


Figura 1. Efeito da inoculação com *Pythium aphanidermatum* sobre a densidade de esporos micorrízicos na rizosfera e taxa de colonização micorrízica dos porta-enxertos limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' inoculados ou não com *Gigaspora margarita*, em substrato natural ou autoclavado. Substrato: S0=natural, S1=autoclavado. FMAs: M0=não inoculado, M1= *Gigaspora margarita*. Barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas comparam os tratamentos patogênicos com ou sem inoculação de FMAs e minúsculas comparam os tratamentos micorrízicos na presença ou ausência do patógeno (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA, 1999).

Foi verificada influência da variedade na colonização por FMAs, sendo estes valores maiores no limão 'Cravo'. Smith & Gianinazzi-Pearson (1988) observaram que diferentes espécies e isolados de uma mesma espécie de FMAs podem exibir benefícios diferenciados às plantas hospedeiras em função das condições edafoclimáticas e aspectos da relação fungo-planta.

Observou-se que *P. aphanidermatum* reduziu a colonização micorrízica dos FMAs nativos e do introduzido e, que na presença deste patógeno, não houve efeito significativo de *G. margarita* em relação aos fungos nativos, o que foi observado na sua ausência. Provavelmente, ocorre competição entre os diferentes fungos por espaço e fotossintatos das plantas, reduzindo a colonização. Pereira (1994), estudando a colonização de cafeeiro por *G. margarita* e *Rhizoctonia*, comentou que os danos causados pelo patógeno no sistema vascular e vasos condutores de seiva, com desestruturação dos tecidos, limitando, conseqüentemente, o crescimento do fungo micorrízico, também pode ocasionar menor colonização.

A redução da colonização micorrízica ocorreu nas duas variedades, mas com diferença significativa apenas no limão 'Cravo'. Desta forma, trabalhando-se com FMAs, se for constatada a presença de *Pythium* no substrato, seria mais adequado trabalhar com a tangerina 'Cleópatra' do que com o limão 'Cravo' que sofre mais danos quando infectado por este patógeno.

Características de crescimento das plantas

Os valores médios de altura, número de folhas, diâmetro do caule e área foliar do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', em função dos tratamentos fúngicos e das épocas de avaliações, encontram-se na Tabela 1. Verifica-se que, mesmo na ausência do patógeno, os valores de todas as características em substrato autoclavado sem FMAs foram muito baixos.

De maneira geral, independentemente do tratamento dado ao substrato, os valores de todas as características analisadas foram significativamente superiores em plantas micorrizadas. Observa-se que os FMAs nativos promoveram aumentos de 48,57 e 31,95% na altura do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', respectivamente, sendo que, em relação à área foliar, estes valores foram superiores 608,33% para o limão 'Cravo' e 190,77% para a tangerina 'Cleópatra'. Já a inoculação de *G. margarita* promoveu aumento acima de 140% na altura dos dois porta-enxertos estudados e de 1004,17 e 318,46% na área foliar de limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', respectivamente, comprovando que as plantas cítricas são bastantes micotróficas e que a presença de FMAs no substrato contribui significativamente para o desenvolvimento dessas plantas. Este resultado vem sendo mencionado em diversos trabalhos com associações micorrízicas em citros (Kleinschmidt & Gerdemann, 1972; Cardoso et al. 1986; Camargo, 1989; Weber et al., 1990; Fonseca et al., 1994).

Tabela 1. Influência da inoculação com *Pythium aphanidermatum* e/ou *Gigaspora margarita* sobre o crescimento vegetativo dos porta-enxertos limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', em substrato natural ou autoclavado (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA, 1999).

Tratamentos			Altura das plantas (cm)		Número de folhas		Diâmetro do caule (cm)		Área foliar (cm ²)	
Variedades	Gm *	Solo **	<i>Pythium aphanidermatum</i> *							
			NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
'Cravo'	NI	A	6,65 aB	6,05 aB	6,00 aB	4,00 bB	0,21 aB	0,18 bB	6,00 aB	4,00 aB
		NA	9,88 aA	7,23 bA	9,50 aA	7,50 bA	0,30 aA	0,23 bA	42,50 aA	39,00 aA
	I	A	17,23 aA	10,90 bA	13,25 aA	10,67 bA	0,36 aA	0,30 bA	66,25 aA	47,00 bA
		NA	12,83 aB	10,08 bB	12,25 aA	9,40 bB	0,33 aB	0,28 bA	53,50 aA	50,67 aA
'Cleópatra'	NI	A	8,45 aB	6,13 bB	8,50 aB	7,00 bB	0,24 aB	0,20 bB	16,25 aB	11,50 aB
		NA	11,15 aA	9,65 bA	14,00 aA	11,75 bA	0,31 aA	0,30 aA	47,25 aA	45,25 aA
	I	A	20,50 aA	12,20 bA	18,75 aA	13,75 bB	0,39 aA	0,29 bA	68,00 aA	50,00 aA
		NA	16,38 aB	11,33 bB	15,50 aB	15,25 aA	0,36 aB	0,30 bA	62,00 aA	48,25 aA
CV (%)			4,76		7,21		5,53		31,93	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Gm = *Gigaspora margarita*. NI - Não inoculado; I - Inoculado.

**A - Autoclavado; NA - Natural.

Observou-se que os benefícios promovidos por *G. margarita* foram maiores em substrato autoclavado do que no natural. Como o aumento proporcionado por *G. margarita* em substrato natural foi superior ao obtido com os fungos nativos, infere-se que, também nesta condição, houve bom estabelecimento de *G. margarita*, que apresentou poder competitivo diante dos endófitos nativos. Manjunath et al. (1983) e Oliveira & Jesus (1987) também observaram que a inoculação micorrízica de citros pode ser benéfica, mesmo em alguns solos não esterilizados.

Os maiores valores de altura e diâmetro do caule do limão 'Cravo' (17,23 cm e 3,6 mm, respectivamente) observados no tratamento autoclavado e inoculado com *G. margarita*, na ausência de *Pythium*, foram maiores do que

aqueles verificados por Fontanezzi (1989), trabalhando com este mesmo porta-enxerto na presença de *Glomus clarum* em solo esterilizado e adubado com 1280g de $P_2O_5\ m^{-3}$, 17,20 cm e 3,33 mm, respectivamente, aos 135 dias pós-semeadura. Em relação à tangerina 'Cleópatra', verificou-se que a maior altura e diâmetro do caule, respectivamente, 20,50 cm e 3,90 mm, no tratamento inoculado em substrato autoclavado sem patógeno, também foram superiores aos obtidos por este autor, 11,82 cm de altura e 2,61 mm de diâmetro do caule, nas condições citadas anteriormente, só que com adubação de 640 g de $P_2O_5\ m^{-3}$. Como o substrato deste experimento não recebeu adubação fosfatada e tinha um teor de P em torno de 8 mg dm^{-3} , considera-se que os resultados aqui encontrados foram satisfatórios. Pode-se inferir que a inoculação com *G. margarita* conferiu desenvolvimento à planta, reduzindo a exigência externa de adubação e que o fungo introduzido teve boa adaptação às condições do experimento.

O efeito negativo do patógeno sobre o crescimento vegetativo foi observado nos dois porta-enxertos, constatando-se diferenças significativas em quase todos os parâmetros avaliados. A percentagem de perdas das duas variedades, quando estava presente apenas *Pythium*, em relação à testemunha sem fungo micorrízico arbuscular e sem patógeno, foi de 9,02% na altura do limão 'Cravo', sendo mais expressiva em tangerina 'Cleópatra', 27,46%. Em relação ao número de folhas, observa-se que o limão 'Cravo' sofreu mais a ação do patógeno, apresentando perda de 33,33%, em comparação com 17,65% da tangerina 'Cleópatra'. Houve perda de 14,29 e 16,67 % em relação ao diâmetro e, em torno de 33,33 e 29,23%, na área foliar de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', respectivamente.

Na presença de *Pythium*, a altura média das mudas colonizadas por fungos nativos foi superior às das não micorrizadas, sendo este efeito maior quando se inoculou *G. margarita*. Em substrato autoclavado, também observou-se que plantas inoculadas com *G. margarita* apresentaram maior desenvolvimento. Assim, a micorrização não controlou o patógeno, mas reduziu sua severidade amenizando os efeitos nocivos, visto que, mesmo na presença de *Pythium*, as plantas micorrizadas apresentaram maior desenvolvimento do que as não micorrizadas, porém menor do que na ausência do mesmo.

O aumento médio da altura do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', na presença de *P. aphanidermatum* e de fungos nativos, em relação àquelas não micorrizadas, mas com presença de patógeno foram, respectivamente, 19,50 e 57,42%. Quando, além de *P. aphanidermatum* inoculou-se *G. margarita*, em substrato natural, houve aumento de 66,61 e 84,83%. Já em substrato autoclavado, a inoculação simultânea de *G. margarita* e *P. aphanidermatum* proporcionou incremento de 80,17 e 99,02%, em relação ao tratamento sem FMAs.

Quanto à área foliar, comparando-se ao tratamento em que apenas *P. aphanidermatum* estava presente, observou-se acréscimo de 875 e 293,48% em limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' respectivamente, quando *Pythium* foi inoculado em substrato natural; de 1167 e 319,57% quando ao substrato natural foi inoculado *G. margarita* e de 1075 e 339,57% quando *G. margarita* foi inoculada em substrato autoclavado.

Dessa forma, é possível observar que os porta-enxertos inoculados com *P. aphanidermatum*, apresentaram desenvolvimento reduzido, mas quando os FMAs estavam presentes, a expressão total dos efeitos do patógeno foi menor, ocorrendo tendência de proteção pelas micorrizas que promoveram maior desenvolvimento em todas as características. Considerar estas respostas é muito importante na produção de mudas, visto que, a redução do número de folhas e da área foliar, pode influenciar negativamente a capacidade fotossinteticamente ativa das plantas.

Com exceção do diâmetro do caule em substrato autoclavado e inoculado com *G. margarita* e *Pythium*, e da área foliar em substrato natural também, na presença destes dois fungos, os valores da tangerina 'Cleópatra' foram maiores do que os do limão 'Cravo', mesmo em solo sem FMAs. Provavelmente esse efeito ocorreu porque a tangerina 'Cleópatra' apresenta maior taxa de crescimento, ou por esta variedade ter apresentado maior adaptação às condições do experimento. Entretanto, em termos de benefício da micorrização, nota-se tendência do limão 'Cravo' obter maiores rendimentos percentuais na presença e mais perdas na ausência deste simbionte, assim, aparentemente, os FMAs foram mais eficiente para esse porta-enxerto.

Peso da matéria seca e comprimento radicular

As médias referentes à produção de matéria seca da planta e comprimento de raiz do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', aos 150 dias pós-semeadura, encontram-se na Tabela 2.

A fumigação do substrato influenciou os resultados. Na ausência de FMAs nativos e do patógeno ocorreu redução em torno de 60 e 44 % no peso da matéria seca da parte aérea de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', respectivamente; 36,67 e 20,34% no peso da matéria seca das raízes e de 33,95 e 22,62% no comprimento radicular.

Maiores danos foram observados quando inoculou-se o patógeno em substrato sem micorriza, sendo em torno de 100 e 165% no peso da matéria seca da parte aérea de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', respectivamente; 160 e 83% no peso da matéria seca das raízes e de 248 e 118% no comprimento radicular. Observou-se que, com a

eliminação dos fungos nativos e ausência de *G. margarita*, são reduzidos os organismos antagônicos ao patógeno presentes no substrato, havendo menor produção de matéria seca e comprimento radicular.

Nos tratamentos sem patógeno e sem FMAs nativos, o fungo *G. margarita* promoveu aumentos de 217,19 e 329 % no peso da matéria seca total de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', respectivamente; 500 e 476,19 % no peso da parte aérea; 150 e 108,51 % no peso seco da raiz e 103,93 e 35,36 % no comprimento das raízes.

Na presença do patógeno, verificou-se aumentos de 173,33 e 112,50%, no peso da matéria seca da planta para o limão 'Cravo' e a tangerina 'Cleópatra', respectivamente, cultivados em substrato natural sem *G. margarita*; de 236,67 e 157,50% quando estavam presentes *P. aphanidermatum* e *G. margarita* em substrato natural e de 303,33 e 297,50% quando se inocularam esses fungos em substrato autoclavado. Quando não se realizou esterilização ou quando *G. margarita* foi introduzido ao substrato, o efeito do patógeno foi reduzido e a muda apresentou melhor desenvolvimento.

Diante desses resultados, pode-se inferir que embora o patógeno tenha afetado negativamente o desenvolvimento das plantas nota-se que os FMAs compensaram os efeitos deletérios do patógeno, resultando em maior desenvolvimento das plantas. Este efeito pode ser devido ao aumento da área de absorção radicular pelo micélio externo do fungo micorrízico.

Baath & Hayman (1983), trabalhando com tomateiros inoculados com *Verticillium albo atrum*, observaram reduzida colonização micorrízica nas raízes e que os danos causados pelo patógeno diminuí a eficiência fotossintética, reduzindo, assim, o transporte de fotoassimilados para as raízes, ocasionando menor crescimento das plantas inoculadas com FMAs.

As reduções na parte aérea de plantas infectadas por *P. aphanidermatum* podem ser consequências das alterações no sistema radicular, que apresentaram menor capacidade exploratória, diminuindo a absorção e a translocação de nutrientes.

Tabela 2. Influência da inoculação com *Pythium aphanidermatum* e/ou *Gigaspora margarita* sobre o peso da matéria seca e comprimento radicular dos porta-enxertos limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', em substrato natural ou autoclavado (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA, 1999).

Tratamentos			Peso da matéria seca (g)						Comprimento radicular (cm)	
Variedades	Gm*	Solo**	Total		Parte aérea		Raiz			
			<i>Pythium aphanidermatum</i>							
			NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
'Cravo'	NI	A	0,64 aB	0,30 bB	0,18 aB	0,15 aA	0,38 aA	0,15 aA	212,28 aA	82,29 aB
		NA	1,05 aA	0,82 aA	0,45 aA	0,30 bA	0,60 aA	0,39 aA	321,41 aA	286,22 aA
	I	A	2,03 aA	1,21 bA	1,08 aA	0,40 bA	0,95 aA	0,74 aA	432,91 aA	352,61 aA
		NA	1,68 aB	1,01 bA	0,82 aB	0,40 bA	0,86 aA	0,56 bA	411,05 aA	323,79 aA
	NI	A	0,79 aB	0,40 bB	0,42 aB	0,17 bB	0,47 aA	0,29 aA	254,24 aA	132,50 aB
		NA	1,34 aA	0,85 bA	0,75 aA	0,45 bA	0,59 aA	0,53 aA	328,56 aA	288,41 aA
'Cleópatra'	I	A	3,39 aA	1,59 bA	2,42 aA	0,85 bA	0,98 aA	0,81 aA	435,90 aA	378,98 aA
		NA	2,03 aB	1,03 bB	1,15 aB	0,47 bB	0,88 aA	0,61 bA	386,00 aA	328,96 aA
CV (%)			18,33		15,97		34,75		31,93	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Gm = *Gigaspora margarita*. NI - Não inoculado; I - Inoculado.

**A - Autoclavado; NA - Natural.

Segundo Pereira (1994), o menor crescimento das plantas não micorrizadas pode dificultar a detecção do efeito do patógeno. Entretanto, verifica-se também nesta condição tendência das mudas em apresentarem redução no crescimento da parte aérea e raízes, em presença do patógeno.

Os dois porta-enxertos de citros foram dependentes das micorrizas para crescimento, porém os aumentos percentuais decorrentes da micorrização foram maiores no limão 'Cravo'. Estes dados contradizem os resultados obtidos por Fontanezzi (1989), nos quais a tangerina 'Cleópatra' mostrou-se mais dependente da micorriza do que o limão 'Cravo' e estão de acordo com aqueles encontrados por Nemeček (1978), que observou maior dependência do limão 'Cravo'.

Vários autores já observaram que diferentes porta-enxertos variam na sua dependência micorrízica (Kleinschmidt & Gerdemann, 1972; Menge et al., 1978). Segundo Menge et al. (1978), o efeito das micorrizas sobre diferentes espécies de citros pode variar com as condições de fertilidade do substrato. Para Tinker (1978), outros fatores que determinam a infectividade e efetividade dos fungos micorrízicos podem estar envolvidos.

Observou-se que o patógeno influenciou as variedades. Limão 'Cravo' sofreu perda de 60,53 e 61,24 %, respectivamente, no peso da matéria seca e comprimento de raízes, enquanto que em tangerina 'Cleópatra', estas perdas foram de 38,30 e 47,88%, respectivamente, podendo-se dizer que o sistema radicular do limão 'Cravo' foi mais afetado por *P. aphanidermatum* do que o da tangerina 'Cleópatra', como também observado por Garcia (1988) e Garcia & Carvalho et al. (1988).

Portanto, o substrato empregado na sementeira do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra' deverá conter FMAs ou deve-se proceder à inoculação das mudas com estes fungos, o que poderá resultar em plantas com sistema radicular mais desenvolvido, seja nas formas de radículas ou micorrizas, e, com isso, maior eficiência na absorção de água e nutrientes, maior tolerância ao estresse de transplantio e a patógenos, reduzindo o uso de adubos e pesticidas químicos.

CONCLUSÕES

1. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nativos e *Gigaspora margarita* promoveram benefícios acentuados para o desenvolvimento dos porta-enxertos limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'.

2. A presença do fungo fitopatogênico *Pythium aphanidermatum*, mesmo em condições de pós-emergência, reduziu o desenvolvimento das mudas cítricas. Limão 'Cravo' foi o porta-enxerto mais suscetível ao patógeno.

3. A micorrização não impediu, mas reduziu a ação de *P. aphanidermatum*, compensando parcialmente os efeitos deletérios deste fungo.

4. A tangerina 'Cleópatra' apresentou maior resposta em quase todas as características analisadas, na presença ou ausência do patógeno e do simbionte, demonstrando ser adequada para diversificação de porta-enxerto como alternativa ao limão 'Cravo'.

REFERÊNCIAS

ST-ARNAUD M.; HAMEL C.; CARON M.; FORTIN J.A. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhiza *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.16, n.3, p.187-194, 1994.

BAATH, E.; HAYMAN, D. S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza XVI. Interactions with *Verticillium wilt* on tomato plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 95, p. 419-426, 1983.

BRUNDRETT, M.; JUNIPER, S. Non-destructive assessment of spore germination of VAM fungi and production of pot cultures from single spores. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.1, p.85-91, 1995.

CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J. M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. **Plant and Soil**, v. 148, n. 1, p. 1-6, 1993.

- CAMARGO, I. P. **Efeitos de doses, fontes de fósforo e de fungos micorrízicos sobre o limoeiro 'Cravo' até a repicagem.** 1989, 104f. Dissertação (Mestrado). ESAL, Lavras.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P. D. da; OLIVEIRA, M. H. A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículoarbusculares em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n.1, p.25-30, 1986.
- DAVIS, R. M.; MENGE, J. A. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.5, p.447-452, 1980.
- EYER, R.; SUNDARAJU, P. Interactions of VA. mycorrhiza with *Meloidogyne incognita* and *Pythium aphanidermatum* affecting ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Plantation-Crops**, India, v.21, n.1, p.30-34, 1993.
- FONSECA, E. B. A.; OLIVEIRA, E. de; SOUZA, M. de; CARVALHO, J. G. de. Efeitos do fósforo e um fungo MVA na nutrição de dois porta-enxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.12, p.1889-1896, 1994.
- FONTANEZZI, G. B. S. **Efeitos de micorriza vesicular arbuscular e de superfosfato simples no crescimento e nutrição de porta enxertos de citros.** 1989, 105f. Dissertação (Mestrado) ESAL, Lavras.
- FONTES, E. M. G. Controle biológico: um desafio para o País. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.27, p.1-4, 1992. (Edição especial).
- GARCIA, J.; CARVALHO, I. Comportamento de três cultivares porta-enxerto de citros em relação a *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 10, n. 3, p. 21-24, 1988.
- GARCIA, J.; CARVALHO, J. de. Colonização de radículas de cultivares cítricos porta-enxerto por *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 10, n. 3, p. 17-19, 1988.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, London, v.46, n.2, p.235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, p.489-500, 1980.
- GUILLEMIN, J. P.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARSHAL, J. Contribution of arbuscular mycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands, **Agricultural Science in Finland**, v.3, p.241-251, 1994.
- HEDGE, S. V.; RAI, P. V. Influence of *Glomus fasciculatum* on damping-off of tomato. **Current science**, Middletown, v.53, p.588-589, 1984.
- HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. R. **Propagação de plantas frutíferas.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1996, 318p.
- KLEINSCHMIDT, G. D.; GERDEMANN, J. W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, n.12, p.1447-1453, 1972.
- MANJUNATH, A. O.; MOHAN, R.; BAGYARAJ, D. J. Response of citrus to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation in unsterile soils. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, n. 10, p. 2729-2732, 1983.
- MENGE, J. A.; JOHNSON, E. L. V.; PLATT, R. G. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient

regimes. **New Phytologist**, Oxford, v.81, n.4, p.553-559, 1978.

NEMEC, S. Response of six citrus rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Delan, v.91, p.10-14, 1978.

NEWMAN, E. I. A method of estimating the total length of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 3, n. 2, p.139-145, 1966.

OLIVEIRA, A. A. R.; JESUS, I. S. Efeito da infecção por fungos micorrízicos vesicular-arbusculares sobre o desenvolvimento de porta-enxertos de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1987, Campinas. **Anais....** Campinas: SBF, 1987, v. 1, p.319-325.

PACIONI, G. Wet-sieving and decanting technique for the extraction of spores of vesicular-arbuscular fungi. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. (Eds.) **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 1992, p.317-322.

PEREIRA, L. A. A. **Desenvolvimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) na presença de *Gigaspora margarita* Becker & Hall e *Rhizoctonia solani*, Kuhn. L.** 1994, 61f. Dissertação (Mestrado) UFLA, Lavras.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 55, n. 1, p.158-161, 1970.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301 p.

ROSSETTI, V. Doenças de citros. RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A.(Eds.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, v. 2, p. 668-714, 1991.

SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. (Eds.). **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, p. 257-282.

SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares. In: ARAÚJO, O. R. S.; HUNGRIA, M. **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA/CNPAP, 1994, p.151-194. (Documento, 44).

SMITH, S. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo alto, v. 39, p. 221-244, 1988.

TINKER, P. B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. **Physiologie vegetale**, Paris, v.16, n.4, p.743-751, 1978.

WEBER, O. B.; OLIVEIRA, A. A. R.; MAGALHÃES, A. F. de J. Adubação orgânica e inoculação com *Glomus etunicatum* em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 321-326, 1990.

ZAMBOLIM, L. Potencial dos fungos micorrízicos vesículo-arbuscular no controle de fitopatógenos e implicação com a nutrição fosfatada. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa/CNPDA, 1991, p. 87-120. (Documento, 15).

ZAMBOLIM, L.; SIQUEIRA, J. O. **Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1985, 36 p. (Documentos, 26).