

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESICULAR-ARBUSCULARES (FMVAs) E SUA APLICAÇÃO EM SISTEMAS DE POLYCULTIVO

F. Feldmann¹, I. Müller¹, J. Weritz², J.L.V. Macedo³, E. Idczak¹

¹Universitat Hamburg, Institut für Angewandte Botanik, Hamburg, Germany

²Biologische Bundesanstalt, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Braunschweig, Germany

³CPAA/EMBRAPA, AM, Brazil

RESUMO

A introdução de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares (FMVAs) em sistemas agrícolas favorece o crescimento e a vigor das culturas, especialmente em áreas abandonadas de solos pobres. Como um pré-requisito para aplicação dos simbioses, os fungos devem ser isolados e selecionados levando em consideração a sua eficiência para as plantas e sua adaptabilidade às condições ambientais no campo. São descritos os diferentes métodos de isolamento e o processo de seleção. A produção, em grande escala, do fungo selecionado pode ser feita em casa-de-vegetação ou diretamente no campo. A inoculação das plantas com o FMVAs é possível tanto em viveiros como no campo. Dois métodos de aplicação são apresentados: inoculação das plantas com uma mistura homogênea de inóculo no substrato e com uma camada concentrada de inóculo, respectivamente.

INTRODUÇÃO

Nos habitats tropicais, o benefício dos fungos micorrízicos vesicular-arbusculares (FMVAs) para suas plantas hospedeiras é de especial importância. O fornecimento mais eficiente de nutrientes pelos fungos determina maior crescimento das plantas nos solos pobres dos trópicos (Sieverding 1987; Lin 1986). Além disso, a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos aumenta a resistência das plantas hospedeira a patógenos das raízes (Zambolim 1986) e reduz a severidade de doenças de folhas (Feldmann 1991). A tolerância de plantas micorrizadas a "stress" (ex: temperaturas externas, umidade alta ou baixa e transplantio) geralmente é maior do que nas plantas não micorrizadas (Schonbeck 1987; Müller 1991). Nos sistemas agrícolas têm sido observada alta deficiência de fungos simbioses (Feldmann 1991). Para recuperar a "vitalidade do solo" em relação a FMVAs, é necessário a aplicação de fungos na época da semeadura ou do plantio no campo ou em viveiro. Em Manaus-AM, instalou-se um sistema de policultivo de plantas perenes cujo manejo leva em consideração as exigências dos fungos (menos fertilizantes, menos pesticidas e mais vegetação secundária). A plantação foi estabelecida em uma área abandonada (anteriormente era um plantio de

seringueira). Para melhorar o "fitness ecológico" das plantas, estas foram inoculadas com FMVAs no viveiro ou na época de plantio, no campo.

Até o momento, o uso de FMVAs em sistemas de produção agrícola não é uma prática comum devido, principalmente, as dificuldades envolvidas no isolamento, seleção, multiplicação e aplicação dos FMVAs. O objetivo deste trabalho é demonstrar os métodos que envolvem desde o primeiro passo de isolamento dos fungos micorrízicos até o passo final de aplicação nos viveiros e no campo.

ISOLAMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESICULAR-ARBUSCULARES

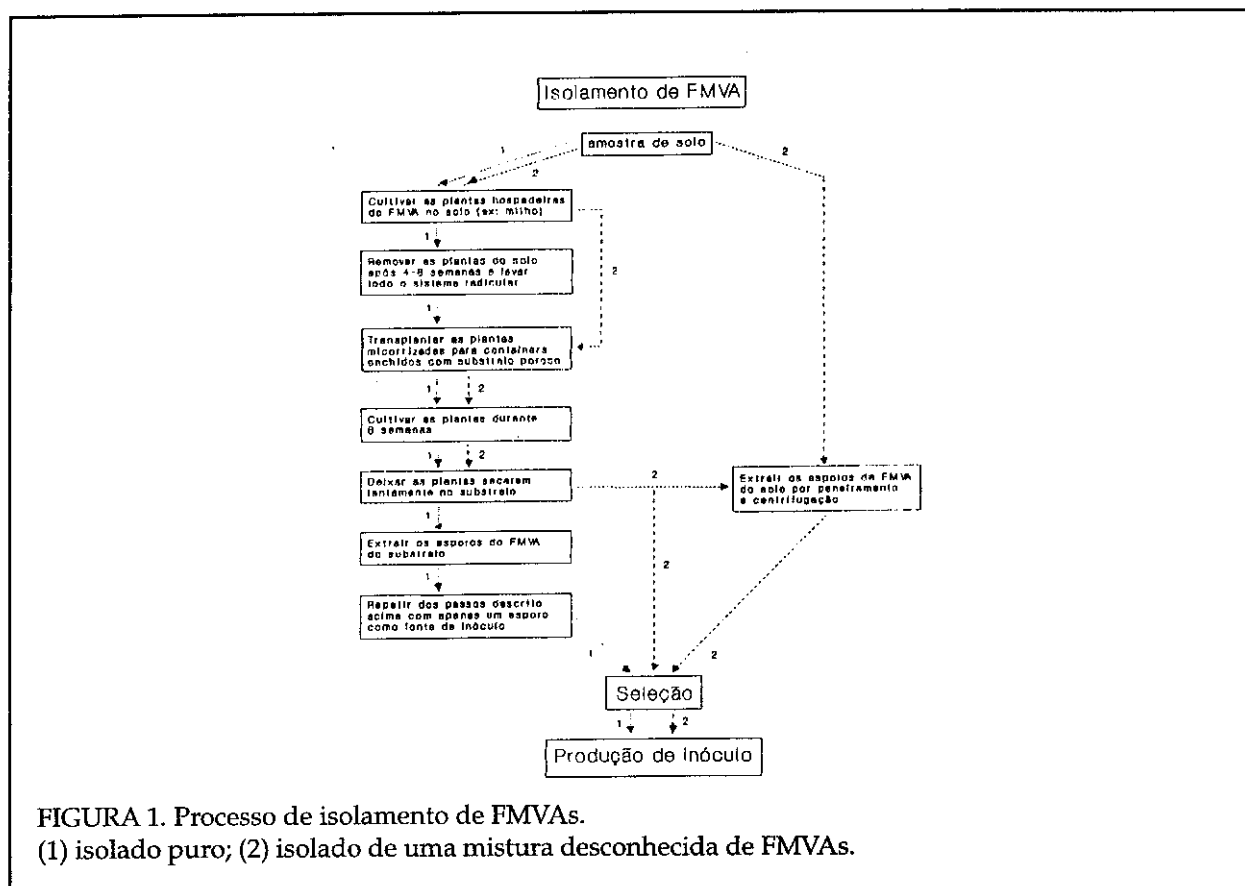
Os FMVAs podem ser usados na forma de:

- isolados puros, derivados de culturas monospóricas, ou polispóricas de uma espécie fúngica
- uma mistura de definidos isolados puros
- uma mistura de espécies de FMVAs desconhecidas com estabilidade comprovada da população e de seus efeitos.

O estabelecimento de isolados puros (I) e de isolados de uma mistura desconhecida de FMVAs

(2) é mostrado na Figura 1. Em ambos os casos, os fungos originaram-se de solos do campo. Além dos esporos vivos de FMVAs, o solo de campo freqüentemente contém grande número de esporos mortos de fungos micorrizicos. Como consome-se muito tempo para se estabelecer isolados monospóricos diretamente das amostras originais do campo, preferiu-se aumentar o número de esporos vivos cultivando uma planta hospedeira (ex: milho, cebola, pimentão) no solo. Isso facilita a propagação dos fungos no substrato. Uma desvantagem desse método de aumentar o número de esporos vivos de FMVAs é a possibilidade da pré-seleção de fungos que sejam mais adaptados a determinadas condições de crescimento. Para minimizar essa pré-seleção, recomenda-se o uso de diferentes espécies de plantas em diferentes condições de crescimento. Quatro a oito semanas, após o semeio ou plantio, as raízes das plantas estarão colonizadas pelos FMVAs. Para o estabelecimento de isolados puros, as plantas devem ser removidas do substrato e as raízes, totalmente enxaguadas. Para evitar a contaminação com patógenos de raízes, recomenda-se desinfetar as superfícies (ex: com etanol). As plantas são transplantadas para sacos de plástico ou outros

recipientes tais como: vasos ou caixas contendo um substrato poroso. Elas são irrigadas moderadamente e adubadas uma vez por semana, com um fertilizante com baixo teor de fósforo ($P < 60$ ppm). Após um período de crescimento de oito semanas, as plantas não são mais irrigadas, induzindo a produção de esporos dos FMVAs. Os esporos devem ser removidos do substrato pelo método de peneiramento úmido e centrifugação (Daniels and Skipper 1984; Feldmann 1991). Para estabelecer culturas puras, o processo descrito é repetido com um único esporo de fonte de inóculo (isolado monospórico) ou com diversos esporos da mesma espécie fúngica (isolado polospórico), o que freqüentemente é problemático porque é difícil determinar se esporos similares pertencem à mesma espécie. Para a produção de um isolado de FMVAs, contendo uma mistura desconhecida de espécies de FMVAs (2), diversos passos do processo descrito anteriormente podem ser omitidos (ver Figure 1). Além disso, é possível extrair os esporos de FMVAs diretamente do solo do campo e usá-los como inóculo primário. Esse método diminuirá a contaminação com patógenos, que podem estar presentes no solo.



Antes de se estabelecer que os isolados de FMVAs podem ser usados em viveiros ou em uma escala agrícola, eles devem ser selecionados com relação as suas efetividades.

SELEÇÃO DE ISOLADOS EFETIVOS DE FMVAS

Apesar de os FMVAs estarem distribuídos em todo o mundo e da maioria das espécies de plantas viverem em simbiose com esses fungos, existe uma especificidade na interação entre fungos e plantas hospedeiras (Estaún *et al.* 1987; Graw *et al.* 1979; Idczak 1992). A especificidade é revelada em relação a:

- planta hospedeira (espécies de plantas / cultivar da planta)
- natureza do efeito (o qual depende também das condições ambientais).

Portanto, é necessária a seleção de isolados efetivos de FMVAs.

PROCESSO DE SELEÇÃO:

Listar:

- * a natureza dos efeito(s) desejado(s) (ex: aumento do crescimento da planta, aumento da resistência a patógenos etc),
- * os fatores abióticos, que durante a seleção devem ser semelhantes às condições nas quais os fungos deverão ser usados (substrato, temperatura, pH etc).
- Asegurar a infectividade do inóculo fúngico, testando-a (checar se uma planta hospedeira potencial, ex: milho, é colonizado por fungos).
- Determinar se a planta, para a qual o isolado fúngico está sendo selecionado, é micotrófica (Janos 1987; Feldmann 1991), isto é, testar se os FMVAs são capazes de colonizar as raízes e se as plantas micorrizadas estão sendo beneficiadas pela simbiose.
- Se a planta é micotrófica, analisar o grau de dependência micorrízica (dependência facultativa ou obrigatória, Feldmann 1991).

- Determinar, novamente, os fatores abióticos de seleção, considerando o grau de dependência, as condições na área onde os fungos serão usados e o tipo de manejo.
- Comparar a efetividade dos isolados com respeito ao efeito desejado.

Em adição aos passos descritos na seleção de isolados efetivos de FMVAs, há outros fatores que devem ser considerados durante o processo de seleção, tais como a habilidade competitiva e a persistência dos fungos sob as condições naturais (Abbot *et al.* 1992). Após a escolha dos isolados dos FMVAs, a produção de inóculo em grande escala é um pré-requisito para aplicação em viveiro ou no campo.

PRODUÇÃO DO INÓCULO

Uma descrição detalhada da produção de inóculo de FMVA a ser usada nos trópicos, tem sido apresentado por Feldmann and Idczak (1992). Dessa forma, são descritos apenas os principais aspectos da produção de inóculo.

A produção de inóculo pode ser diferenciada entre uma fase inicial (Figure 2) e a produção massal (Figure 3).

Fase inicial:

- Encher dois terços de um vaso (cerca de 500 ml) com areia quartzosa e uma camada de inóculo primário (solo contendo os FMVAs, pedaços de raízes infectadas ou esporos fúngicos) no topo.
- Desinfectar superficialmente as sementes de uma planta hospedeira (ex: milho), enxagüá-las com água para remover todos pesticidas, semeá-las no vaso e cobrí-las com areia.
- Irrigar os vasos moderadamente (a umidade do substrato deverá ficar um pouco abaixo da capacidade de campo) e adubar as plantas com fertilizante com baixo teor de fósforo (P < 60 ppm, para detalhes ver Feldmann and Idczak 1992). Evitar o uso de pesticidas.
- Após um período de crescimento de três a quatro semanas, as raízes da planta

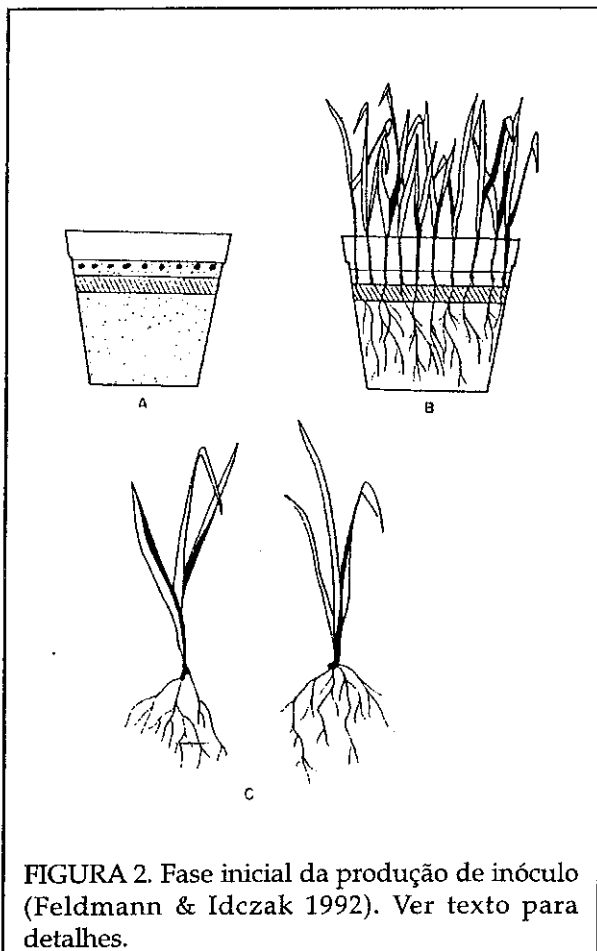


FIGURA 2. Fase inicial da produção de inóculo (Feldmann & Idczak 1992). Ver texto para detalhes.

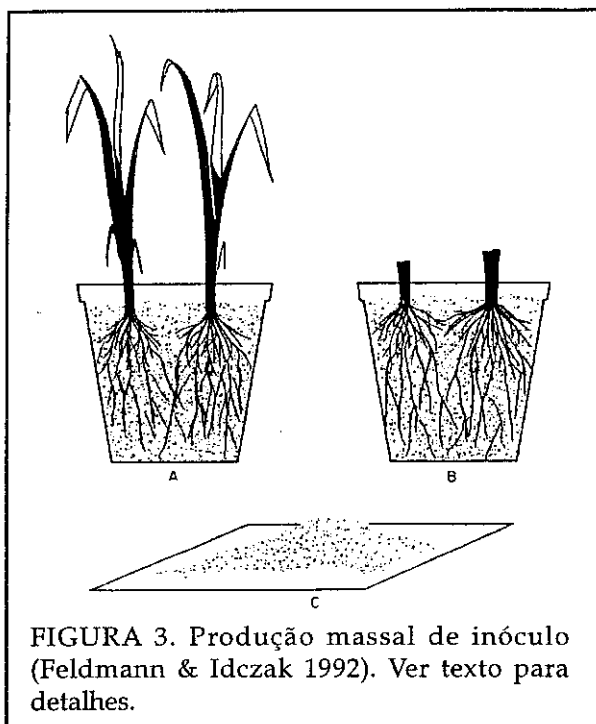


FIGURA 3. Produção massal de inóculo (Feldmann & Idczak 1992). Ver texto para detalhes.

hospedeira deverão estar colonizadas pelos FMVAs. Controlar a colonização das raízes por meio de um microscópio. No caso de baixa infectividade do inóculo primário o período de cultivo pode ser estendido por uma ou duas semanas.

- Quando as raízes da planta hospedeira estiverem bem colonizadas, separar as plantas e lavar as raízes. Algumas vezes pode ser que haja necessidade de desinfetar a superfície das raízes (etanol 70%, 2 min.) para eliminar fitopatógenos.
- As plantas tratadas desse modo são usadas para produção massal de inóculo FMVAs.

Produção massal:

- As plantas micorrizadas são transplantadas para vasos maiores (volume com cerca de 5 l) ou containers semelhantes, os quais podem ser maiores mas que permitam a exploração de todo o volume do solo, pelas raízes. O uso de argila expandida, como substrato, (método descrito por Dehne and Backhaus 1986) tem várias vantagens, tais como: baixo peso, fácil aplicação e o fato de que a contaminação por patógenos pode ser facilmente evitada e também seja possível uma descontaminação subsequente. Outros substratos, como solos arenosos esterilizados, podem também ser usados.
- Irrigação e adubação devem ser executadas conforme descrito na fase inicial.
- Após três a quatro meses de crescimento das plantas, as raízes deverão ocupar o volume inteiro do container. A partir desse momento, suspende-se as irrigações. O stress da seca estimula a produção de esporos de FMVAs. Uma semana após o término da irrigação, as plantas são cortadas e os VASOS com as raízes são mantidos secos, durante duas semanas. Após este período, remove-se as raízes do substrato.
- O substrato é espalhado em camada fina e rapidamente seco ao ar. O inóculo seco deve ser armazenado sob condições seca e fria, por mais de um ano.

Alternativamente ao processo de produção de inóculo descrito acima, a multiplicação de FMVAs pode ser feita diretamente no campo (produção "in situ"). Feldmann (1991) relata que a inoculação de plantas hospedeiras (ex: milho) com FMVAs no campo, na época da sementeira ou do plantio, resulta em um aumento do número de esporos de FMVAs em torno de 4 a 57 esporos/g de solo, após dois meses.

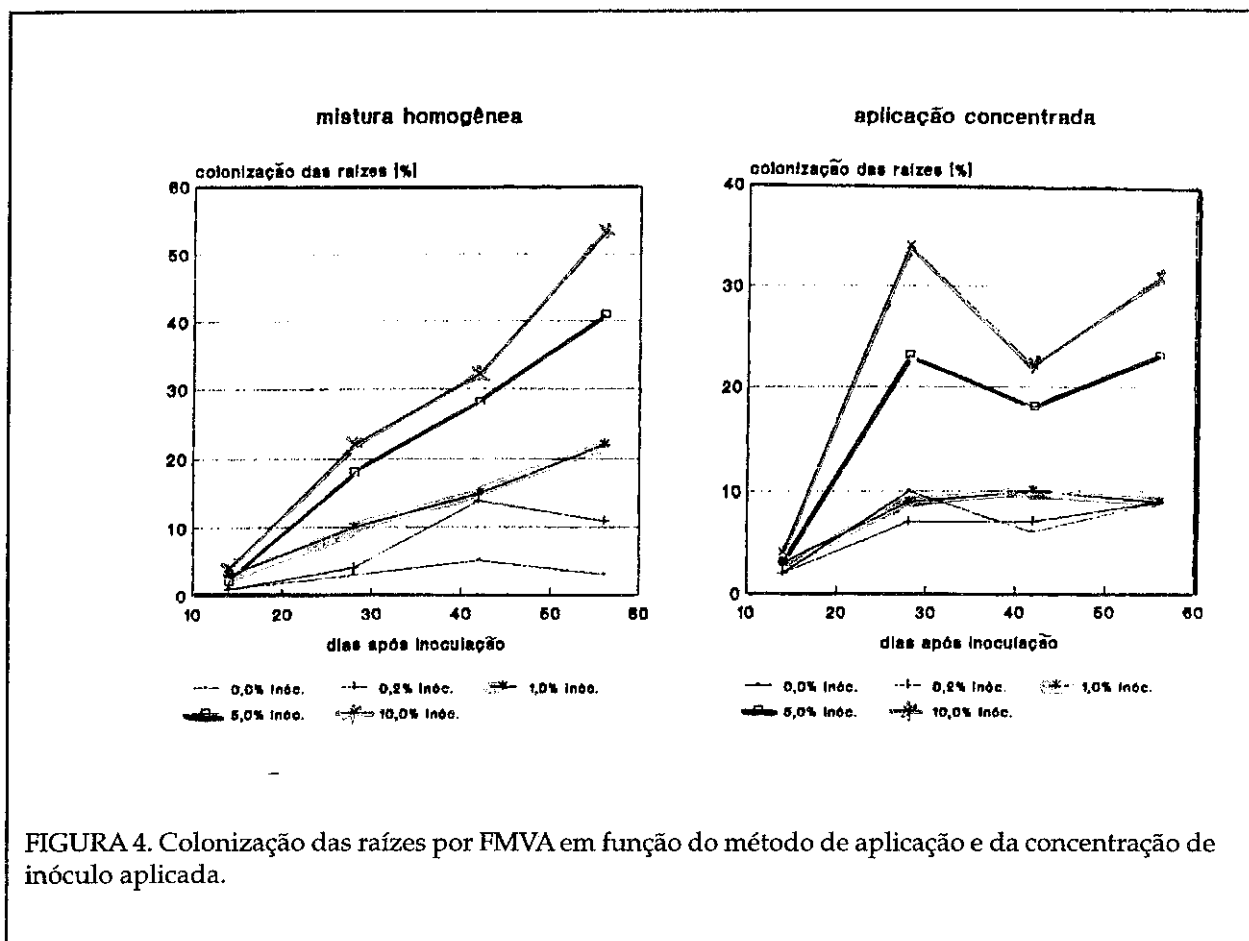
APLICAÇÃO DE INÓCULO DE FMVA

A inoculação de plantas com fungos micorrízicos pode ser feita de diversos modos:

- O inóculo fúngico pode ser misturado de forma homogênea com o substrato de crescimento das plantas.
- Uma camada concentrada de inóculo pode ser colocada abaixo das sementes ou das raízes das plantas.

O método de inoculação e a quantidade de inóculo aplicado (0; 0,2; 1,0; 5,0 e 10% vol.) determinam o desenvolvimento da associação micorrízica (Figure 4).

O maior índice de colonização das raízes de mudas de seringueira (*Hevea* sp.) é conseguido usando mais de 1% (v/v) de inóculo no substrato. A distribuição homogênea do inóculo leva a um maior grau de colonização das raízes, quando comparado com o método de "aplicação concentrada", embora uma porcentagem maior de colonização das raízes seja conseguido com o último método, durante os estágios iniciais de desenvolvimento da simbiose. Isso provavelmente seja devido ao fato de que no caso da "aplicação concentrada", as raízes de uma muda contactem um grande número de unidades de infecção, quando crescem através da camada de inóculo. Neste momento, ocorre uma infecção pesada no sistema radicular. Após as raízes atravessarem a camada de inóculo, não existem mais unidades de infecção de



FMVAs. O fungo tem que se sepalhar por todo o sistema radicular, a partir do sitio dos pontos de infecção primária. No caso da distribuição homogênea do inóculo fúngico, são possíveis novas infecções nas raízes pelo fungo, mesmo após um longo período de desenvolvimento do sistema radicular. Por essa razão, recomenda-se aplicar o inóculo na forma de mistura homogênea, mas a "aplicação concentrada" também tem sido bem sucedida no campo.

O USO DE FMVAs EM SISTEMAS DE POLICULTIVO

A introdução de FMVAs em sistemas agrícolas como um fator de manejo é simples. Se o isolamento, a seleção e a produção do inóculo primário são efetuados por institutos oficiais ou companhias especializadas, o produtor tem que multiplicar o inóculo em grande escala. Isso pode ser feito em containers contendo areia ou solo poroso esterilizado. O inóculo produzido é usado para inoculação das plantas no viveiro, misturado de forma homogênea com o substrato. Nessa situação, as plantas já estarão micorrizadas quando então serão transplantadas para o campo. Isso será benéfico para as plantas durante a primeira fase crítica de adaptação às novas condições de ambiente.

Se o agricultor desejar inocular plantas perenes não micorrizadas que já estão no campo, deverá usar "plantas governantes". Isso significa que deverá semear ou plantar espécies que freqüentemente são usadas na produção de inóculo (ex: milho), próximo das plantas perenes e inoculadas com FMVAs. As "plantas governantes" multiplicarão o inóculo de FMVAs no solo, e as raízes dessas plantas micorrizadas crescerão próximo às raízes das plantas perenes e, assim, inoculá-las. Se o manejo no plantio for feito de acordo com as exigências de FMVAs (menos fertilizantes e pesticidas e mais vegetação secundária), os fungos poderão se estabelecer no campo.

REFERÊNCIAS

Abbot, L.K.; Robson, A.D. and Gazey, C. (1992). Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Norris, J.R.; Read, D.J. and Varma, A.K. (eds.): *Methods in Microbiology*, Volume 24, Academic Press, London, pp 1-21.

Daniels, B.A. and Skipper, H.D. (1984). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck, N.C. (ed.): *Methods and principles of mycorrhizal research*. Am. Phytopath. Soc., St. Paul, MI, USA, pp 29-35.

Dehne, H.W. and Backhaus, G.S. (1986). The use of VAM in plant production 1. Inoculum production. *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 93:415-424.

Estaún, V.; Calvet, C. and Hayman, D.S. (1987). Influence of plant genotype on mycorrhizal infection: response of three pea cultivars. *Plant and Soil* 103:295-298.

Graw, D.; Moawad, M. and Rehm, S. (1979). Host specificity and the effectiveness of VA-mycorrhiza. *Z. für Acker- und Pflanzenbau* 148 (2):85-98.

Feldmann, F. (1991). Die Mykorrhiza des Kautschukbaumes *Hevea spec.* Muell. Arg.: Vorkommen am Naturstandort und in Plantagen, Wirkung auf das Resistenzverhalten, Nutzung im Plantagenbau. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 148 pp.

Feldmann, F. and Idczak, E. (1992). Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In: Norris, J.R.; Read, D.J. and Varma, A.K. (eds.): *Methods in Microbiology*, Volume 24, Academic Press, London, pp 339-357

Idczak, E. (1992). Wechselwirkung zwischen VA-Mykorrhizapilzen und Nutzpflanzen: Isolat- und Sortenspezifität, Biochemie und Physiologie der Wurzel, Pathogenabwehr. Dissertation, Universität Hamburg, 142 pp.

Janos, D.P. (1987). VA mycorrhizas in humid tropical ecosystems. In: Safir, G.R. (ed.): *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 107-134.

Lin, M.T. (1986). Uso de micorrizas em fruticultura. *Rev. Bras. Frutic.* (Cruz das Almas, BA) 8(3):47-55.

Sieverding, E. (1987). On farm production of VAM inoculum. In: Sylvia, D.M.; Hung, L.L. and Graham, J.H.: *Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae (NACOM)*, Gainesville, Florida, p 284.