



Instituto Politécnico Viana do Castelo
Escola Superior Agrária de Ponte de Lima

**O papel das micorrizas no modo de produção
biológico da alface (*Lactuca sativa* L.)**

Dissertação

Mestrado em Agricultura Biológica

Áurea Margarete do Nascimento Câmara Sampaio

Ponte de Lima, Fevereiro 2012



Instituto Politécnico Viana do Castelo
Escola Superior Agrária de Ponte de Lima

**O papel das micorrizas no modo de produção
biológico da alface (*Lactuca sativa* L.)**

Dissertação

Mestrado em Agricultura Biológica

Áurea Margarete do Nascimento Câmara Sampaio

Orientador: Professor Doutor Luís Miguel Cortêz Mesquita de Brito

Co-Orientador: Professora Doutora Maria Teresa Gonçalves

Ponte de Lima, Fevereiro 2012

As doutrinas expressas neste
trabalho são da exclusiva
responsabilidade do autor

Com o meu amor
para os meus doces filhos Miguel e Margarida,
para a minha encantadora irmã Nelma,
para ti Ruisinho, o homem mais lindo e mágico do universo.

ÍNDICE

Índice	i
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de abreviaturas	vii
Lista de quadros.....	x
Lista de figuras	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A agricultura biológica e a agricultura convencional	1
1.2 A fertilidade do solo em agricultura biológica	2
1.2.1 A agricultura biológica e a actividade biológica do solo.....	2
1.2.2 Técnicas de agricultura biológica	3
1.3 A influência da matéria orgânica na qualidade do solo.....	4
1.4 A mineralização da matéria orgânica e a disponibilidade de nutrientes.....	6
1.5 A cultura da alface.....	8
1.5.1 Caracterização.....	8
1.5.2 Fertilização	9
1.6 As micorrizas.....	10
1.6.1 Biologia e desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares	11
1.6.1 Influências das condições edafo-climáticas na micorrização	12
1.6.2 As micorrizas arbusculares e a nutrição das culturas	14
1.6.2.1 O papel das micorrizas na absorção de N	15
1.6.2.2 O papel das micorrizas na absorção de P.....	16
1.6.2.3 O papel das micorrizas na absorção de outros nutrientes	17

1.6.2.4 As micorrizas arbusculares e a fertilização da alface	18
1.6.3 Outros benefícios resultantes da colonização micorrízica.....	19
1.6.3.1 O micélio extrarradicular e interacções no solo.....	19
1.6.3.2 Sanidade das culturas	20
1.7 Objectivos do trabalho.....	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional	22
2.1.1 Solos	23
2.1.1.1 Solo da exploração no modo de produção biológico	23
2.1.1.2 Solo da exploração no modo de produção convencional.....	24
2.1.2 Adubo	24
2.1.3 Alfases	25
2.1.4 Rega	25
2.1.5 Monitorização da temperatura	25
2.1.6 Controlo de infestantes e cuidados fitossanitários.	25
2.1.7 Análises laboratoriais.....	26
2.1.7.1 Caracterização físico-química dos solos.....	26
2.1.7.2 Análise das características do adubo.....	28
2.1.7.3 Análise das características da alface	29
2.1.7.4 Avaliação da colonização micorrízica nas raízes da alface	30
2.1.8 Análise estatística	32
2.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa	32
2.2.1 Solo	33
2.2.2 Adubo	33
2.2.3 Alfases	34
2.2.4 Inóculo micorrízico.....	34

2.2.5 Rega	35
2.2.6 Monitorização da temperatura	35
2.2.7 Controlo de infestantes e cuidados fitossanitários.....	35
2.2.8 Análises laboratoriais.....	35
2.2.8.1 Caracterização físico-química do solo	35
2.2.8.2 Análise das características da alface	35
2.2.9 Análise estatística	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional	37
3.1.1 Temperatura do ar, características dos solos e do adubo orgânico.....	37
3.1.2 Peso fresco e peso seco da alface	38
3.1.3 Colonização micorrízica das raízes da alface	41
3.1.4 Teor de nutrientes nas folhas e nas raízes da alface	43
3.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa	45
3.2.1 Temperatura do ar e características do solo.....	45
3.2.2 Peso fresco e peso seco da alface	46
3.2.3 Teor de nutrientes nas folhas e nas raízes da alface	49
4. DISCUSSÃO	52
4.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional	52
4.1.1 Peso fresco e peso seco da alface	52
4.1.2 Colonização micorrízica das raízes da alface	53
4.1.3 Teor de nutrientes da alface	53
4.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa	54
5. CONCLUSÕES	55
6. BIBLIOGRAFIA	56

AGRADECIMENTOS

É com amizade e admiração que expresso aqui a minha profunda gratidão ao Professor Miguel Brito pela sua disponibilidade, rigor e motivação ao longo da elaboração da tese. Agradeço também a dedicação e o excelente trabalho da Professora Isabel Mourão e da sua equipa de coordenação do mestrado bem como a união e a partilha que senti dos meus colegas de mestrado.

À Professora Teresa Gonçalves agradeço a sua disponibilidade e dedicação na co-orientação da tese assim como o apoio da Dr^a Lurdes Barrico durante a realização do trabalho laboratorial no Departamento de Botânica da FCT da Universidade de Coimbra.

Ao Engenheiro Virgílio Peixoto agradeço a sua ajuda e prestabilidade nas análises laboratoriais na ESA de Ponte de Lima, assim como à Professora Fernanda Delgado, ao Professor João Pedro da Luz e às equipas do laboratório do departamento de solos e da quinta da ESA de Castelo Branco por toda a colaboração, durante a realização dos ensaios experimentais, e pela forma acolhedora com que me receberam.

À Nanda e ao António Joaquim agradeço com carinho e amizade toda a ajuda que me deram durante o mestrado.

Aos meus queridos pais a minha gratidão pelo seu apoio incondicional e aos meus irmãos e amigos pelas palavras de força e motivação.

Obrigada Miguel por acreditares.

Obrigada Margarida pela tua paz.

Obrigada Ruisinho pela tua luz e alegria em cada recomeçar durante a tese.

RESUMO

Neste estudo realizaram-se dois ensaios experimentais em vaso com alface (*Lactuca sativa* L.) de forma a compreender o contributo das micorrizas arbusculares na sua produtividade no modo de produção biológico. No primeiro, avaliou-se a colonização micorrízica das raízes das alfaces relacionando-a com o tipo de solo, a dose de adubo, a produção de alface e o teor de nutrientes nas folhas e nas raízes. No segundo ensaio avaliou-se a produção da alface e a absorção de nutrientes em função da aplicação de fosfato de Gafsa em plantas micorrizadas e não micorrizadas. Ambos os ensaios foram conduzidos segundo um delineamento experimental com dois factores, tipo de solo (solo de agricultura biológica e solo de agricultura convencional) e adubo orgânico Phenix com três níveis de aplicação (0, 2 e 4 t ha⁻¹) no primeiro ensaio; inóculo micorrízico com dois níveis (plantas inoculadas e não inoculadas) e fosfato de Gafsa com três níveis (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) no segundo ensaio.

No primeiro ensaio a produção da alface diminuiu com a aplicação de doses crescentes de Phenix, devido à sua elevada CE e elevado teor de N-NH₄⁺, mas foi superior (p <0,05) no solo biológico em comparação com o solo convencional. A percentagem de raiz colonizada também foi superior (p <0,05) nas alfaces produzidas em solo biológico. No entanto, diminuiu com a aplicação de doses crescentes de adubo pelo que o seu contributo para a produtividade das alfaces terá sido muito reduzido. No segundo ensaio a aplicação de doses crescentes de fósforo resultou em aumentos significativos da produção de alface. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre as alfaces inoculadas e as não inoculadas. Contudo, com a aplicação da maior dose de fósforo (200 kg ha⁻¹) o peso seco das folhas e o peso fresco das raízes das alfaces inoculadas diminuiu (p <0,05) comparativamente às alfaces não inoculadas o que sugere um possível efeito inibidor da fertilização na acção benéfica dos fungos micorrízicos arbusculares.

Palavras chave: solo biológico, micorrizas arbusculares, matéria orgânica, azoto e fósforo

ABSTRACT

Two pot experiments were carried out in organic agriculture in order to understand the effect of arbuscular mycorrhiza in lettuce (*Lactuca sativa* L.) yield. In the first experiment the percentage of root colonization by AM fungi was evaluated and correlated with the type of soil, organic fertilizer rates, lettuce yield and nutrient contents in shoots and roots. In the second experiment the lettuce yield and nutrient uptake were correlated with the application of P in AM-inoculated and non AM-inoculated lettuces. In both experiments the experimental design included a combination of two factors: soil (from organic and from conventional agriculture) and organic fertilizer Phenix (0, 2 and 4 t ha⁻¹) in the first experiment; mycorrhizal inoculation (mycorrhizal and non-mycorrhizal lettuces) and natural phosphate (0, 100 and 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) in the second one.

In the first experiment the lettuce yield decreased with high rates of organic fertilizer because its conductivity and content of N-NH₄⁺ was very high. However, the lettuce yield was higher in the organic soil. The root colonization was also higher (p <0,05) in the organic soil. However, it decreased with high rates of organic fertilizer, so the organic fertilizer did not contribute to increase the lettuce productivity. In the second experiment high rates of P increased lettuce yield, however there were no differences between mycorrhizal and non-mycorrhizal lettuces. The application of high P rate (200 kg ha⁻¹) decreased the dry weight of shoots and the fresh weight of roots in mycorrhizal plants compared to non-mycorrhizal plants. This suggests a negative effect of P in the contribution of FMA for the lettuce fertilization.

Key-words: organic soil, arbuscular mycorrhiza, organic matter, nitrogen, phosphorus.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Agricultura biológica
AC	Agricultura convencional
Al	Alumínio
ANR	Actividade da enzima nitrato-redutase
B	Boro
C	Carbono
CE	Condutividade eléctrica
C/N	Relação C/N
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Ião cálcio
CaO	Óxido de cálcio
Cu	Cobre
DAP	Dias após plantação
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Ferro
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
HCl	Ácido clorídrico
I	Inoculadas
IFOAM	International Federation of Organic Agriculture Movements
K	Potássio

K ⁺	Ião potássio
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ O	Óxido de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MA	Micorrizas arbusculares
Mg	Magnésio
Mg ²⁺	Ião magnésio
MgO	Óxido de magnésio
MPB	Modo de produção biológico
MPC	Modo de produção convencional
Mn	Manganês
MO	Matéria orgânica
Mo	Molibdênio
MS	Matéria seca
N	Azoto
N/Ca	Relação azoto / cálcio
NH ₄ ⁺	Ião amónio
NI	Não inoculadas
NMA	Não micorrizadas
N/P	Relação azoto / fósforo
NO ₃ ⁻	Ião nitrato
P	Fósforo
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo

RC	Raíces colonizadas
S	Enxofre
SB	Solo de agricultura biológica
SC	Solo de agricultura convencional
Zn	Zinco

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Calendarização das diferentes etapas do ensaio experimental I	22
Quadro 2. Calendarização das diferentes etapas do ensaio experimental II.....	33
Quadro 3. Características dos solos e do adubo Phenix (I).....	37
Quadro 4. Características físicas e químicas do solo (II)	67
Quadro 5. Teor de nutrientes no solo (II).....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura simplificada de micorriza arbuscular.....	12
Figura 2.	Ensaio experimental numa estufa não climatizada na ESA de Castelo Branco com as alfaces 24 dias após a plantação destinadas à (a) 1ª colheita (28 dias após a plantação) e (b) 2ª colheita (45 dias após a plantação).....	22
Figura 3	Preparação dos vasos com os diferentes tratamentos.....	23
Figura 4	Organização dos vasos durante a adição de adubo.....	24
Figura 5	Ensaio experimental logo após a plantação das alfaces (a) para a 1ª colheita (28 dias após a plantação) e (b) para a 2ª colheita (45 dias após a plantação).....	25
Figura 6	Preparação de amostras da raiz.....	30
Figura 7	Etapa do processo de coloração das raízes: a) Conjunto de diversos tubos com amostras de raízes colocados em tina com solução descolorante; b) Pormenor de uma amostra de raiz num tubo com gaze na extremidade inferior.....	31
Figura 8	Intersecção das raízes com o eixo central do campo visual do microscópio.....	32
Figura 9	Ensaio experimental no abrigo da ESA de Castelo Branco.....	32
Figura 10	Pesagem do solo para cada vaso.....	33
Figura 11	Ensaio experimental logo após a plantação com as alfaces (a) para a 1ª colheita (28 dias após a plantação) e (b) para a 2ª colheita (53 dias após a plantação).....	34
Figura 12	Aplicação do inóculo micorrízico às alfaces 7 dias após a transplantação.....	35
Figura 13	Lavagem das raízes: a) raiz retirada do balde com água onde fora colocado o torrão do vaso; b) lavagem da raiz com água corrente e com o auxílio de crivos; c) raiz limpa.....	35
Figura 14	Temperaturas médias diárias do ar e do solo durante o ensaio.....	37
Figura 15	Peso fresco das folhas da alface, 28 e 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	38
Figura 16	Peso fresco das folhas da alface, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	39

Figura 17	Peso seco das folhas da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	39
Figura 18	Peso fresco das raízes da alface, 28 e 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	40
Figura 19	Peso fresco das raízes da alface, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	40
Figura 20	Peso seco das raízes da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	41
Figura 21	Percentagem de raiz colonizada pelos FMA, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	41
Figura 22	Percentagem de raiz colonizada pelos FMA, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix.....	42
Figura 23	Aspectos da colonização micorrízica nas raízes de alface, 45 dias após a transplantação. A- arbúsculo, E- esporo extrarradicular, CR- cortex radicular.....	43
Figura 24	Teor de nutrientes nas folhas da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	44
Figura 25	Teor de nutrientes nas raízes da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha ⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	45

Figura 26	Temperaturas médias diárias do ar e do solo durante o ensaio.....	45
Figura 27	Peso fresco das folhas da alface, 28 e 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	46
Figura 28	Peso fresco das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, (a) com aplicação de fósforo no solo para a média de raízes inoculadas e não inoculadas e (b) com a inoculação micorrízica das raízes para a média das diferentes doses de P ₂ O ₅ . I e NI representam, respectivamente, raízes com e sem inóculo micorrízico.....	47
Figura 29	Peso seco das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	47
Figura 30	Peso fresco das raízes da alface, 28 e 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	48
Figura 31	Peso fresco das raízes da alface 53 dias após a transplantação, (a) com aplicação de fósforo no solo para a média de raízes inoculadas e não inoculadas e (b) com a inoculação micorrízica das raízes para a média das diferentes doses de P ₂ O ₅ . I e NI representam, respectivamente, raízes com e sem inóculo micorrízico.....	48
Figura 32	Peso seco das raízes da alface, 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	49
Figura 33	Teor de nutrientes das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.	50
Figura 34	Teor de nutrientes nas raízes da alface, 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p <0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 A agricultura biológica e a agricultura convencional

Actualmente 16 a 40% da superfície agrícola mundial encontra-se degradada devido à aplicação elevada de fertilizantes minerais de síntese e pesticidas aliada a um elevado grau de mecanização e irrigação (Chappell et al., 2011). Estas práticas, típicas da agricultura convencional (AC), têm um impacto muito forte nas comunidades de macro e microrganismos do solo, destruindo o seu habitat e modificando as suas funções. O solo, através da sua rede de poros providencia o meio físico ideal para uma enorme diversidade de microrganismos, no entanto, tem-se verificado que o uso de produtos químicos de síntese, para aumentar a fertilidade mineral do solo, modifica o equilíbrio natural do ecossistema edáfico devido a uma destruição do meio físico e à diminuição de diversidade biológica em virtude da adição de nutrientes além dos que as plantas podem absorver, e assim, poluindo o solo (Kibblewhite et al., 2008), contribuindo para a diminuição do número de espécies e para a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (Lampkin, 2001). O equilíbrio entre a quantidade de carbono (C) no solo e a mineralização de C é posto em causa devido à menor incorporação de matéria orgânica (MO) no solo e à elevada mecanização que provoca perdas acentuadas de C. Por outro lado, a diminuição de MO está directamente relacionada com a perda da capacidade de troca cationica o que diminui a capacidade do solo de reter os nutrientes (Kibblewhite e tal., 2008).

A agricultura biológica (AB) é uma alternativa à AC, através de técnicas de produção que incrementam a actividade biológica no solo e desenvolvem processos menos artificiais de produção (Chappell et al., 2011). Estes autores referem que os métodos de AB têm grande potencial em explorações agrícolas de pequena dimensão, melhorando a fertilidade do solo. A maior eficiência de produção em explorações agrícolas de pequena dimensão deve-se à diversidade de culturas, ao uso mais eficiente da irrigação, à maior qualidade laboral e de supervisão e ao menor uso de meios de produção externos (Chappell et al., 2011).

Convencionalmente a agricultura é uma actividade cujo objectivo é a produção de alimentos. No entanto, a sociedade requer outros serviços tais como um fornecimento de água de boa qualidade, alimentos saudáveis e a redução da emissão de gases de efeito de estufa. Neste contexto, é urgente implementar uma agricultura sustentável de modo a garantir que estes serviços prestados pelo ecossistema agrícola sejam conservados para as futuras gerações. A FAO (2000) refere que a maior qualidade dos produtos no modo de produção biológico

(MPB) cria um potencial de mercado por garantirem uma maior segurança alimentar, serem mais aromáticos e saborosos e serem produzidos com menor impacto ambiental.

1.2 A fertilidade do solo em agricultura biológica

1.2.1 A agricultura biológica e a actividade biológica do solo

A agricultura biológica é um sistema de produção que se baseia na sustentabilidade da saúde dos solos e dos ecossistemas (IFOAM, 2007). A fertilidade do solo no MPB baseia-se na actividade biológica do solo (Silguy, 1994). O teor de MO do solo, os microrganismos decompositores, as populações de *Rhizobium* sp. e de fungos micorrízicos relacionados com a nutrição das culturas e outros que podem suprimir os microrganismos patogénicos e ter utilização na protecção das culturas (Mourão, 2007), têm um papel fundamental na qualidade do solo e nos produtos no MPB.

Os microrganismos modificam a estrutura do solo agregando partículas minerais e constituintes orgânicos do solo. Os processos biológicos do solo incluem: (i) transformação de C através da decomposição da MO, (ii) o ciclo dos nutrientes, por exemplo do azoto (N) e do fósforo (P), (iii) a manutenção da estrutura física do solo e (iv) a regulação biológica do solo, ou seja a competição entre os vários microrganismos de modo a estabelecer um determinado equilíbrio. A decomposição da MO é a fonte energética para a actividade microbiana a qual depende do tipo de cultura instalada e da MO incorporada no solo (Kibblewhite et al., 2008). O solo é um sistema integrado, pois a indução de uma alteração numa função do solo altera a dinâmica das restantes. Por exemplo, diminuindo o teor de MO, a população microbiana diminui devido à menor quantidade de energia disponível, tendo implicações na sanidade do solo, pois a competição entre os microrganismos diminui. Para além do C os ciclos do N e do P alteram substancialmente a dinâmica do solo, incluindo a produção agrícola. Quando a necessidade em N e P dos microrganismos é superior à disponibilidade destes elementos no solo, a funcionalidade do solo altera-se, diminuindo os nutrientes disponíveis para as plantas (Mengel, 1996). A mobilização do solo também influencia as populações microbianas. Kibblewhite et al. (2008) referem que na rede trófica dos sistemas sem mobilização do solo o papel dominante da decomposição primária da MO é dos fungos e minhocas. Por outro lado, nos sistemas com mobilização convencional do solo são as bactérias que assumem maior importância como primeiros decompositores. A função dos fungos e minhocas de fragmentar a MO é substituída pela mobilização do solo que

também redistribui os resíduos orgânicos e aumenta a área de colonização bacteriana e o arejamento do solo favorecendo a decomposição mais rápida e completa da MO.

1.2.2 Técnicas de agricultura biológica

As técnicas de AB têm como finalidade incrementar a biodiversidade no solo, através da incorporação da MO, melhorando a sua qualidade (Reeves, 1997) e por outro lado, disponibilizando os nutrientes, através da mineralização da MO, no período de maior necessidade das culturas (Brito et al., 2007).

O teor de matéria orgânica é fundamental para avaliar a qualidade do solo (Reeves, 1997) e vários autores referem o aumento de produção com a incorporação de MO (Gent, 2002; Manojlovic et al., 2009). A disponibilidade de nutrientes para as culturas depende do tipo de MO incorporada. A MO do composto é mais facilmente retida no solo por se encontrar parcialmente humificada (Drinkwater et al., 1998), ao contrário dos adubos verdes. Os compostos maturados são mais lentamente mineralizados, sendo necessário aplicar maior quantidade de MO para disponibilizar N de modo a alcançar produtividades elevadas (Sikora, 1998). Um composto mal maturado poderá libertar maior quantidade de N, mas por outro lado causar a imobilização do N mineral pelos microrganismos decompositores e efeitos adversos no crescimento das plantas jovens (Brito, 2001). A sideração apenas com leguminosas pouco contribui para o teor de húmus do solo, porque as plantas jovens são rapidamente mineralizadas, mas contribui para disponibilizar N e outros nutrientes. A libertação de N depende do balanço entre a mineralização e a imobilização de N pelos microrganismos que está relacionada com a relação C/N. Material verde e jovem de relação C/N inferior a 20 decompõe-se rapidamente e liberta mais nutrientes para a cultura seguinte, pelo contrário quanto maior a relação C/N mais N é retido pelos microrganismos e menos fica disponível para a próxima cultura. Assim, após a incorporação de um adubo verde de baixa razão C/N, a cultura seguinte deve ser imediatamente instalada, e após a incorporação de um adubo de elevado C/N, a cultura seguinte deve ser instalada um mês depois (Baggs et al., 2000).

No MPB a adubação mineral é complementar da fertilização orgânica, excepto no que se refere ao N, o qual, não pode ser aplicado através de adubos minerais. Nos solos do NW de Portugal a carência que mais frequentemente justifica a adubação mineral é a de fósforo, sendo normalmente usado o fosfato natural macio oriundo de Gafsa, na Tunísia. A adubação potássica, sobretudo para culturas exigentes neste elemento, é realizada com o sulfato de potássio e magnésio (Ferreira et al., 2009).

No NW de Portugal os solos são ácidos, sendo necessário proceder à correcção da reacção do solo. Os correctivos alcalinizantes usados em AB são os calcários simples e magnesianos e o lithothamne oriundo das algas *Lithothamnium calcareum* e *L. corallioides*. O aumento de fertilidade do solo resultante da correcção do solo é devido ao incremento da disponibilidade de P e principalmente à diminuição da solubilidade do alumínio que é tóxico para as plantas (Cifu et al., 2004).

No MPB prevalece a incorporação da MO à superfície do solo com mobilização reduzida e superficial. A mobilização intensiva do solo aumenta o arejamento do solo, sendo responsável por taxas elevadas de mineralização e diminuição de C, por exemplo Drinkwater et al. (2000) referem que a mobilização com charrua ou grade de discos areja muito o solo e contribui para o aumento da mineralização da MO durante os primeiros tempos da cultura do milho.

A rotação de culturas é uma prática agrícola no MPB que possibilita uma melhor utilização da água (pois a exploração do solo pelas raízes assim como as necessidades hídricas variam com as culturas), dos nutrientes minerais do solo, um menor risco de incidência de pragas e doenças, um controlo preventivo de infestantes e uma maior diversidade de produtos hortícolas disponíveis (Mourão, 2007). O aumento de produção em rotações durante vários anos com pastagens está relacionado com a melhoria das propriedades físicas do solo devido ao aumento da MO (Bullock, 1992). Por outro lado, rotações curtas como, por exemplo, milho e soja levam a uma degradação lenta das propriedades físicas do solo e à diminuição da MO. Pensa-se que o aumento de produção nas rotações em relação à monocultura está relacionado com um aumento dos organismos patogénicos do solo em monocultura (Bullock, 1992).

1.3 A influência da matéria orgânica na qualidade do solo

A qualidade de um solo corresponde à sua capacidade de aceitar, armazenar e reciclar água, nutrientes e energia. Como a MO influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, tem um papel determinante na sua qualidade, na sua estabilidade face a variações nas condições ambientais e na sua capacidade de recuperar de perturbações severas (Varenes, 2003).

A MO representa usualmente 1 a 6% da matéria seca total da camada arável de um solo mineral (Varenes, 2003) mas a sua quantidade no solo depende da aplicação de materiais orgânicos e respectivas taxas de decomposição e mineralização, da textura do solo e do clima. Estes factores juntamente com o tipo de solo e sistema agrícola determinam a estabilidade da

MO que é maior num solo argiloso do que num solo arenoso, e maior num solo com prado permanente do que num solo cultivado (Johnston et al., 2009). A gestão da MO em AB, principalmente através de prados temporários, assegura uma boa estrutura do solo e incrementa a actividade biológica, melhorando a disponibilidade de nutrientes, a saúde e a produtividade das culturas e dos animais. A nutrição das culturas depende fortemente da incorporação de leguminosas, para aumentar o N no solo, bem como de compostos e resíduos das culturas de forma a garantir a reciclagem dos nutrientes (Watson et al., 2002).

Yilmaz et al. (2010) referem que a incorporação de MO no solo afecta as suas propriedades químicas. Estes autores verificaram um aumento do pH, da capacidade de troca catiónica, e da condutividade eléctrica após a aplicação de estrume de bovinos num solo pobre em MO. A MO também constitui uma importante reserva de nutrientes e a sua incorporação contribui para o aumento do teor de N total (Bayu et al., 2006; Yilmaz et al., 2010), e também de P e potássio (K) (Zaller et al., 2004). Quanto às propriedades físicas verificou-se que a aplicação de estrume diminuiu a densidade aparente (Yilmaz et al., 2010) e aumentou a capacidade de retenção de água (Benbi et al., 1998; Bayu et al., 2006). Mamman et al (2007) referiram que o aumento de MO no solo diminui a compactação do solo facilitando a germinação e o crescimento das raízes das culturas. Evanylo et al. (2008) também verificaram uma melhoria na estrutura do solo que se reflectiu na diminuição de N e de P perdidos por escoamento superficial após a aplicação de composto ao longo de três anos. A adição de MO de fácil decomposição como resíduos das culturas, estrumes e chorumes aumenta a estabilidade dos agregados pela presença de moléculas polissacarídicas de origem microbiana e pelo crescimento dos fungos do solo cujos micélios extensos unem os microagregados (Varenes, 2003). As propriedades biológicas do solo como a biomassa microbiana e a actividade enzimática também são beneficiadas pela incorporação de estrume nos solos (Zaller et al., 2004; Gaofei et al., 2009) assim como as diferentes populações de minhocas (Zaller et al., 2004). A diversidade biológica é indicadora da qualidade de um solo pois confere estabilidade ao solo e está associada a uma diversidade funcional. Embora cada uma das reacções bioquímicas que ocorrem no solo possam ser realizadas por muitos organismos diferentes, alguns processos são realizados apenas por algumas espécies, como é o caso da nitrificação realizada por nitrosomonas e nitrobactérias ou o estabelecimento de bioporos por minhocas pelo que estas espécies são consideradas espécies fundamentais na avaliação da qualidade de um solo (Mills et al., 1993).

1.4 A mineralização da MO e a disponibilidade de nutrientes

A taxa de mineralização da MO é determinada pela qualidade dos resíduos, pela actividade biológica do solo e pelo clima. A mineralização é mais rápida em solos com uma boa estrutura, favorável ao arejamento e permeabilidade e com temperaturas entre 25-35 °C, condições para as quais a actividade da maior parte dos organismos do solo é máxima (Briggs, 2002; Varennes, 2003). A textura do solo também condiciona a mineralização pois as argilas formam complexos com as partículas húmicas (complexos argilo-húmicos). Nos solos com maior teor de argilas o contacto entre os resíduos e os microrganismos é menor o que reduz a mineralização do C e do N e estabiliza a MO (Briggs, 2002; Amlinger et al., 2003) e porque o arejamento é menor que nos solos arenosos. A razão C/N e o teor de lenhina e polifenóis determina a qualidade dos resíduos (Varennes, 2003). De um modo geral, quanto menor a razão C/N mais rápida é a mineralização e a libertação de N. Em alguns casos a razão C/N nem sempre reflecte a acessibilidade do C e do N à população microbiana. Por exemplo, os compostos têm uma baixa relação C/N mas como são humificados e estáveis a sua mineralização é lenta (Briggs, 2002). A lenhina é uma substância complexa e poucos organismos a conseguem degradar sendo a sua decomposição lenta e feita sobretudo por fungos lenholíticos (Varennes, 2003) como os Basidiomicetas.

Apenas uma pequena percentagem do N orgânico total do solo é facilmente mineralizado. A mineralização do N consiste numa sequência de processos enzimáticos para os quais a biomassa microbiana viva fornece enzimas e a biomassa microbiana morta constitui o substrato (com compostos proteicos e polímeros de açúcares aminados) com uma baixa relação C/N. As entradas de C e N no solo incluem a MO incorporada, o C orgânico das raízes das plantas, o N₂ assimilado pelas leguminosas e o N depositado a partir da atmosfera. Se por um lado o N orgânico do adubo verde mineraliza por acção dos microrganismos, por outro lado, estes imobilizam o N inorgânico durante a degradação da palha. A boa gestão da incorporação destes diferentes tipos de MO permite um uso eficiente do solo e uma boa fertilização azotada (Mengel, 1996).

Para além do N inorgânico tem-se verificado que as plantas também são capazes de absorver N orgânico presente no solo na forma de aminoácidos (Näsholm et al., 2008). Este N encontra-se em concentrações semelhantes ou até superiores às do N inorgânico devido à rápida hidrólise das proteínas do solo (Kielland et al., 2007). Esta actividade proteolítica deve-se à exsudação de proteases pelos microrganismos, fungos micorrízicos e raízes das plantas (Schmidt et al., 2003; Godlewski & Adamczyk, 2007). Vários estudos indicam não só

a presença de transportadores de aminoácidos, tanto em fungos micorrízicos como em raízes de plantas, mas também uma eficiente utilização metabólica do N absorvido. No entanto, a absorção de aminoácidos pelas plantas e a sua importância na nutrição das plantas continua a ser alvo de discussão (Näsholm, 2008).

O P proveniente da MO contribui para a nutrição das plantas mas a sua importância depende das condições edafo-climáticas que determinam a mineralização da MO (Varenes, 2003). O teor de P solúvel no solo pode ser influenciado pelos ácidos orgânicos (Adler, 2003) que competem com os locais de adsorção de P na matriz do solo (Varenes, 2003). Por sua vez, os ácidos orgânicos variam com a maturação dos compostos e a aplicação de compostos mal maturados favorece o teor de P solúvel no solo (Adler, 2003). A aplicação de estrume (Eghball, 2005) ou de composto (Sikora, 2005) favorece a disponibilidade de P sendo a sua absorção pelas plantas equivalente à dos fertilizantes químicos de síntese em solos pobres em P. O P é de todos os macronutrientes aquele que se encontra em níveis mais baixos na solução do solo e a sua absorção depende da sua difusão no solo a uma pequena distância da raiz, daí a importância das micorrizas que permitem que as plantas explorem um maior volume de solo (Varenes, 2003).

O K é normalmente o mais abundante de todos os nutrientes no solo encontrando-se presente nas plantas em valores semelhantes ao de N (Varenes, 2003). Cerca de 98% do K total do solo encontra-se nos feldspatos potássicos e nos filossilicatos (Andrist-Rangel et al., 2010). Solos jovens e ricos em argila são bons fornecedores de K ao contrário de solos grosseiros e arenosos ou orgânicos onde o K se tem tornado um elemento crítico (Oborn et al., 2005). A fixação de K é favorecida com a calagem dos solos pois aumenta a capacidade de troca catiónica e os solos com maior poder tampão favorecem a disponibilidade do K em solução uma vez que, sendo o K um dos principais catiões de troca, a sua diminuição na solução em consequência da absorção pelas plantas é repostada facilmente nestes solos tendo em conta o equilíbrio entre os catiões de troca. Ao contrário do N e do P, o K fica imediatamente disponível quando os organismos morrem e há rotura das células, não sendo necessária a mineralização (Varenes, 2003).

O cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) são minerais antagonistas do potássio pois competem com ele nos complexos de troca influenciando a sua disponibilidade para as plantas (Lin, 2011). A MO do solo constitui uma fonte secundária destes nutrientes através da mineralização ou da rotura das células pois o fornecimento de Ca e Mg às plantas é sobretudo a partir dos minerais

do solo (por exemplo calcários e gesso ricos em Ca e dolomite e minerais argilosos ricos em Mg) ou através da calagem dos solos ácidos (Varenes, 2003). Caires et al. (2011) verificaram um aumento da produção de milho no sistema de sementeira directa com a aplicação de gesso e Viadé et al. (2011) referiram um aumento na produção de gramíneas e trevo com a aplicação de calcário magnésiano. Solos ácidos submetidos a calagem com calcários calcíticos podem apresentar deficiência de Mg no solo em virtude do antagonismo entre os iões Ca^{2+} e Mg^{2+} assim como solos muito ricos em K também podem apresentar deficiência de Mg devido ao antagonismo entre os iões K^+ e Mg^{2+} . Quando a concentração de aniões (hidrogenocarbonato, sulfato ou fosfato) no solo é elevada, o Ca e o Mg podem precipitar e as suas perdas por lixiviação contribuirão para a acidificação dos solos em locais com elevada precipitação (Varenes, 2003).

A produção e a qualidade das culturas dependem não só da disponibilidade de macronutrientes no solo mas também de micronutrientes. A MO tem um impacto directo e significativo na disponibilidade de zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) no entanto, pouco influencia a disponibilidade do cobre (Cu) no solo (Li et al., 2007). A MO, para além de constituir uma fonte de micronutrientes no solo através da mineralização, impede a adsorção dos mesmos aos colóides minerais (Varenes, 2003). A absorção dos micronutrientes pela planta também é influenciada pelas interações entre estes e os macronutrientes do solo. Por exemplo, Li et al. (2007) verificaram que uma elevada disponibilidade de P no solo esteve na origem de baixos teores de micronutrientes no milho. Por outro lado a deficiência de N ou P diminuiu a produção mas aumentou as concentrações de micronutrientes nos caules do milho à excepção do Cu. A disponibilidade dos micronutrientes catiões e do Boro (B) é maior em solos ácidos sendo o Cu o menos influenciado pelo pH do solo. Em solos muito ácidos, o Molibdénio (Mo) está pouco disponível para as plantas (Varenes, 2003).

1.5 A cultura da alface

1.5.1 Caracterização

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea anual com um ciclo cultural relativamente curto. Em estufa o ciclo cultural é cerca de 6 a 8 semanas na época de Primavera-Verão e 10 a 12 semanas durante o Inverno. O sistema radicular é apumado, pouco ramificado e relativamente superficial. Nas alfaces transplantadas, as raízes exploram um volume de solo reduzido, no entanto em sementeira directa a raiz principal pode atingir mais de 60 cm. A formação do repolho é influenciada pela temperatura e pela luminosidade. Em condições de

baixa intensidade luminosa o repolho forma-se melhor a baixas temperaturas e em períodos de elevada intensidade luminosa a formação do repolho é melhor a temperaturas próximas de 20 °C. A alface prefere solos de textura franca ou argilosa, ricos em MO. Tem uma sensibilidade moderada à salinidade (nível crítico de 1,3 dS m⁻¹) e o seu pH óptimo situa-se entre 6,5 e 7,2 (Almeida, 2006).

1.5.2 Fertilização

A cultura da alface é relativamente pouco exigente em nutrientes, embora, devido ao seu curto ciclo cultural e sistema radicular superficial, necessite de nutrientes imediatamente disponíveis no solo. As necessidades de N são reduzidas no início da cultura e cerca de 2/3 da absorção total de N ocorre após a formação do repolho (Almeida, 2006).

A produção de alface aumenta com a incorporação de MO. Ao determinar a quantidade de MO a aplicar e o momento de aplicação deve-se ter em consideração a quantidade de N potencialmente mineralizável o que permite regular o teor de nitratos acumulados na alface e controlar a quantidade de N residual no solo no final da cultura (Manojlovic et al., 2009). Por exemplo, como a alface tem uma elevada taxa de absorção de N num curto período de tempo, uma fertilização unicamente à base de centeio e trevo para sideração imediatamente antes da plantação é inadequada (Holness et al., 2008) dada a reduzida percentagem de N disponibilizada para a alface. Pelo contrário, a aplicação de guano com elevada taxa de mineralização da MO (Manojlovic et al., 2009) constitui uma boa fonte de N, a aplicar antes da plantação. Segundo Ribeiro et al. (2010) é possível reduzir em metade o consumo de fertilizantes orgânicos comerciais, à base de estrume de galinha, misturando-os com composto, assegurando os teores de N disponíveis e reduzindo deste modo os custos de fertilização para a alface.

Vários autores referem as vantagens da fertilização orgânica da alface comparativamente à fertilização química de síntese, resultando em produções equivalentes (Silva et al., 2010; Montemurro, 2010) ou superiores (Porto et al., 2008). Gent (2002) referiu um aumento da área foliar da alface com incorporação de MO e uma melhoria da sua composição pelo aumento de acumulação de N, P, K e Ca nas suas folhas. Guadagnin et al. (2005) verificaram que o teor de nitratos nas folhas de alfaces produzidas no MPB era inferior comparativamente ao das alfaces produzidas no MPC, por sua vez inferior ao das alfaces produzidas em hidroponia, o que está relacionado com o tipo de fertilização pois a acumulação de nitratos na alface (raiz, caule e folhas) é menor com fertilização orgânica do que com fertilização

convencional (Pavlou et al., 2006; Porto et al., 2008). Por outro lado, Pavlou et al. (2006) referem que o teor de N disponível no fim da cultura é superior com fertilização orgânica. Apesar dos benefícios da MO, os agricultores devem ponderar bem a quantidade de MO a incorporar pois a aplicação indiscriminada de fertilizantes orgânicos com doses exageradas pode originar problemas de fitotoxicidade. Por exemplo, Hammermeister et al. (2006) verificou que doses elevadas (equivalentes a 800 kg N total ha⁻¹) de composto de aves e de composto de penas resultaram tóxicas para alface tendo ficado disponível 50 a 70% do N total aplicado. O mesmo não se verificou com a aplicação de luzerna em que 10 a 40% do N total aplicado ficou disponível para a cultura.

1.6 As micorrizas

Na maioria das condições ecológicas o estado normal das plantas é estarem micorrizadas ou seja, associadas a fungos ao nível da raiz, o que lhes proporciona uma melhoria da nutrição mineral, particularmente de P, em troca de C. As micorrizas são geralmente consideradas simbioses com benefício mútuo de tal importância que se considera que a colonização do meio terrestre pelas plantas tenha sido uma consequência da sua associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Apesar de na maior parte das plantas vasculares as micorrizas constituírem autênticos “órgãos” de absorção de nutrientes tem-se verificado que em muitos e variados casos as interações mutualistas e parasíticas andam a par nestas relações fungo-planta. Por outro lado, em algumas famílias como Chenopodiaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Polygonaceae, Juncaceae e Proteaceae é pouco provável a formação de micorrizas de qualquer tipo. (Smith & Read, 2008).

Os fungos micorrízicos fazem parte do vasto grupo de microrganismos que colonizam a rizosfera. De um modo geral são completamente dependentes do C fornecido pela planta e competem com os saprófitas pela imobilização do N, P e outros nutrientes. Os fungos micorrízicos têm uma relação muito próxima com as raízes que colonizam e podem distinguir-se diversos tipos de micorrizas consoante a taxonomia dos fungos, das plantas e o tipo de colonização (ver Smith & Read, 2008). As micorrizas arbusculares são formadas por fungos endófitos do filo Glomeromycota, cujas hifas asseptadas colonizam intracelularmente as células da raiz. Nas ectomicorrizas, as hifas septadas (filos Ascomycota e Basidiomycota) formam um manto de hifas à volta da raiz e penetram entre as células da raiz mas nunca ocorre colonização intracelular (Smith & Read, 2008).

As micorrizas arbusculares (MA) são as micorrizas mais importantes a nível agronómico pois formam-se na grande maioria das plantas cultivadas e sendo importantes para a nutrição das plantas, favorecendo o seu crescimento e a produtividade de um modo sustentável, estão também intimamente relacionadas com a nutrição humana daí a importância do seu estudo e aproveitamento da sua eficiência em sistemas de produção como a agricultura biológica (He & Nara, 2007).

1.6.1 Biologia e desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares

As micorrizas arbusculares são o tipo mais comum de micorrizas ocorrendo em 80 % das espécies de plantas vasculares e resultam da colonização das raízes por fungos simbióticos obrigatórios (Filo Glomeromycota) correspondentes a cerca de 230 espécies (Oehl et al., 2011). É provável que os fungos tenham existido desde há mais de 1000 milhões de anos e que as MA sejam extremamente antigas (Smith & Read, 2008). As primeiras plantas na Terra tinham rizomas, mas não apresentavam um sistema radicular desenvolvido. Fósseis de plantas, por exemplo de *Aglaeophyton* do Devónico (Smith & Read, 2008), revelam a presença de estruturas fúngicas que permitiam a absorção de iões fosfato pelas plantas (Hodge et al., 2010). Presentemente, apesar de as plantas apresentarem um sistema radicular bem desenvolvido, a absorção de P representa um desafio para a maior parte das plantas. Os fungos micorrízicos colonizam as raízes das plantas adquirindo C da planta através do micélio intrarradicular e criando uma série de efeitos, como o aumento de absorção de P pela planta através do micélio extrarradicular que faz a ponte entre a raiz da planta e os microhabitats envolventes, aumentando a zona de influência da raiz, facilitando deste modo a absorção de P (Helgason & Fitter, 2009). Além disso, a alteração física do solo e nos exudados químicos das raízes, provocadas pela influência do micélio, afectam a população microbiana do solo criando a chamada micorrizosfera (Barea, 2000).

As MA (Fig. 1) são constituídas por três elementos: a raiz, as estruturas fúngicas dentro e entre as células da raiz e o micélio extrarradicular (no solo). O nome “arbuscular” deriva de estruturas intracelulares características, os arbúsculos, que resultam da ramificação das hifas dentro das células corticais das raízes. Para além destas estruturas também surgem vesículas de reserva presentes no interior ou entre as células. Como as estruturas fúngicas características das MA se desenvolvem dentro da raiz e não provocam alterações morfológicas na raiz, não é possível avaliar a presença de colonização de um sistema radicular sem o corar e observar ao microscópio (Smith & Read, 2008).

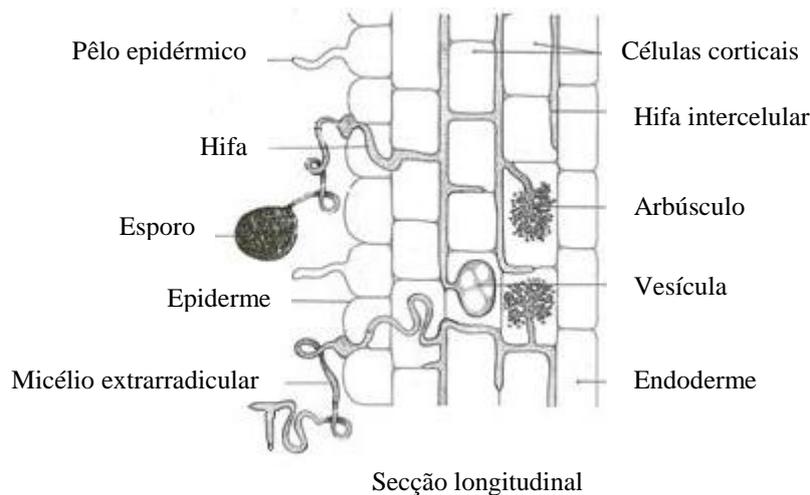


Figura 1. Estrutura simplificada de micorriza arbuscular (Adaptado de Anonymous, 1996).

Os FMA são simbioses obrigatórias, o que significa que não podem ser mantidos em cultura sendo incapazes de completar o seu ciclo sem estabelecer simbiose com uma planta. A colonização das raízes pode ocorrer através de esporos, de fragmentos de raízes micorrizadas e de hifas. Os esporos formados pelos FMA são grandes (mais de 500 μm de diâmetro), multinucleados e com abundantes reservas lipídicas, hidratos de carbono e uma espessa e resistente parede. As suas reservas são consumidas à medida que ocorre a germinação e que as hifas crescem formando-se o micélio capaz de originar anastomoses. As anastomoses estabelecem-se entre hifas originadas a partir de esporos ou a partir de raízes colonizadas originando uma continuidade citoplasmática e migração de núcleos. À medida que as plantas crescem vão ficando ligadas a uma rede no solo constituída por hifas de micélio de diferentes fungos e por raízes de outras plantas. A destruição dessa rede de micélio pode originar a diminuição da capacidade do potencial de inóculo micorrízico do solo e da absorção de nutrientes quer pelos fungos quer pelas plantas (Smith & Read, 2008).

1.6.1 Influências das condições edafo-climáticas na micorrização

Gryndler et al. (2006) realizaram experiências de campo no sentido de avaliar o efeito da fertilização mineral e orgânica no desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares nas culturas de milho e luzerna. Neste estudo verificou-se que o comprimento das hifas aumentou nos tratamentos apenas com fertilização orgânica na Primavera, tendo-se constatado o efeito oposto no Outono. Pelo contrário, a fertilização mineral contribuiu para a diminuição do comprimento das hifas independentemente da fertilização orgânica e da estação do ano. No entanto Gryndler et al. (2001) referiram que o comprimento das hifas diminuiu com a

fertilização mineral em solos sem adição de MO, mas em solos com MO e fertilização mineral o comprimento das hifas foi o dobro do que sem fertilização mineral. O aumento da biomassa do micélio está relacionado com a colonização das raízes ao contrário do número de esporos que aumenta com a fertilização orgânica e/ou mineral.

A simbiose dos FMA com as culturas também pode ser afectada pela mobilização do solo. Gosling et al. (2006) referem que a mobilização do solo é provavelmente a operação cultural mais destrutiva da rede de micélio dos FMA. Duana et al. (2011) constataram que numa rotação de trigo (*Triticum aestivum*) e luzerna (*Medicago truncatula*) a colonização por *Glomus intraradices* e *Glomus margarita* não foi afectada pela mobilização do solo, no entanto a produção e absorção de P variaram com a mobilização dependendo da espécie de FMA. Num solo com mobilização colonizado por *Glomus margarita* verificou-se uma diminuição da produção de luzerna e uma diminuição na absorção de P, ao contrário da colonização com *Glomus intraradices* em que a produção e absorção de P não sofreram alteração com a mobilização. Duana et al. (2011) referem que práticas agrícolas com mobilização reduzida e incorporação dos resíduos das culturas são benéficas para as relações de simbiose entre os FMA e as culturas beneficiando o seu crescimento.

O desenvolvimento de FMA nos solos apresenta variações sazonais, tendo-se verificado um maior desenvolvimento das hifas e um maior número de esporos no Outono em relação à Primavera (Gryndler et al., 2006) e está relacionado com o teor da fracção mais facilmente mineralizável do solo (Hršelová et al., 1999) e com o aumento da actividade biológica do solo (Gryndler et al., 2006).

1.6.2 As micorrizas arbusculares e a nutrição das culturas

As micorrizas arbusculares têm um papel importante na aquisição de nutrientes pelas plantas (Marschner, 1996). De entre estes salienta-se não só o P mas também outros nutrientes como N, K, Ca e Mg (Clark & Zeto, 2000) e micronutrientes (Liu et al., 2000). A rede de micélio extrarradicular aumenta consideravelmente o volume de solo explorado pelas raízes, o que melhora o crescimento das plantas em solos mais pobres em nutrientes (Marschner, 1996). Pelo contrário, em ambientes ricos em nutrientes tem sido observado uma redução na acumulação de nutrientes em plantas micorrizadas (Clark, 1997). A colonização micorrízica tem diferentes efeitos na produção vegetal dependendo das culturas e do teor de P do solo. Por exemplo, num ensaio realizado com aplicação de inóculo micorrízico às plantas, verificou-se que a inoculação aumentou a produção da alface (*Lactuca sativa*) e do abutilom

(*Abutilon theophrast*) e não teve efeito significativo na produção da acelga (*Beta vulgaris*) (Koide et al., 2000).

As plantas com MA têm duas vias através das quais os nutrientes (em particular o P) podem ser absorvidos: a via directa e a via através da MA. A via directa envolve transportadores de P na epiderme das raízes e nos pêlos radiculares ocorrendo uma diminuição de P nas proximidades da superfície radicular. Na via através das MA o P é absorvido por transportadores do micélio extrarradicular e através de transportadores de P da planta passa para o seu interior, na zona de contacto com o fungo, ao nível dos arbúsculos nas células corticais da raiz (Smith et al. (2009) citado por Smith et al., 2010). Diversas experiências em vasos revelaram que quando as plantas estabelecem MA num solo pobre em P ocorre um aumento do seu crescimento e de absorção de P comparativamente às plantas controlo não micorrizadas (NMA). Esta resposta positiva explica-se pelo efeito cumulativo de ambas as vias de absorção do P (e de outros nutrientes como o Zn e o N) (Smith et al, 2009; Smith et al. (2009) citado por Smith et al., 2010). No entanto, tal argumento não é válido quando as plantas micorrizadas não crescem mais nem aumentam o seu teor em P, havendo casos em que estas são mais pequenas do que as NMA (Smith et al, 2009). Apesar deste resultado, considera-se que a via de absorção de nutrientes através das MA desempenha um papel importante na absorção de P nas plantas sendo a via directa a que contribui com menor absorção de P (Li et al, 2006). Se a biomassa dos FMA é reduzida, é possível que a resposta negativa em termos de crescimento da planta se deva a uma menor absorção de P não só pela via directa mas também através da MA dado o reduzido volume de raiz colonizada (Smith et al, 2009). No entanto, se a mesma resposta ocorre quando a raiz da planta apresenta elevadas percentagens de colonização pelos FMA estes fungos são considerados, nessas situações, parasitas que “enganam” as plantas em troca de C fornecendo pouco ou nenhum P (Smith et al, 2009; Smith et al. (2009) citado por Smith et al., 2010).

Normalmente a limitação de P nos solos agrícolas é compensada com a incorporação de doses elevadas de P. A eficiência da inoculação e colonização micorrízica pode conduzir a produções similares, reduzindo as doses necessárias de adubação. O objectivo da optimização da colonização micorrízica é obter sistemas agrícolas mais sustentáveis ecologicamente mantendo níveis de produção elevados. Madder et al. (2000) estudaram o efeito da colonização micorrízica numa rotação de hortícolas seguidas por forragens de gramíneas e leguminosas durante sete anos em vários sistemas de produção e concluíram que a percentagem de colonização foi 30 a 60% superior em AB e na agricultura biodinâmica em

relação à agricultura convencional, uma vez que nesta a quantidade de P solúvel no solo foi maior. A agricultura intensiva, permitindo o uso de elevadas quantidades de fertilizantes azotados e fosfatados que reduzem a colonização micorrízica e o desenvolvimento do micélio dos FMA, e que utiliza o melhoramento genético de plantas menos dependentes das MA pode dar origem a uma diminuição da diversidade dos fungos indígenas com consequências nefastas na fertilização particularmente na absorção dos micronutrientes que raramente são usados como fertilizantes (He & Nara, 2007).

1.6.2.1 O papel das micorrizas na absorção de N

As plantas micorrizadas absorvem um maior teor de N de origem orgânica ou inorgânica do que as plantas não micorrizadas (NMA). Por exemplo, milho micorrizado por *Glomus intraradices* (Frey & Schuepp, 1993) revelou uma maior concentração de N do que as mesmas plantas NMA. A absorção de N em plantas micorrizadas pode variar com a espécie de FMA. Por exemplo, a concentração de N no milho colonizado com *Gigaspora margarita* foi maior do que nas plantas colonizadas com *Glomus intraradices* que por sua vez permitiu uma maior acumulação de N no milho do que quando este foi colonizado por *Acaulospora laevis* (Frey & Schuepp, 1993). Estas diferenças podem resultar de diferenças no desenvolvimento do micélio extrarradicular nas diferentes espécies de FMA. As hifas podem contribuir para a assimilação de N inorgânico e aminoácidos se tiverem acesso a zonas do solo inacessíveis para as raízes (Hawkins et al., 2000). Hodge et al. (2001) realizaram uma experiência com *Plantago lanceolata* inoculada com *Glomus hoi* e verificaram que as plantas micorrizadas absorviam três vezes mais N do que as plantas NMA a partir de MO em decomposição, devido à competição entre as hifas e outros microrganismos e ao reduzido diâmetro das hifas, podendo estas mais facilmente penetrar na MO em decomposição. Esta experiência demonstrou que os FMA também promovem a decomposição da MO, provavelmente através da activação das bactérias próximas das hifas absorvendo de seguida o N. Leigh et al. (2009) referem que o N total em *Plantago lanceolata* colonizada por *Glomus hoi* e *Glomus intraradices* não aumenta em relação às plantas NMA, mas o teor de N proveniente de MO em decomposição é superior.

Os FMA contribuem pouco para o aumento da absorção de NO_3^- devido à grande mobilidade destes iões no solo, mas pelo contrário a absorção de NH_4^+ é beneficiada pelos FMA (Hodge et al., 2001). Além disso o N pode ser imobilizado nas hifas e desse modo conservar-se o N no sistema planta/fungo (Hawkins et al., 2000). Contudo o efeito dos FMA na fertilização

azotada é reduzido se forem aplicadas grandes quantidades de N ao solo (Azcón et al., 2008). A relação C/N também é importante na absorção de N pelas plantas micorrizadas pois uma relação C/N elevada diminui a taxa de mineralização, resultando numa quantidade menor de N absorvido pelas plantas (Leigh et al., 2009).

Existe uma relação sinérgica entre os FMA e alguns microrganismos do solo aumentando a absorção de nutrientes pelas plantas. A formação de nódulos nas raízes das leguminosas e a fixação de N₂ por *Rhizobium* são favorecidas pelos FMA. Por exemplo, plantas de soja micorrizadas por *Glomus mosseae* apresentaram maior número de nódulos do que as plantas de soja NMA para níveis de concentração de P idênticos no solo (Brown et al., 1988). Várias experiências têm confirmado os benefícios desta interação FMA-*Rhizobium* para as leguminosas em situações de stress devido à seca e à salinidade (Barea et al., 2005a). Outra interação benéfica para o desenvolvimento das plantas é a que se estabelece entre os FMA e as bactérias do género *Azospirillum* que são bactérias fixadoras de azoto intimamente associadas com as raízes das plantas na rizosfera. Várias experiências demonstram que a inoculação micorrízica promove a aquisição de N (sobretudo nitrato) pelas plantas inoculadas com estas rizobactérias e que os FMA favorecem a instalação destas bactérias enquanto as mesmas favorecem o desenvolvimento das MA (Barea et al., 2005b). Vázquez et al. (2000) referem o aumento de biomassa e de acumulação de N no milho quando duplamente inoculado.

A absorção de N é beneficiada pelos FMA nas plantas em stress hídrico. Subremanian et al. (1999) referem que a colonização micorrízica por *Glomus intraradices* permitiu aumentar a absorção de N no milho sujeito a condições moderadas de secura, evidenciando-se sobretudo o transporte de NO₃⁻ pelo micélio do fungo. Neste estudo também se verificaram concentrações mais elevadas de N nas folhas em relação às raízes nas plantas micorrizadas o que indica que os FMA desempenham um papel importante na translocação de N das raízes para as folhas.

1.6.2.2 O papel das micorrizas na absorção de P

As hifas dos FMA normalmente transportam o P localizado a maiores distâncias do que as plantas não micorrizadas, por exemplo a zona de absorção de P em plantas de trevo branco (*Trifolium repens*) NMA é aproximadamente 10 mm, enquanto no trevo branco micorrizado por *Glomus mosseae* é superior a 110 mm (Li et al., 1991). Por esta razão a absorção de P é superior nas plantas micorrizadas. Joner & Jakobsen (1995) referiram que as plantas de trevo

subterrâneo micorrizadas, nos primeiros estados de crescimento, absorvem uma maior quantidade de P da MO ao contrário das plantas NMA, devendo-se este facto a uma maior exploração de solo através das hifas do fungo. Nurlaeny et al. (1996) verificaram que o aumento de absorção de P por comprimento de raiz foi duas a três vezes superior no milho e na soja micorrizadas em relação às mesmas plantas NMA.

O tipo de fertilização fosfatada influencia o efeito da micorrização. Rubio et al. (2002) referiram que as plantas de trigo (*Triticum aestivum*) inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram um crescimento superior e uma maior absorção de nutrientes, nomeadamente P, K, Al e Mn, quando foram fertilizadas com fosfatos naturais, o que não sucedeu com uma fertilização com P solúvel. O teor de absorção de P depende também da morfologia do sistema radicular. Isobe & Tsuboky (1998) referiram que as raízes das gramíneas absorvem o P mais facilmente do que as leguminosas devido à maior massa radicular das gramíneas. Por sua vez a mobilização do solo destrói as hifas diminuindo a eficiência com que as hifas dos fungos arbusculares vão absorver P além dos limites da rizosfera (Miller, 2000).

A interacção dos FMA com outros microrganismos beneficiando o desenvolvimento das plantas também se verifica na absorção de P. É o caso da relação com certas bactérias que, a partir de fontes de P pouco solúvel, disponibilizam P que por sua vez é absorvido pelo micélio das MA e transferido para as plantas (Barea et al., 2005a). Num ensaio realizado em vasos, Barea et al. (2002) verificaram que a aplicação de fosfato natural em simultâneo com a inoculação de luzerna (*Medicago sativa*) com FMA (*Glomus mosseae*) e bactérias solubilizadoras de P (*Enterobacter* sp.) aumentou a biomassa e a acumulação de P nas plantas.

1.6.2.3 O papel das micorrizas na absorção de outros nutrientes

A absorção dos nutrientes catiões em plantas colonizadas por FMA é variável e depende do tipo de planta e da espécie ou isolado fúngico que estabelece a simbiose. A absorção de K, Ca e Mg aumentou na soja colonizada por *Glomus gigantea* especialmente com teores de P baixos, no entanto os teores de K e Ca diminuíram no milho colonizado por este fungo (Lambert et al., 1979). A absorção de K, Ca e Mg no milho micorrizado por *Glomus etunicatum*, *Glomus diaphanum* e *Glomus intraradices* também aumentou mais em solos ácidos do que em solos alcalinos (Clark & Zeto, 1996).

A extensa colonização micorrízica das raízes permite uma grande área de absorção de micronutrientes pouco móveis como o Fe, Mn, Zn e Cu para os quais a absorção unicamente

através da raiz é limitada (Liu et al., 2000; Azcón et al., 2003). Liu et al. (2000) verificaram que no milho micorrizado com *Glomus intraradices* a absorção de Zn, Cu, Mn, e Fe variou com o teor de P no solo (o qual influencia o desenvolvimento intra e extrarradiculares dos FMA) e com o teor destes micronutrientes adicionados ao solo. Quando aplicados teores reduzidos de P ao solo o desenvolvimento das hifas extrarradiculares foi superior. Com a inoculação micorrízica e a aplicação dos micronutrientes no solo verificou-se um aumento da biomassa da parte aérea. No solo sem adição de micronutrientes o Zn, o Cu e o Fe totais aumentaram no milho micorrizado. A absorção de Mn e de Fe no milho micorrizado foi inferior ao do milho NMA apenas no solo com elevada concentração de micronutrientes que também inibiu o desenvolvimento das hifas extrarradiculares, mas não o crescimento das plantas.

1.6.2.4 As micorrizas arbusculares e a fertilização da alface

Diversas experiências têm comprovado os benefícios das MA na fertilização da alface. Por exemplo, a absorção de N pela alface em condições de stress hídrico é beneficiada pelos FMA. Tobar et al. (1994a) referiram uma acumulação quatro vezes superior de NO_3^- na alface micorrizada nessas condições comparativamente à alface NMA. A identidade dos FMA também influencia a absorção de N em condições de secura, pois verificou-se que *Glomus mosseae* beneficiou mais a absorção de N do que *Glomus fasciculatum*, no entanto ambos os fungos contribuíram para o aumento da biomassa nas alfaces micorrizadas (Tobar et al., 1994b).

Ruiz-Lozano & Azcón (1996) numa experiência com alfaces micorrizadas com diferentes espécies de FMA verificaram que o stress hídrico diminuiu a actividade da enzima nitrato-redutase (ANR) envolvida na assimilação do nitrato nas plantas após a sua absorção. No entanto, esta diminuição foi menor nas alfaces micorrizadas comparativamente às NMA o que justificou o aumento do crescimento e teor de N (maior tolerância à seca) das alfaces micorrizadas, em particular com *Glomus deserticola*. Nesta experiência, Ruiz-Lozano & Azcón (1996) verificaram ainda que, em boas condições hídricas, alfaces NMA fertilizadas com P apresentaram crescimento e teores de P iguais ou superiores ao de alfaces micorrizadas não fertilizadas, mas uma menor ANR. Além disso alfaces colonizadas por diferentes FMA apresentaram diferentes ANR. Ruiz-Lozano & Azcón (1996) sugeriram pois que ou os FMA aumentam a ANR nas plantas que colonizam (independentemente do teor de P) ou os FMA

apresentam esta actividade enzimática por si contribuindo para o desenvolvimento das alfaces mesmo em condições de stress hídrico.

Azcón et al. (2003) estudaram o efeito combinado da fertilização azotada (14, 70 e 126 mg por planta) e fosfatada (3,1 e 15,5 mg por planta) de alfaces micorrizadas e NMA em vaso. Nesta experiência verificou-se que a aplicação de níveis elevados de N e P ao solo provocou uma diminuição da absorção de N, P, K, Mn e Zn nas alfaces micorrizadas e uma inibição da colonização micorrízica. O elevado teor de N e P no solo provocou pois alterações físico-químicas na micorrizosfera reduzindo a disponibilidade de micronutrientes como o Fe e o Mn o que está relacionado com o desenvolvimento da capacidade de imobilização destes micronutrientes pelas populações microbianas da micorrizosfera. Além disso, ao diminuir o micélio extrarradicular a área de absorção de nutrientes como o Fe, Mn e Zn diminuiu. Por outro lado, quando aplicados teores reduzidos de N e P, a presença das MA aumentou a taxa de absorção da maior parte dos nutrientes (P, K, Ca, Mg, Zn e S) o que não se verificou nas alfaces NMA. O resultado foi idêntico com valor muito reduzido de P independentemente do nível de N aplicado. Os teores de N e de P são considerados factores muito importantes na eficiência das MA assim como o equilíbrio entre eles durante as fertilizações. A aplicação de doses elevadas de N e P pode reduzir ou até eliminar o efeito benéfico dos FMA na fertilização da alface (Azcón et al., 2003). Por outro lado, comparando com as necessidades nutricionais das plantas para o seu crescimento, o contributo das MA para a absorção de P é geralmente muito superior ao seu contributo para a absorção de N (George, 1995).

1.6.3 Outros benefícios resultantes da colonização micorrízica

1.6.3.1 O micélio extrarradicular e interacções no solo

As micorrizas desempenham um papel importante na agregação das partículas do solo (Degens et al. 1996) e um maior comprimento das hifas favorece a formação dos agregados. O efeito das hifas na estabilidade da estrutura do solo pode persistir mesmo na ausência de uma cultura e plantas não micorrízicas são beneficiadas quando cultivadas num solo onde previamente existiram culturas com MA (Augé et al., 2001, 2004).

Entre as raízes das plantas e as hifas dos FMA existem diferenças com consequências benéficas para o solo e para as plantas. A densidade das raízes no solo corresponde a valores inferiores a $0,10 \text{ m g}^{-1}$ enquanto a densidade das hifas no solo varia entre $2 - 40 \text{ m g}^{-1}$. A zona de influência da raiz corresponde a cerca de $0,3 \text{ cm}$ enquanto a influência das hifas chega a 25 cm da raiz o que permite uma maior área de absorção de água e nutrientes para as plantas.

Além disso, através do seu extenso micélio e dos seus exudados, os FMA contribuem para o teor de C orgânico no solo bem para além da zona da rizosfera influenciando a actividade de outros organismos do solo (He & Nara, 2007; Smith et al., 2010) e contribuindo para o ciclo dos nutrientes com benefício para o crescimento das plantas (Gange 2000; Gange & Brown, 2002). O diâmetro das hifas varia entre 2 – 20 μm e o das raízes é muito superior correspondendo a valores superiores a 300 μm (Smith et al., 2010). Devido a estas diferenças de tamanho, as hifas proporcionam às plantas com MA o acesso a poros de reduzido diâmetro, inacessíveis às suas raízes, fornecendo-lhes água e outros nutrientes que aí ficam retidos quando o solo seca ou fica mais compacto. Drew et al. (2003) referem mesmo que as hifas têm a capacidade de ajustar o seu diâmetro consoante o tamanho dos poros do solo. Para além da maior tolerância à seca das plantas com MA (Duan et al. 1996; Augé et al., 2001) outros benefícios nas plantas micorrizadas têm sido identificados como a maior tolerância à salinidade (Feng et al., 2002) e aos metais pesados (Weissenhorn et al., 1995).

1.6.3.2 Sanidade das culturas

As micorrizas conferem à planta maior resistência às pragas (Gange, 1994) e aos microrganismos patogénicos do solo (Lingua et al., 2002).

O estabelecimento das micorrizas produz alterações fisiológicas e bioquímicas nas plantas e consequentemente influenciam a comunidade de insectos que lhes está associada. As plantas micorrízicas são alvo de insectos especialistas e com armadura bucal picadora-sugadora, ao contrário das famílias de plantas não micorrízicas onde a maior proporção de insectos são generalistas e apresentam armadura bucal mastigadora (Gange et al., 2002). O tipo de micorriza que as plantas estabelecem também altera a preferência dos insectos. Por exemplo, os insectos com armadura bucal picadora-sugadora preferem as plantas que estabelecem micorrizas arbusculares relativamente a plantas que estabelecem ectomicorrizas (Koricheva et al., 2009).

A maior resistência aos organismos patogénicos do solo pode dever-se a um efeito indirecto devido a melhor fertilização (Karagiannidis et al., 2002) ou ser o resultado da competição entre fungos patogénicos, nemátodes e FMA. Os mecanismos de defesa das plantas também podem estar relacionados com a alteração dos exudados das raízes que provocam alterações na rizosfera microbiana (Norman & Hooker, 2000) ou na bioquímica das raízes (Pozo et al., 2002) desencadeando uma resposta da planta mais rápida à infecção (Whipps, 2004), por exemplo, através da síntese de moléculas defensivas, nas células corticais, induzida pela MA

permitindo uma resistência localizada e sistêmica (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Graham, 2001).

Os FMA exercem controlo sobre vários fungos do solo tais como o *Fusarium oxysporum* (Datnoff et al., 1995), *Rhizoctonia solani* (Kasiamdari et al., 2002) e também sobre algumas bactérias como a *Pseudomonas fluorescens* (Barea et al. 1998). Talavera et al. (2001) também verificaram que as plantas de tomateiro, cujas sementes foram inoculadas com nemátodes do género *Meloidogyne*, apresentaram um crescimento superior e a densidade de nemátodes no solo foi inferior após micorrização com *Glomus mosseae*. Datnoff et al. (1995) verificaram uma diminuição de incidência de necrose do colo e podridão radicular em tomateiros inoculados com *Trichoderma harzianum* e *Glomus intraradices*.

O controlo das pragas e doenças através da micorrização é bastante variável e depende das espécies de FMA envolvidos (Matsubara et al., 2000), sendo uns mais eficientes do que outros, do tipo de agente patogénico, das condições ambientais e das características do solo (Azcón-Aguilar & Barea, 1996), como por exemplo a concentração de nutrientes no solo (Vicari et al., 2002). Em solos pobres em nutrientes a simbiose entre os FMA e as raízes das plantas proporciona maiores benefícios às plantas sendo o investimento nas suas defesas também superior (Gange et al., 2002).

1.7 Objectivos do trabalho

Considerando a importância das MA e da microbiologia do solo para a AB, este trabalho teve como objectivo estudar o papel das micorrizas na nutrição vegetal, e em particular na produtividade de uma cultura de elevado consumo alimentar, a alface (*Lactuca sativa* L.), através de dois ensaios experimentais em vaso. No primeiro ensaio o objectivo foi a avaliação comparativa da colonização micorrízica em alfaces no MPB e no MPC de modo a compreender como o desenvolvimento dos FMA é influenciado pelo tipo de solo e pelo teor de um adubo orgânico (Phenix) e, simultaneamente, para relacionar essas respostas com a produção e teor de nutrientes, nas folhas e nas raízes, da alface. O segundo ensaio teve como objectivo a avaliação do efeito da aplicação de fosfato de Gafsa na produtividade da cultura, em plantas inoculadas e não inoculadas (inóculo micorrízico comercial), no MPB.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional

A variedade de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivada em vaso foi a “Ariel” e os solos utilizados foram retirados de estufas de horticultura no modo de produção biológico e no modo de produção convencional do concelho de Marco de Canaveses.

As diferentes etapas do ensaio experimental decorreram numa estufa não climatizada (Fig. 2) localizada na Escola Superior Agrária de Castelo Branco que se situa a 39° 49’ 12’’ de latitude, -7° 27’ 36’’ de longitude e aproximadamente 400 m de altitude tendo seguido a calendarização apresentada no Quadro 1.

a)



b)



Figura 2. Ensaio experimental numa estufa não climatizada na ESA de Castelo Branco com as alfaces 24 dias após a plantação destinadas à (a) 1ª colheita (28 dias após a plantação) e (b) 2ª colheita (45 dias após a plantação).

Quadro 1. Calendarização das diferentes etapas do ensaio experimental

Operação cultural	DAP*	Ano	Mês	Dia
Sementeira de alface		2010	Fevereiro	20
Colheita de amostras de solo e do fertilizante orgânico			Março	19
Plantação de alface			Março	19
1ª Colheita das alfaces	28		Abril	16
2ª Colheita das alfaces	45		Maio	3

*DAP representa o número de dias após plantação

O ensaio foi conduzido segundo um delineamento experimental com quatro blocos casualizados e uma estrutura factorial de tratamentos com dois factores: solos de explorações com diferentes modos de produção (biológico e convencional) e adubo orgânico Phenix com

três níveis de aplicação de fertilizante orgânico (0, 20, 40 g/planta) correspondentes, aproximadamente, a uma aplicação de 0, 2 e 4 t ha⁻¹ considerando o compasso de 33 cm x 33 cm, que é vulgar para a alface.

2.1.1 Solos

Os solos utilizados na experiência (Fig. 3) foram recolhidos em estufas de explorações hortícolas com aproximadamente dez anos de produção e localizadas na freguesia de Vila Boa do Bispo, no concelho de Marco de Canaveses a 41° 7' 12'' de latitude, -8° 12' de longitude e aproximadamente 300 m de altitude. A Quinta Casal de Matos é a exploração no modo de produção biológico e a Quinta da Chousa encontra-se no modo de produção convencional. Ambos os solos são de origem granítica e rochas afins e a terra para o ensaio foi colhida no dia 12 de Março aleatoriamente a uma profundidade de 0 a 20 cm com uma pá. No local do ensaio a terra foi espalhada no chão, limpa de pedras e homogeneizada. O volume do solo colocado em cada vaso foi de 6600 cm³.



Figura 3. Preparação dos vasos com os diferentes tratamentos.

2.1.1.1 Solo da exploração no modo de produção biológico

Na estufa de agricultura biológica onde foi recolhido o solo da camada superficial (0 - 20 cm) decorria uma rotação de alface, tomate e couve, sendo a terra para o ensaio colhida antes da plantação da cultura de tomate. No solo desta estufa foi incorporado, antes da cultura de alface, composto de equino e calcário Calmag da Agrifértil, proveniente de sedimentos de fósseis de algas marinhas e posteriormente fez-se uma adubação de cobertura com guanito.

2.1.1.2 Solo da exploração no modo de produção convencional

Na estufa de agricultura convencional decorria uma rotação de feijão, nabos e meloa, sendo a terra para o ensaio colhida antes da plantação da cultura de meloa. Neste solo foi incorporado composto de estrume de galinha de dois em dois anos. Seguidamente, antes de fresar foi espalhado um adubo químico composto consoante as necessidades das culturas. Durante o tempo de permanência da cultura foi feita fertilização localizada com adubos solúveis.

2.1.2 Adubo

O adubo orgânico utilizado no ensaio foi o Phenix (Lote PI9209) vendido pela CRIMOLARA e produzido pela Italtollina spa. Este adubo é feito à base de vinhaça concentrada, guano e estrume de galinha e, de acordo com o rótulo comercial, é quimicamente constituído por N-P-K (%): 6-8-15 sendo 5,8 % do N orgânico e possuindo ainda, 3,4 % de MgO e 5 % de CaO. Este fertilizante possui 48 % de matéria orgânica, 7 % de humidade e pH 7,5.

Após pesar a quantidade de solo para cada vaso misturou-se o solo com o fertilizante correspondente a cada vaso num recipiente de dimensões adequadas para proceder à homogeneização da mistura, a qual, foi posteriormente colocada no vaso respectivo (Fig. 4).



Figura 4. Organização dos vasos durante a adição de adubo.

2.1.3 Alfaces

A alface foi semeada em *mottes* a 20 de Fevereiro de 2010, nos viveiros JAD - Semente de Póvoa de Varzim. O substrato utilizado foi produzido pela Gramoflor e é constituído por turfa de sphagnum em diferentes graus de decomposição e ligeiramente enriquecida em nutrientes.

Na sua composição apresenta 0,2 % de azoto orgânico, 34 % de carbono orgânico, 68 % de matéria orgânica, conteúdo em sal inferior a 1,5 g/l e pH (CaCl₂) de 5,0 - 6,5.

A transplantação efectuou-se a 19 de Março de 2010 para os 48 vasos preparados com os diferentes solos e doses de adubo orgânico (Fig. 5). Nesta etapa as alfaces para transplantar foram seleccionadas aleatoriamente mas com o cuidado de serem as mais homogéneas entre si.

a)



b)



Figura 5. Ensaio experimental logo após a plantação das alfaces (a) para a 1^a colheita (28 dias após a plantação) e (b) para a 2^a colheita (45 dias após a plantação).

2.1.4 Rega

Durante a instalação do ensaio, após a preparação dos vasos com o solo e o adubo, adicionou-se água até à capacidade de campo em cada vaso. Posteriormente, as plantas foram sendo regadas de dois em dois ou de três em três dias, conforme a necessidade, de forma que a água não constituísse um factor limitante do crescimento. Procurou-se adicionar a mesma quantidade de água em cada vaso, no entanto, fizeram-se ajustes tendo em conta que os solos possuíam diferentes capacidades de retenção de água e as plantas maiores se associavam a uma maior transpiração. Em finais do mês de Abril, com as elevadas temperaturas verificadas, as plantas foram regadas todos os dias. A água de rega foi da rede pública.

2.1.5 Monitorização da temperatura

A temperatura do ar foi registada com um termómetro de registo de temperatura máxima e temperatura mínima. O mesmo tipo de termómetro foi utilizado para o registo diário da temperatura do solo a 10 cm de profundidade. Com base nas temperaturas máximas e mínimas registadas calcularam-se as temperaturas médias diárias.

2.1.6 Controlo de infestantes e cuidados fitossanitários

As infestantes que emergiram foram imediatamente removidas do solo de forma a não competirem com as alfaces por nutrientes.

Durante a rega evitou-se molhar as folhas inferiores, levantando-as cuidadosamente, de forma a evitar um ambiente húmido propício a doenças.

2.1.7 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais das características do solo, do adubo e das plantas realizaram-se no Laboratório da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima segundo a metodologia aí usada.

2.1.7.1 Caracterização físico-química dos solos

Colheita de amostras

A terra dos solos biológico e convencional foi espalhada no chão, seguidamente foram colhidas aleatoriamente cerca de 20 a 30 porções para um balde onde a terra foi homogeneizada e da qual se retiraram aproximadamente 500 g. Esta amostra foi dividida numa amostra de 400 g e em outra de 100 g que de imediato foram conservadas, respectivamente, no frigorífico a 4 °C e congeladas a -20 °C. Este processo repetiu-se seis vezes. As amostras de 400 g destinaram-se à determinação de pH, condutividade eléctrica e teor de matéria seca. A amostra seca produzida, depois de moída em micromoinho de laboratório em crivo de 1 mm, destinou-se à determinação dos teores de matéria orgânica, P₂O₅ e K₂O, à digestão sulfúrica para determinação do N e do P e à digestão nitro-perclórica para determinação do K, Ca, Mg e Fe. Por sua vez, com base nas amostras de 100 g, utilizaram-se 20 g para a extracção com KCl e posterior determinação do azoto nítrico e amoniacal por espectrofotometria de absorção molecular.

Metodologia laboratorial para as análises dos solos

pH

A determinação do pH efectuou-se num extracto de solo obtido misturando a amostra de solo com água destilada e desionizada (na proporção de 1 volume de amostra para 5 volumes de água), e homogeneizando-a a 22 °C. A leitura do pH foi feita sobre a suspensão com um potenciómetro e um eléctrodo combinado para pH.

Condutividade eléctrica (CE)

A determinação da condutividade eléctrica realizou-se no mesmo extracto utilizado para a determinação do pH. A leitura da CE foi realizada sobre a suspensão com um condutivímetro e um eléctrodo com sonda de temperatura associada tendo-se ajustado o resultado à temperatura de 25 °C.

Teor de matéria seca (MS)

A determinação do teor de MS dos solos foi feita por secagem a 105 °C durante 48 horas em estufa ventilada. Por diferença de peso entre a amostra inicial e final determinou-se a percentagem de MS da amostra.

Teor de matéria orgânica

O método usado para determinação da matéria orgânica (MO) total do solo consistiu em dosear o carbono orgânico total e multiplicar o valor correspondente pelo factor de “Van Bemmelen” de 1,724. Para dosear o carbono aplicou-se o método de Tinsley para calibração que consistiu resumidamente em duas etapas: oxidação da MO por digestão com dicromato de sódio; titulação final do excesso do dicromato de sódio com o sulfato de ferro – amoniacal (sal de Mohr), na presença do indicador difenilamina. Uma vez obtido o valor de dicromato de sódio gasto na oxidação do carbono calculou-se a percentagem de carbono tendo-se aplicado o factor de conversão de dicromato de sódio em carbono.

Determinação do P₂O₅

Na determinação do fósforo disponível utilizou-se o método de Egnér-Riehm em que a extracção do fósforo foi efectuada com uma solução de lactato de amónio e ácido acético tamponizada a pH compreendido entre 3,65 e 3,75. Para quantificar o fósforo no extracto aplicou-se o método colorimétrico (espectrofotometria UV VIS).

Determinação do K₂O

Na determinação do potássio disponível também se aplicou o método de Egnér-Riehm descrito no ponto anterior. O potássio foi quantificado directamente por fotometria de chama.

Digestão sulfúrica para determinação dos teores totais de azoto e fósforo

De cada amostra seca moída pesaram-se 0,2 g de solo em tubos Nessler e acrescentaram-se 4 cm³ de ácido sulfúrico seguido de 3 cm³ de peróxido de hidrogénio a 30 % de uma forma gradual. O processo de digestão decorreu numa placa de aquecimento própria que foi

programada para 120 °C durante 1 hora e 320 °C durante 3 horas. No final da digestão e após arrefecimento acertou-se o volume com água desionizada ultra-pura até aos 50 cm³ tendo-se procedido de seguida à filtração. Os filtrados foram enviados para o Laboratório de Solos da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) onde foram analisados com um espectrofotómetro de absorção molecular para determinação dos teores de N e P.

Digestão nitro-perclórica para determinação dos teores totais de K, Ca, Mg e Fe.

De cada amostra seca moída pesaram-se 0,2 g em tubos Nessler e acrescentaram-se 6 cm³ de ácido nítrico a 65 %. O processo de digestão decorreu numa placa própria e foi programada para 50 °C durante 30 minutos, 150 °C durante 30 minutos e 165 °C durante 30 minutos. No final da digestão adicionaram-se 4 cm³ de ácido perclórico a 70 % a cada tubo seguindo-se nova fase de digestão de 165 °C durante 30 minutos, 180 °C 60 minutos, 190 °C durante 60 minutos e 200 °C durante 30 minutos. No final da digestão e após arrefecimento acrescentaram-se 10 cm³ de água ultra-pura a cada tubo e programou-se a placa a 120 °C durante 60 minutos. Após arrefecimento acertou-se o volume com água desionizada ultra-pura até aos 50 cm³ tendo-se procedido de seguida à filtração. Os filtrados foram enviados para a UTAD onde foram analisados com um espectrofotómetro de absorção molecular para determinação dos teores totais de K, Ca, Mg e Fe.

Extracção em KCl para determinação do azoto mineral (N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻)

Pesaram-se 20 g de cada amostra que fora conservada no congelador, para frascos de polietileno e adicionaram-se 100 ml de solução de KCl 2M. Os frascos fechados foram colocados num agitador mecânico durante 60 minutos sendo o conteúdo depois filtrado, com filtros VWR de 12,15 µm lavados em solução de KCl. Depois de refrigerados os filtrados seguiram para a UTAD onde a determinação dos teores de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ foi efectuada por espectrofotometria de absorção molecular.

2.1.7.2 Análise das características do adubo

Colheita de amostras

Do saco de adubo Phenix utilizado no ensaio constituíram-se 6 amostras de 400 g e 6 amostras de 100 g que foram conservadas como descrito para os solos, para determinação do pH, CE, MS, MO, N, P, K, Ca, Mg e Fe.

Metodologia laboratorial para análise das características do adubo

A metodologia das análises referidas no ponto anterior encontra-se descrita na metodologia laboratorial para as análises dos solos pois os processos são idênticos com excepção dos seguintes métodos: determinação da MS em que o adubo foi seco a 65 °C em estufa ventilada até peso constante; determinação da MO através da diferença de peso entre a amostra antes e depois da incineração em mufla a 550 °C durante 4 horas seguida de arrefecimento em excicador sob vácuo.

2.1.7.3 Análise das características da alface

Colheita de amostras

No dia da transplantação, 19 de Março de 2010, colheram-se dos *mottes* quatro amostras de 10 plantas seleccionadas aleatoriamente e com o cuidado de serem homogéneas entre si e representativas das que foram transplantadas. Para cada amostra determinou-se o peso fresco das folhas e das raízes após lavagem e procedeu-se à sua secagem numa estufa durante dois dias a 65 °C. Deste modo, calculou-se a percentagem de matéria seca e obteve-se a matéria seca necessária às análises laboratoriais para quantificação de N, P, K, Ca, Mg e Fe na parte aérea e nas raízes.

A 16 de Abril e a 3 de Maio de 2010 fizeram-se a primeira e a segunda colheitas, respectivamente 28 e 45 dias após a transplantação. As raízes foram retiradas com torrão do vaso que foi mergulhado em água a fim de separar a terra das raízes sem as danificar e posteriormente foram lavadas cuidadosamente com água corrente. De seguida a parte aérea e as raízes foram pesadas e processadas como anteriormente descrito para determinação do teor de MS e obtenção de MS para análise.

Metodologia laboratorial para análise das características da alface

As amostras secas das folhas e raízes das alfaces colhidas foram moídas num moinho Retsch GM 200 durante 5 segundos a 4000 rpm. A matéria seca e moída de cada amostra ficou guardada em sacos bem fechados e posteriormente procedeu-se à digestão sulfúrica para determinar N e P e à digestão nitro-perclórica para obter K, Ca, Mg e Fe. Os métodos analíticos utilizados foram idênticos aos descritos na metodologia laboratorial para as análises dos solos.

2.1.7.4 Avaliação da colonização micorrízica nas raízes da alface

Colheita de amostras

No dia da transplantação, a 19 de Março de 2010, colheram-se dos *mottes* quatro amostras cada uma com 3 alfaces seleccionadas aleatoriamente e com o cuidado de serem homogéneas entre si e representativas das que foram transplantadas. Separaram-se as folhas das raízes e mergulharam-se os *mottes* num recipiente com água para remover o substrato sem danificar as raízes. Seguidamente removeram-se pequenas porções de diferentes zonas de cada raiz e procedeu-se à fixação das amostras em etanol a 50 %. Este processo repetiu-se em cada colheita sendo as amostras individuais (Fig. 6).



Figura 6. Preparação de amostras da raiz.

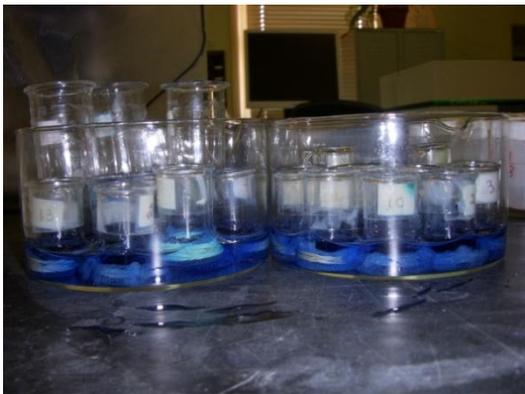
Clareamento e coloração das raízes

A formação de micorrizas arbusculares (e de endomicorrizas em geral) não induz alterações morfológicas nas raízes colonizadas. Por isso, para avaliar a colonização micorrízica, é necessário utilizar a técnica de clareamento e coloração baseada no método originalmente descrito por Phillips & Hayman (1970), modificado por Koske & Gemma (1989) e por Vierheilig et al. (1998).

A etapa de clareamento consistiu em colocar as amostras das raízes (lavadas para remover o fixador) em tubos abertos na extremidade superior e vedados com gaze na extremidade inferior, numa solução aquosa de KOH a 5 % (p/v) e levar à estufa a 90 °C, durante 60 minutos. A solução de KOH remove o conteúdo celular das células vegetais e ajuda a remover taninos e outros pigmentos, deixando as estruturas fúngicas e as paredes vegetais intactas. De seguida lavaram-se as raízes várias vezes em água corrente e deixaram-se a acidificar em

solução de HCl a 1 % durante a noite (12-16 h). Esta etapa foi necessária para permitir a adesão do corante às estruturas fúngicas. Após a acidificação, transferiram-se as raízes directamente para uma solução de tinta Parker 2 % acidificada com 1 % de HCl e colocaram-se na estufa a 60 °C, durante 1 hora. O corante corou selectivamente as estruturas fúngicas em virtude da afinidade pela quitina, constituinte da parede dos fungos. A tinta Parker azul foi usada em substituição do azul de tripano (classificado como provável agente carcinogénico humano), uma vez que não é tóxica e é mais económica. Após a coloração removeu-se o excesso de corante, lavando-se as raízes várias vezes em água corrente, e transferiram-se as mesmas para uma solução acidificada de glicerol - solução descolorante (glicerol a 50 % + 4 % de ácido láctico) (Fig. 7). Após algumas horas colocaram-se as amostras em frascos com solução descolorante ficando assim preservadas, ao abrigo da luz, até serem observadas.

a)



b)

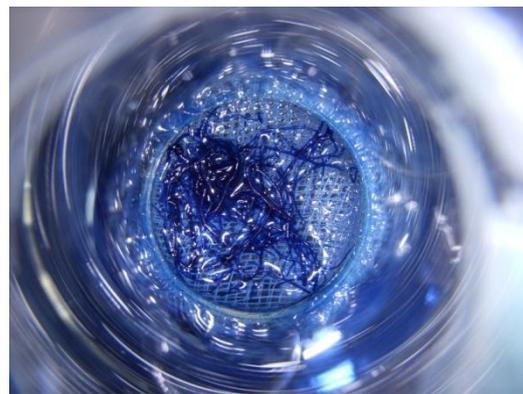


Figura 7. Etapa do processo de coloração das raízes: a) Conjunto de diversos tubos com amostras de raízes colocados em tina com solução descolorante; b) Pormenor de uma amostra de raiz num tubo com gaze na extremidade inferior.

Quantificação da colonização micorrízica

Colocaram-se vários fragmentos de raízes (após clareamento e coloração) numa lâmina e montaram-se em solução descolorante. Observaram-se as raízes ao microscópio óptico composto de 3 em 3 mm, registando-se a presença de arbúsculos ou de hifas cada vez que o eixo central do campo visual do microscópio intersectava uma raiz (Fig. 8). A percentagem de raiz colonizada (% RC) foi obtida pela seguinte expressão $\% RC = \text{Número de intersecções com arbúsculos ou hifas} / \text{Número total de intersecções}$.

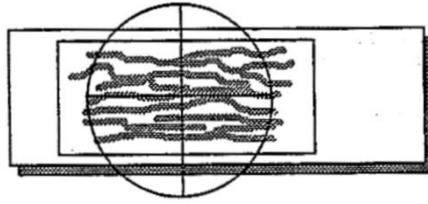


Figura 8. Intersecção das raízes com o eixo central do campo visual do microscópio.

2.1.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados experimentais realizou-se utilizando a análise de variância com o programa SPSS, v17. A análise foi realizada com base num modelo com blocos casualizados e 2 factores com estrutura factorial de tratamentos, sendo utilizada a menor diferença significativa ($p < 0,05$) para comparar as médias dos resultados dos diferentes tratamentos.

2.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa

A variedade de alface cultivada em vaso foi a “Maravilha de verão” e a terra utilizada foi retirada da estufa de horticultura no modo de produção biológico da Quinta Casal de Matos do concelho de Marco de Canaveses.

As diferentes etapas desta segunda experiência decorreram noutra estufa não climatizada (Fig.9) da Escola Superior Agrária de Castelo Branco tendo seguido a calendarização apresentada no Quadro 2.



Figura 9. Ensaio experimental no abrigo da ESA de Castelo Branco.

Quadro 2. Calendarização das diferentes etapas do ensaio experimental.

Operação cultural	DAP*	Ano	Mês	Dia
Sementeira de alface		2010	Março	23
Colheita de amostras de solo			Abril	23
Colheita de amostras de alfaces			Abril	24
Plantação de alface			Abril	24
Inoculação das alfaces			Junho	1
1ª Colheita de alfaces	28		Maiο	22
2ª Colheita de alfaces	53		Junho	16

*DAP representa o número de dias após plantação.

O ensaio foi conduzido segundo um delineamento experimental com quatro blocos casualizados e uma estrutura factorial de tratamentos com dois factores: inóculo micorrízico com dois níveis - plantas inoculadas e plantas não inoculadas e fertilização com fosfato de Gafsa com três níveis de aplicação - 0, 4, 8 g/planta, o que se aproxima de 0, 100, 200 kg P₂O₅ ha⁻¹ considerando o compasso de 33 cm x 33 cm que é vulgar para a alface.

2.2.1 Solo

O solo utilizado no ensaio teve a mesma proveniência que o solo utilizado anteriormente referido no ponto 2.1.1.1; a quantidade de solo em cada vaso foi de 6,75 kg (Fig. 10).



Figura 10. Pesagem do solo para cada vaso.

2.2.2 Adubo

O adubo utilizado foi o fosfato de Gafsa cuja designação comercial é Fertigafsa e é comercializado pela ADP Fertilizantes S.A. É um adubo fosfatado com a designação de fosfato natural macio com a formulação de 0-26,5-0. Este fertilizante está autorizado para

utilização em modo de produção biológico e possui as seguintes características: 26,5 % de pentóxido de fósforo (P_2O_5) total, 15 % de pentóxido de fósforo (P_2O_5) solúvel em ácido fórmico a 2 %, grau de moenda com 90 % de passagem através de um crivo com uma abertura de malha de 0,063 mm. O processo de aplicação do adubo decorreu de igual modo ao descrito no ponto 2.1.2.

2.2.3. Alfaces

A sementeira de alface variedade “Maravilha de verão” foi efectuada a 23 de Março de 2010 na estufa de horticultura no modo de produção biológico da Quinta Casal de Matos, em tabuleiros de polietileno com alvéolos com a dimensão de 35 ml. O substrato biológico usado foi o Tray mix, fabricado por Bas Van Buuren, composto 100 % de turfa e contendo 34 % de carbono, 0,2 % de azoto orgânico e 60 % de matéria orgânica, o pH entre 5 e 6,5 e o índice de salinidade inferior a 1,5 g/l. As sementes foram cobertas com vermiculite.

A transplantação efectuou-se a 24 de Abril de 2010 para os 48 vasos preparados com o solo e o adubo (Fig. 11). Nesta etapa as plantas foram seleccionadas aleatoriamente mas com o cuidado de serem as mais homogéneas entre si.

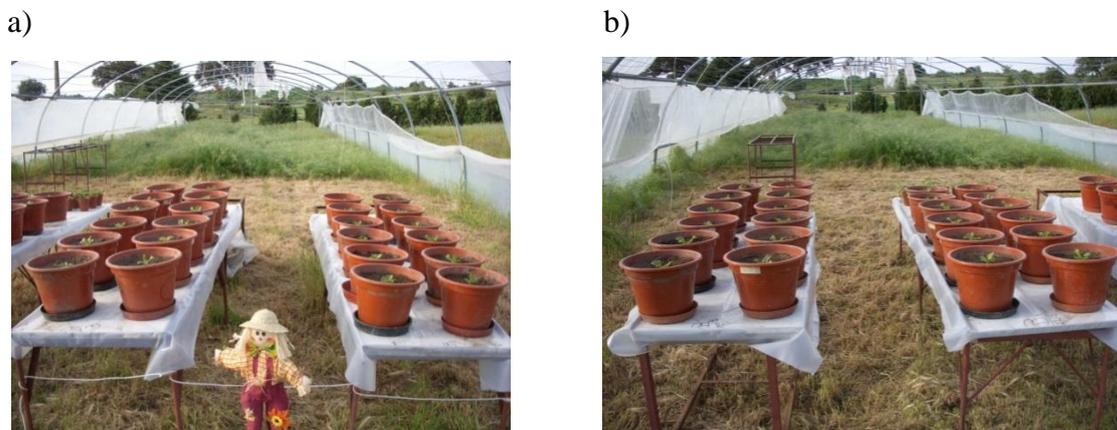


Figura 11. Ensaio experimental logo após a plantação com as alfaces (a) para a 1ª colheita (28 dias após a plantação) e (b) para a 2ª colheita (53 dias após a plantação).

2.2.4 Inóculo micorrízico

O inóculo micorrízico aplicado foi o Glomygel Hortalizas em embalagem de 250 cc com mais de 250 propágulos. Este inóculo é produzido e comercializado pela Mycovitro S.L. *Biotecnologia ecológica* e foi aplicado 1 ml da solução gel junto da raiz das plantas a inocular com o auxílio de uma pipeta (Fig. 12) no dia 1 de Junho, 7 dias após a transplantação.



Figura 12. Aplicação do inóculo micorrízico às alfaces 7 dias após a transplantação.

2.2.5 Rega

A rega decorreu de modo idêntico ao descrito no ponto 2.1.4 à exceção de que as plantas foram regadas todos os dias ou mesmo duas vezes por dia conforme necessário.

2.2.6 Monitorização da temperatura

A monitorização da temperatura decorreu de igual modo ao descrito no ponto 2.1.5.

2.2.7 Controlo de infestantes e cuidados fitossanitários

Para além do referido no ponto 2.1.6 fizeram-se dois tratamentos com o insecticida Decis, comercializado pela Bayer, em virtude de terem aparecido vários focos de afídeos (*Myzus persicae*). O produto foi aplicado a 1 e 2 de Junho de 2010 e em todas as plantas.

2.2.8 Análises laboratoriais

2.2.8.1 Caracterização físico-química do solo

A metodologia descrita no ponto 2.1.7.1 relativa à caracterização do solo foi também aqui aplicada.

2.2.8.2 Análise das características da alface

Colheita de amostras

A colheita de amostras antes da transplantação ocorreu no dia 24 de Abril de 2010 conforme a metodologia descrita no ponto 2.1.7.3. A primeira colheita realizou-se no dia 22 de Maio e a segunda a 16 de Junho de 2010, respectivamente 28 e 53 dias após a transplantação. Após as

colheitas das alfaces, a lavagem das raízes decorreu com o auxílio de dois crivos de 2 mm de malha a fim de minimizar a perda de raízes (Fig. 13).



Figura 13. Operação de lavagem das raízes: a) raiz retirada do balde com água onde fora colocado o torrão do vaso; b) lavagem da raiz com água corrente e com o auxílio de crivos; c) raiz limpa.

Metodologia laboratorial para análise das características da alface

A metodologia descrita no ponto 2.1.7.3 relativa à análise das características da alface foi também aqui aplicada.

2.2.9 Análise estatística

A metodologia descrita no ponto 2.1.8 foi também aqui aplicada.

3.RESULTADOS

3.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional

3.1.1 Temperatura do ar, características dos solos e do adubo orgânico

Durante a realização do ensaio as temperaturas médias diárias mais elevadas do ar e do solo foram, respectivamente, 26 e 24,7 °C e as mais baixas foram 12 °C para ambos (Fig. 14).

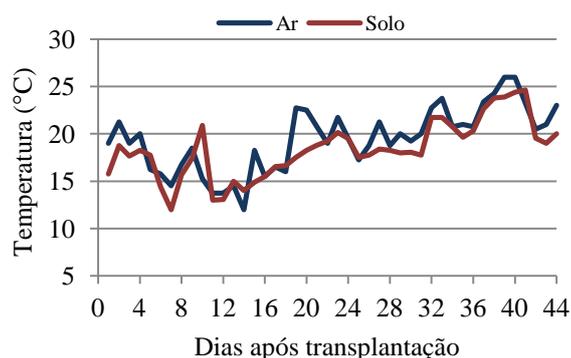


Figura 14. Temperaturas médias diárias do ar e do solo durante o ensaio.

As características físicas e químicas dos solos utilizados no ensaio e do adubo orgânico Phenix estão representadas no quadro 3.

Quadro 3. Características dos solos e do adubo Phenix.

		Solo biológico		Solo convencional		Adubo Phenix	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
MS	(%)	81,9	0,9	89,3	0,4	92,2	<0,1
pH		7,1	<0,1	6,3	<0,1	5,7	<0,1
CE	(dS m ⁻¹)	0,6	<0,1	0,6	<0,1	50,1	1,4
MO	(g kg ⁻¹ ms)	64,5	0,5	26,5	0,1	546,3	11,2
N	(g kg ⁻¹ ms)	2,4	0,6	1,7	0,6	39,5	11,5
P	(g kg ⁻¹ ms)	0,9	0,1	0,9	0,5	30,3	7,7
K	(g kg ⁻¹ ms)	3,1	2	5,2	2,6	30,0	13,2
Ca	(g kg ⁻¹ ms)	2,1	0,9	2,8	1,7	23,3	8,3
Mg	(g kg ⁻¹ ms)	2,1	1,5	3,0	1,7	4,0	0,2
Fe	(g kg ⁻¹ ms)	2,3	1,3	3,8	0,7	0,6	0,1
N-NH ₄ ⁺	(mg kg ⁻¹ ms)	7	0,8	3,1	0,4	18394,0	6933,0
N-NO ₃ ⁻	(mg kg ⁻¹ ms)	46,1	2,1	81,4	3,3	80,4	5,5
C/N		15,5	0,5	9,2	0,1	8,0	0,6

O solo biológico (SB) apresentou teores de matéria orgânica (MO) e de N-NH_4^+ , superiores, em mais do dobro, em relação aos do solo convencional (SC) que por sua vez apresentou um teor de N-NO_3^- bastante superior ao do SB. O teor de N foi superior no SB assim como o teor de humidade e o pH.

O adubo Phenix apresentou uma constituição de 3,9 % de N, 3 % de P e 3 % de K correspondendo a valores muito inferiores de N e K em relação aos valores de $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$: 6-8-15 % apresentados pelo rótulo comercial. A condutividade eléctrica (CE), e teores de N-NH_4^+ são elevadíssimos em relação aos valores máximos recomendados de CE inferior a 3 dS m^{-1} (Soumaré et al., 2002), e de N-NH_4^+ inferior a 400 mg kg^{-1} (Zucconi et al., 1987).

3.1.2 Peso fresco e peso seco da alface

Os valores de produção de alface no solo biológico (SB) foram sempre superiores aos obtidos no solo convencional (SC) independentemente da dose de adubo orgânico aplicada (0, 2 ou 4 t ha^{-1}). No entanto, na 1ª colheita, apenas se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Fig. 15) entre as alfices no SB fertilizadas com a dose de 2 t ha^{-1} de adubo e as alfices no SC fertilizadas com a dose de 4 t ha^{-1} . Na 2ª colheita verificaram-se diferenças significativas de produção entre as alfices produzidas no SC com a aplicação de 2 e de 4 t ha^{-1} de adubo e as alfices dos restantes tratamentos, nos quais, a produção foi superior. Isto é, a produção de alface diminuiu com a aplicação de adubo orgânico (Phenix) ao solo convencional.

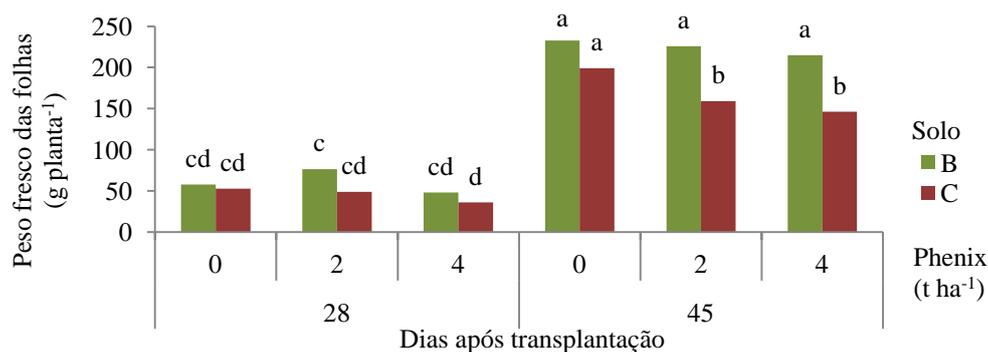


Figura 15. Peso fresco das folhas da alface, 28 e 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha^{-1}) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

A produção da alface, para a média do solo biológico (SB) e do solo convencional (SC), diminuiu com a aplicação de adubo (Fig. 16a) respectivamente 10,9 % e 16,3 % para as doses de 2 e 4 t ha^{-1} em relação ao tratamento não fertilizado, verificando-se uma diferença

significativa ($p < 0,05$) com a aplicação de 4 t ha^{-1} em relação ao solo de referência. Por outro lado, a produção de alface para a média das doses de Phenix, foi superior no SB em 33,4 % (Fig. 16b) em relação à produção no SC ($p < 0,05$).

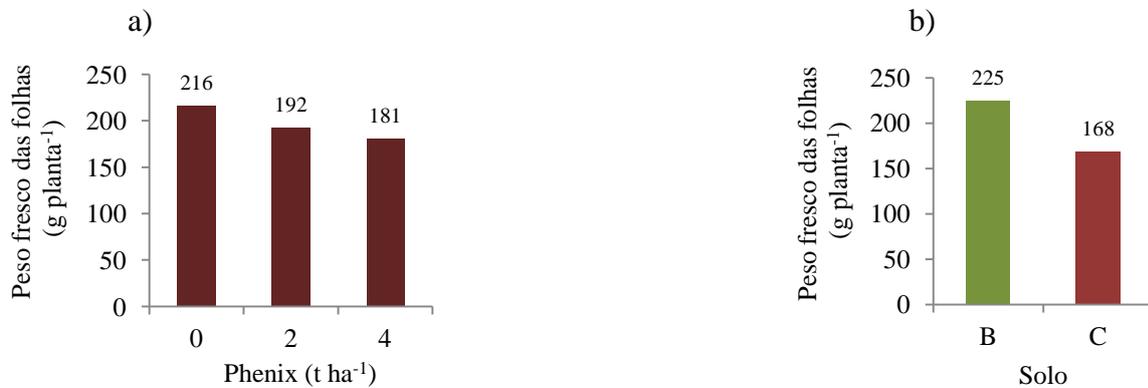


Figura 16. Peso fresco das folhas da alface, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Em relação ao peso seco, para o mesmo teor de Phenix apenas se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o peso seco das folhas no SB e SC com a aplicação de 4 t ha^{-1} de Phenix (Fig. 17).

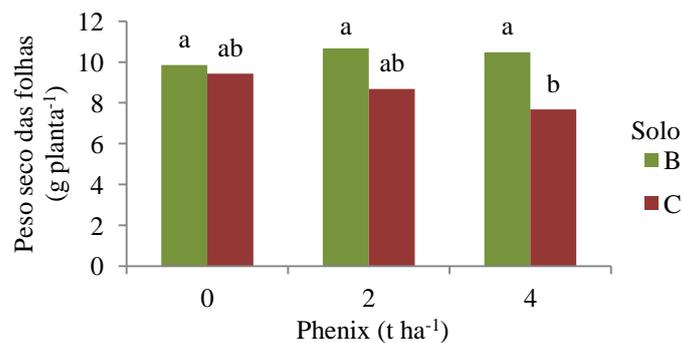


Figura 17. Peso seco das folhas da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix ($0, 2$ e 4 t ha^{-1}) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

O peso fresco das raízes das alfaces produzidas no SB foi superior ($p < 0,05$) ao obtido no SC (Fig. 18), na 2^a colheita, independentemente da dose de adubo orgânico aplicada ($0, 2$ ou 4 t

ha⁻¹). Para o conjunto das doses de Phenix os valores de peso fresco das raízes no SB aumentaram 70,2 % em relação aos obtidos no SC (Fig. 19b).

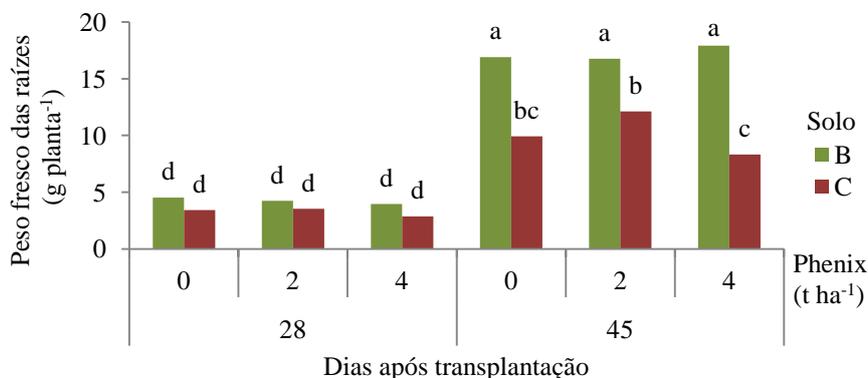


Figura 18. Peso fresco das raízes da alface, 28 e 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Para o conjunto dos dois solos, a aplicação de doses crescentes de adubo Phenix não originou diferenças significativas (p < 0,05) entre os valores de peso fresco das raízes da alface (Fig. 19a).

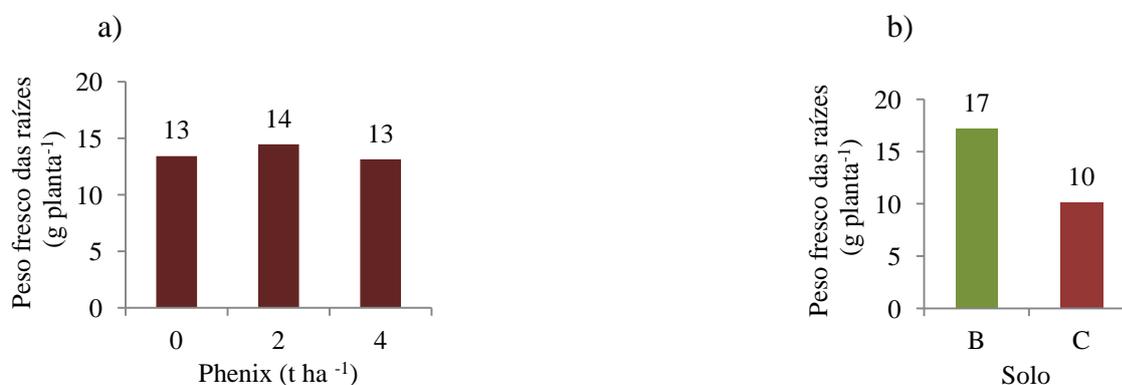


Figura 19. Peso fresco das raízes da alface, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

O peso seco das raízes da alface foi superior no SB em relação ao obtido no SC (Fig. 20) registando-se diferenças significativas (p < 0,05) entre os valores correspondentes ao SB e SC no tratamento de controlo não fertilizado, 1,3 e 1 g planta⁻¹ respectivamente, e no tratamento com aplicação de 4 t ha⁻¹, 1,1 e 0,7 g planta⁻¹ respectivamente. Para o conjunto dos dois solos,

o peso seco das raízes diminuiu com a aplicação de doses crescentes de adubo sem no entanto se registarem diferenças significativas.

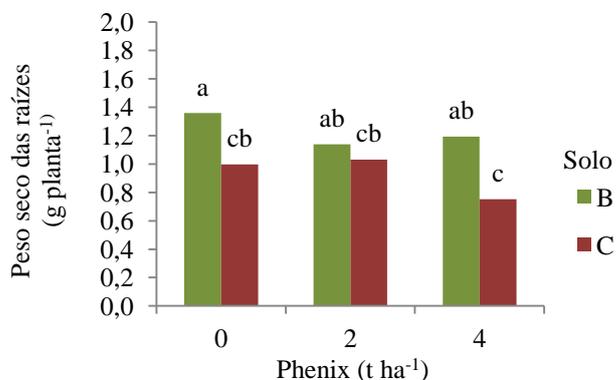


Figura 20. Peso seco das raízes da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

3.1.3 Colonização micorrízica das raízes da alface

As raízes das alfaces produzidas no SB não fertilizado apresentaram uma percentagem de colonização micorrízica superior (p < 0,05) às percentagens de colonização registadas nas alfaces dos restantes tratamentos (Fig. 21). Ao contrário da colonização micorrízica das raízes das alfaces no SC, no qual a colonização micorrízica foi muito baixa em qualquer dos tratamentos, incluindo o controlo, no SB a colonização diminuiu com a aplicação de doses crescentes de adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) variando entre 4,7 % e 1,3 %.

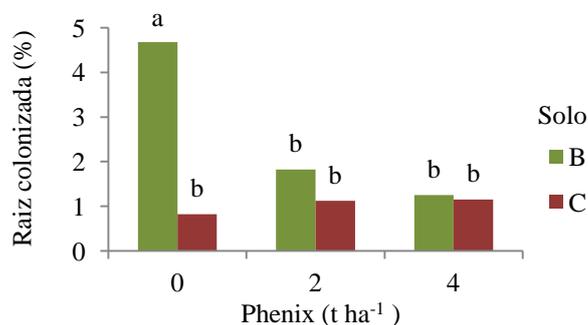


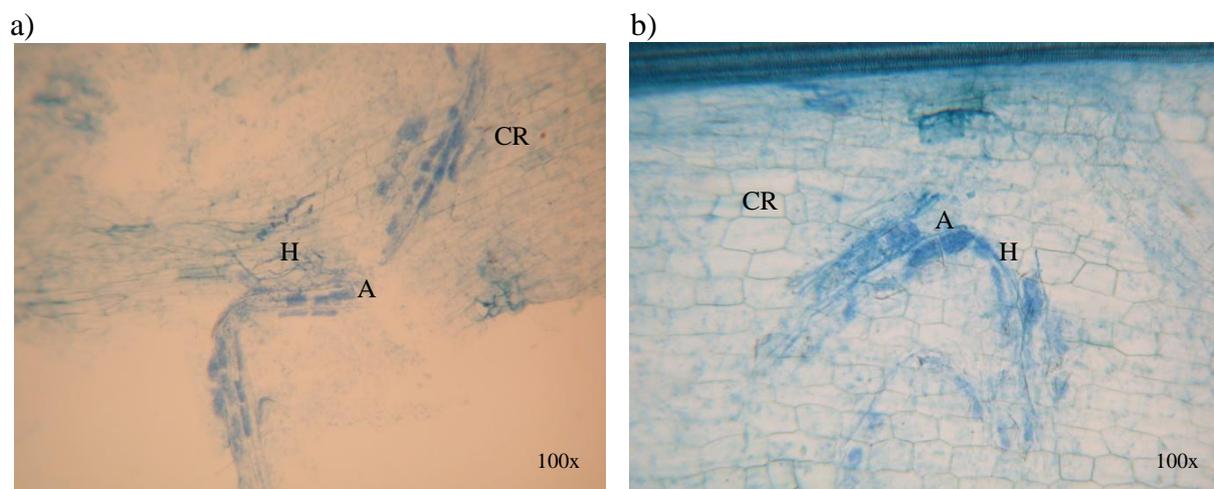
Figura 21. Percentagem de raiz colonizada pelos FMA, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Considerando as médias das percentagens de colonização das raízes das alfaces nos tratamentos com 0, 2 e 4 t ha⁻¹, para a média dos SB e SC (Fig. 22a), verificou-se que a percentagem de raiz colonizada diminuiu com a aplicação de doses crescentes de adubo (0, 2 e 4 t ha⁻¹) registando-se diferenças significativas (p <0,05) apenas entre o valor obtido no tratamento de controlo sem fertilização e os obtidos nos restantes tratamentos. Por outro lado a percentagem de raiz colonizada foi superior (p <0,05) nas alfaces no SB comparativamente ao valor obtido nas alfaces no SC (Fig. 22b).



Figura 22. Percentagem de raiz colonizada pelos FMA, 45 dias após a transplantação, (a) com aplicação de doses crescentes do adubo Phenix para a média do solo biológico e do solo convencional e (b) no solo biológico (B) e no solo convencional (C) para a média das doses de Phenix.

Durante a quantificação da percentagem das raízes colonizadas pelos FMA registou-se fotograficamente ao microscópio óptico composto a presença de arbúsculos, hifas e esporos (Fig. 23).



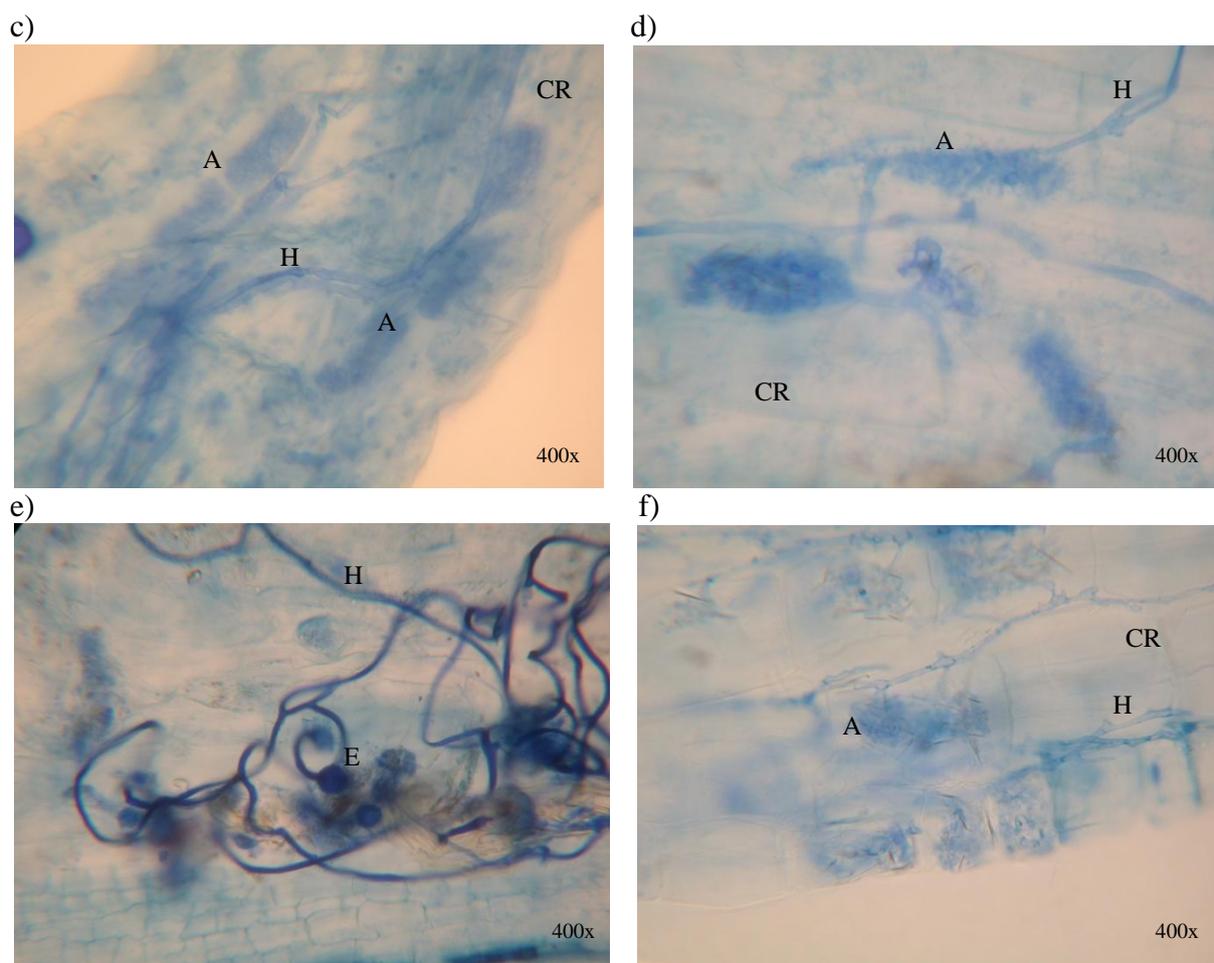


Figura 23. Aspectos da colonização micorrízica nas raízes de alface, 45 dias após a transplantação. A- arbúsculo, E- esporo extrarradicar, CR- cortex radicular.

3.1.4 Teor de nutrientes nas folhas e nas raízes da alface

Relativamente ao teor de nutrientes nas folhas da alface (Fig. 24), apenas se verificaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no caso do P e do Fe.

Os teores de P encontrados nas folhas das alfaces produzidas no SB e fertilizadas com 2 e 4 t ha⁻¹ de Phenix foram idênticos mas numericamente superiores ao obtido no tratamento controlo. Nas alfaces produzidas no SC o teor de P aumentou com a aplicação de doses crescentes de Phenix, no entanto apenas se registaram diferenças significativas entre os teores obtidos nos tratamentos com 0 e 4 t ha⁻¹ de Phenix. O Fe encontrou-se em valores muito reduzidos nas folhas da alface apresentando valores significativamente superiores no tratamento com SC com a aplicação de 2 t ha⁻¹ de Phenix em relação aos restantes tratamentos. O teor de K nas alfaces produzidas no SB foi sempre superior em relação ao das alfaces no SC, apesar de as diferenças não serem significativas.

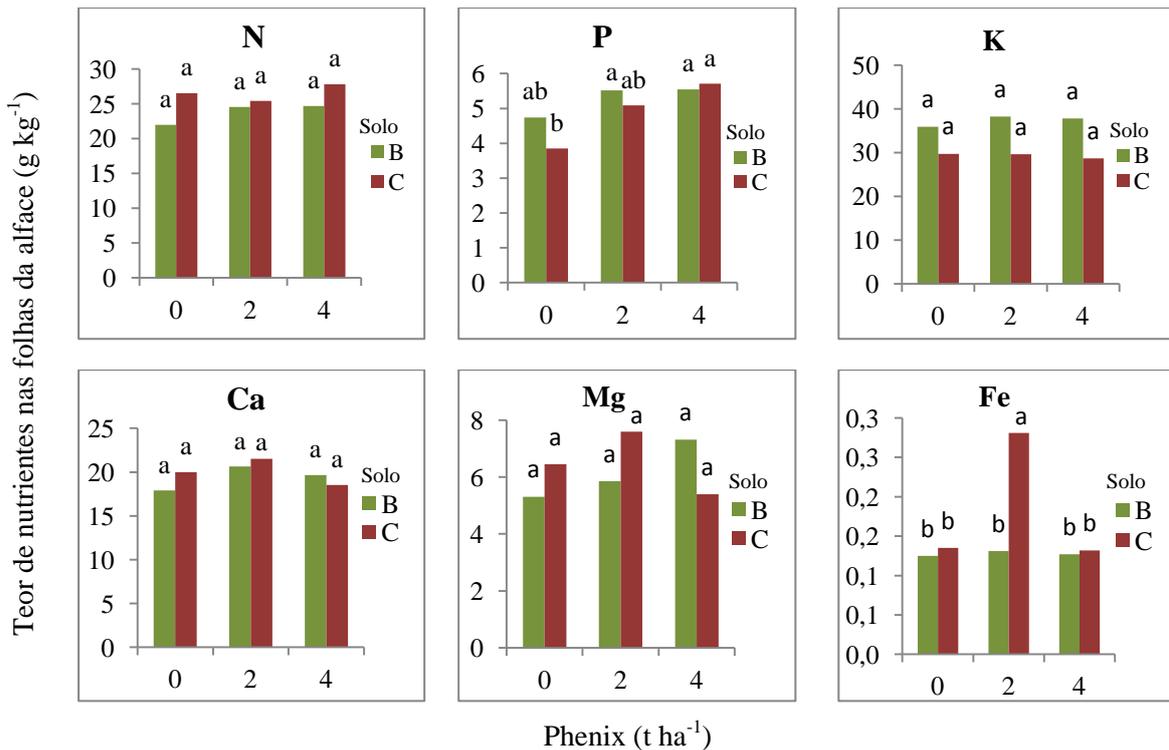


Figura 24. Teor de nutrientes nas folhas da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Os teores de nutrientes nas raízes da alface na 2ª colheita encontram-se representados na Fig. 25. O teor de N foi superior ($p < 0,05$) nas raízes das alfaces no SC com a aplicação de 4 t ha⁻¹ de Phenix em comparação com o valor obtido nos tratamentos de SC com 0 e 2 t ha⁻¹ de Phenix. O teor de P nas raízes, no tratamento controlo e com a aplicação de 2 t ha⁻¹ de Phenix foi significativamente superior no SB em comparação com o teor obtido no SC. Por outro lado também se verificou que os teores de P nas raízes das alfaces produzidas no SB com 2 t ha⁻¹ de Phenix e no SC com 4 t ha⁻¹ de Phenix foram significativamente superiores em relação aos teores obtidos nos tratamentos do SB e SC com 0 e 2 t ha⁻¹ de Phenix respectivamente. Relativamente ao teor de K o seu valor foi significativamente superior nas raízes no SB fertilizado com 4 t ha⁻¹ comparativamente aos valores obtidos nas raízes no SC com a aplicação de 0 e 2 t ha⁻¹ de Phenix. Para o Ca e o Mg não se encontraram diferenças significativas entre os teores obtidos nos diferentes tratamentos. No entanto, para o Fe os teores encontrados nas raízes no SC não fertilizado e no SC com a aplicação de 2 t ha⁻¹ de Phenix foram significativamente superiores em relação aos teores obtidos nas raízes no SB com a aplicação de 0 e 4 t ha⁻¹ de Phenix.

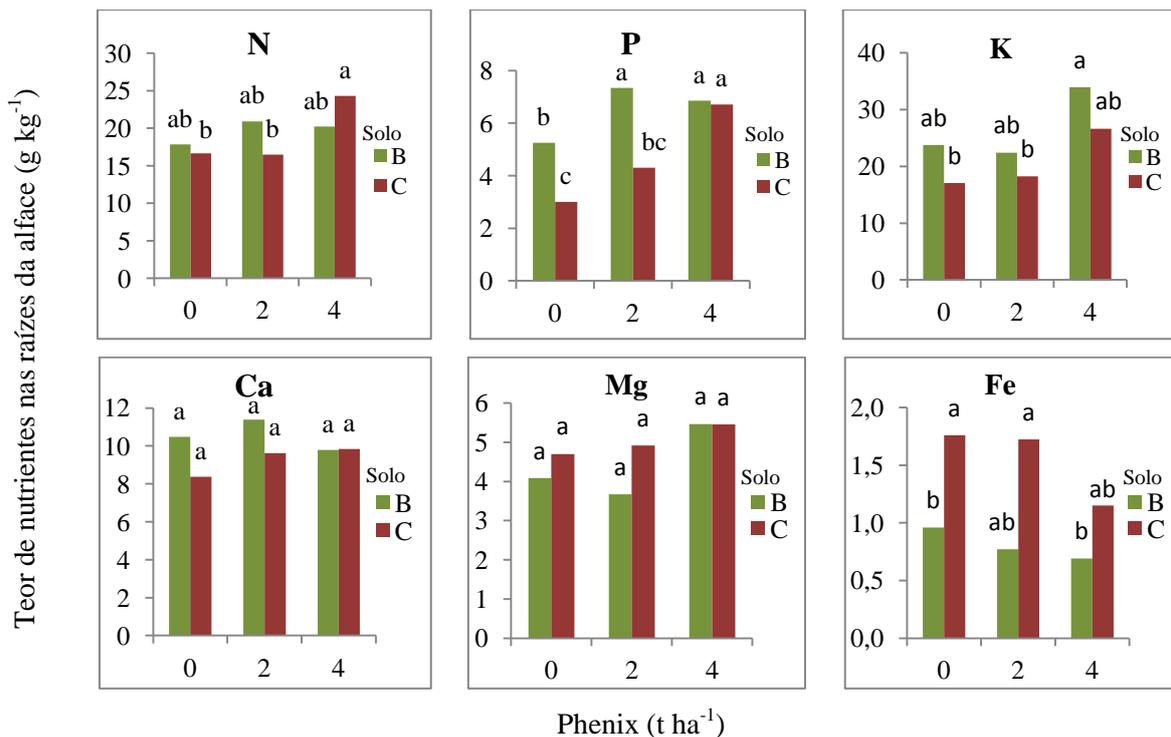


Figura 25. Teor de nutrientes nas raízes da alface, 45 dias após a transplantação, em resposta à aplicação do adubo Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) ao solo biológico (B) e ao solo convencional (C). Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

3.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa

3.2.1 Temperatura do ar e características do solo

As temperaturas médias diárias do ar e do solo no período em que decorreu o ensaio encontram-se representadas na Fig. 26. No entanto, o início do registo das temperaturas do ar e do solo apenas foi possível, respectivamente, ao 7º e ao 10º dia após a transplantação. As temperaturas médias diárias mais elevadas do ar e do solo foram respectivamente 29,5 e 27,2 °C e as mais baixas foram 13 e 15,5 °C respectivamente.

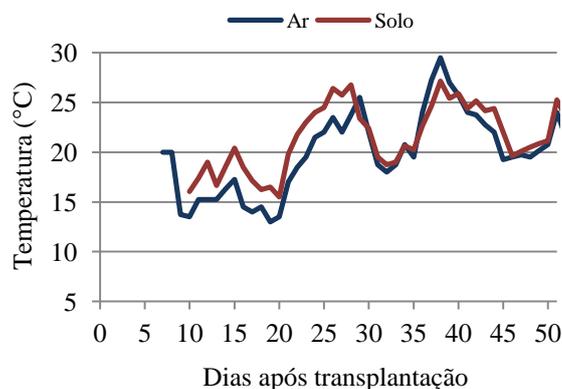


Figura 26. Temperaturas médias diárias do ar e do solo durante o ensaio.

As características físicas e químicas e o teor de nutrientes do solo de agricultura biológica utilizado no ensaio encontram-se nos quadros 4 e 5 sendo de realçar o teor muito elevado de MO.

Quadro 4. Características físicas e químicas do solo

	MS (%)	pH	CE (dS m ⁻¹)	MO (g kg ⁻¹ ms)	N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹ ms)	N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹ ms)	C/N
Média	82,4	7,2	0,6	60,2	5,4	42,4	12,4
DP	1,0	0,0	0,0	0,6	0,6	2,1	0,3

Quadro 5. Teor de nutrientes no solo.

	N (g kg ⁻¹ ms)	P (g kg ⁻¹ ms)	K (g kg ⁻¹ ms)	Ca (g kg ⁻¹ ms)	Mg (g kg ⁻¹ ms)	Fe (g kg ⁻¹ ms)
Média	2,8	1,0	3,8	2,9	2,2	2,8
DP	1,5	0,2	2,6	1,2	0,9	1,5

3.2.2 Peso fresco e peso seco da alface

A produção de alface não variou significativamente entre as alfaces com raízes inoculadas e as alfaces com raízes não inoculadas, para a mesma aplicação de fósforo (P₂O₅) (Fig. 27).

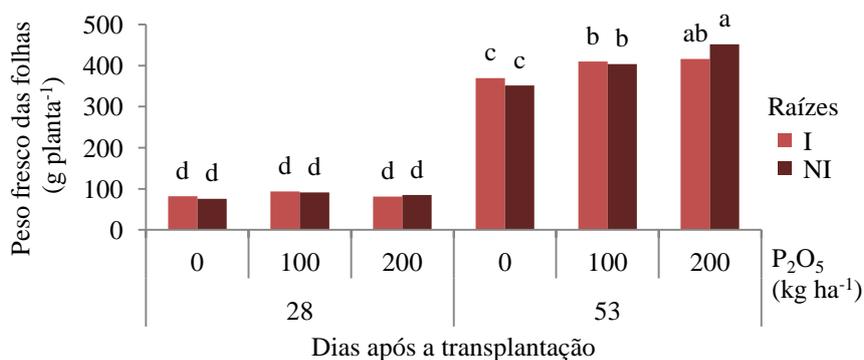


Figura 27. Peso fresco das folhas da alface, 28 e 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Na colheita final a produção de alface aumentou significativamente (p < 0,05) com a aplicação de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (Fig. 28a), respectivamente 12,9 % e 20,4% em comparação

com o tratamento controlo (sem P_2O_5). Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas entre a produção de alfaces com e sem inóculo micorrízico (Fig. 28b).

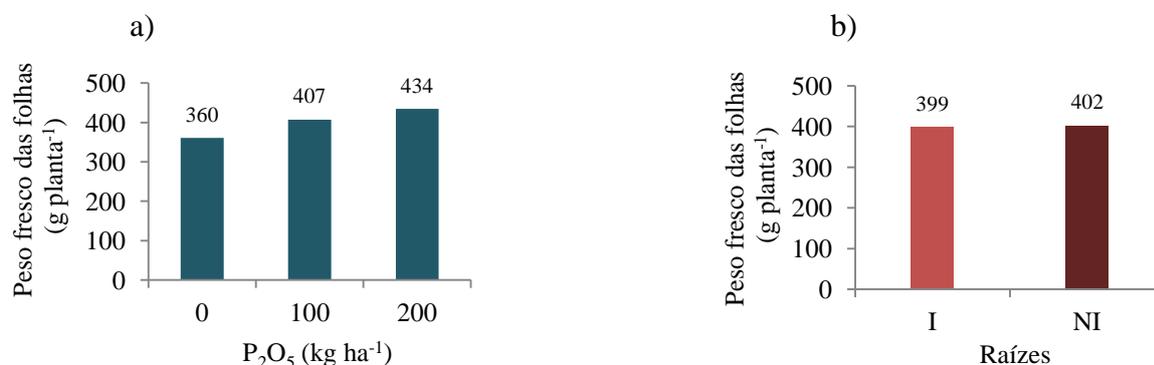


Figura 28. Peso fresco das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, (a) com aplicação de fósforo no solo para a média de raízes inoculadas e não inoculadas e (b) com a inoculação micorrízica das raízes para a média das diferentes doses de P_2O_5 . I e NI representam, respectivamente, raízes com e sem inóculo micorrízico.

O peso seco das folhas das alfaces inoculadas (Fig. 29) aumentou ($p < 0,05$) de 31,4 para 34,6 g planta⁻¹ entre a aplicação de 0 e 100 kg ha⁻¹ de P_2O_5 respectivamente. O peso seco das folhas das alfaces não inoculadas aumentou ($p < 0,05$) com a aplicação de doses crescentes de P_2O_5 . Para o mesmo teor de P_2O_5 aplicado, apenas se encontraram diferenças significativas entre o peso seco das folhas das alfaces inoculadas e não inoculadas com a aplicação de 200 kg ha⁻¹ de P_2O_5 .

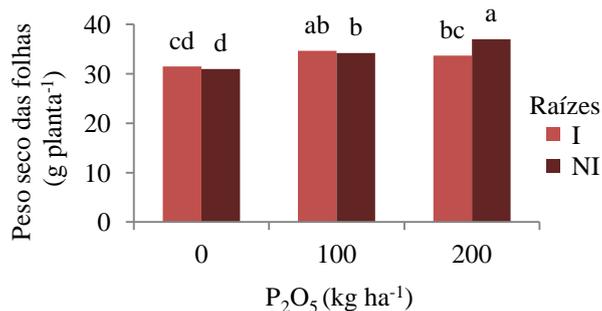


Figura 29. Peso seco das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P_2O_5 ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Relativamente ao peso fresco das raízes da alface (Fig.30), para a aplicação de 0 e 200 kg ha⁻¹ de P_2O_5 encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as raízes inoculadas e não inoculadas. Numericamente verificou-se que na 2^a colheita o peso fresco das raízes inoculadas

diminuiu com a aplicação de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅, respectivamente 5,5 % e 9,2 % em relação ao tratamento de controlo sem P₂O₅. Pelo contrário, o peso fresco das raízes não inoculadas aumentou com a aplicação de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅, respectivamente 23,6 % e 35,8 % em relação ao tratamento de controlo (sem P₂O₅).

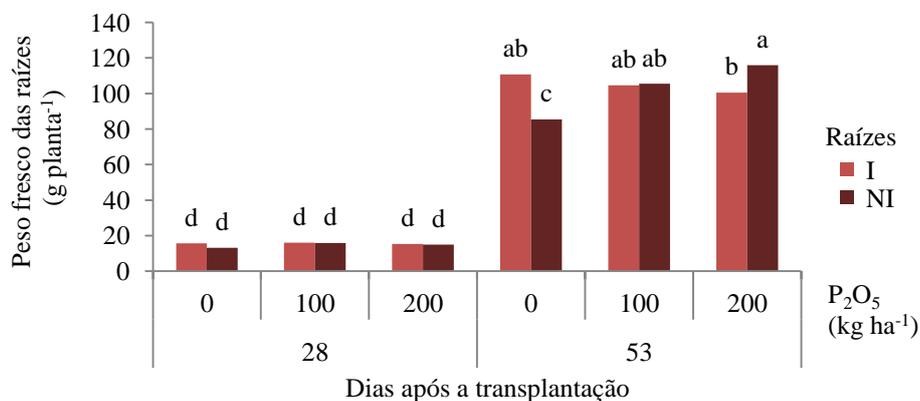


Figura 30. Peso fresco das raízes da alface, 28 e 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

A aplicação de P₂O₅ (Fig. 31a) não contribuiu significativamente para o aumento do peso fresco das raízes verificando-se, no entanto, um aumento percentual de 7,1 % e de 10,3 % com a aplicação de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅, respectivamente, em relação ao tratamento de controlo sem P₂O₅. Também a aplicação de inóculo micorrízico (Fig. 31b) não contribuiu significativamente para o aumento do seu peso fresco, tendo-se obtido nas raízes inoculadas um peso superior 2,9 % em relação ao das raízes não inoculadas.

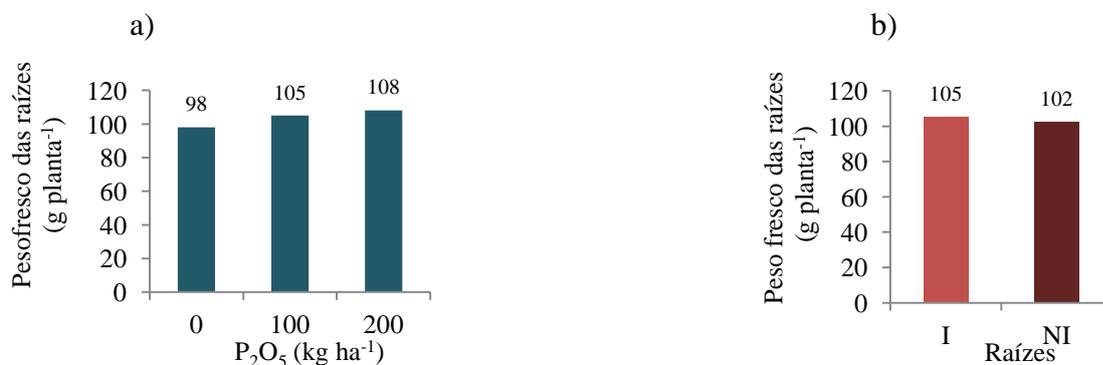


Figura 31. Peso fresco das raízes da alface 53 dias após a transplantação, (a) com aplicação de fósforo no solo para a média de raízes inoculadas e não inoculadas e (b) com a inoculação micorrízica das raízes para a média das diferentes doses de P₂O₅. I e NI representam, respectivamente, raízes com e sem inóculo micorrízico.

O peso seco das raízes também não variou significativamente com aplicação de fósforo e com a inoculação micorrízica (Fig. 32), no entanto os valores obtidos nas raízes inoculadas foram superiores 22,9 % e 8,7 % em relação às não inoculadas com a aplicação de 0 e 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅, respectivamente, tendo-se verificado o oposto com a aplicação de 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ correspondendo a uma diferença de 20 %.

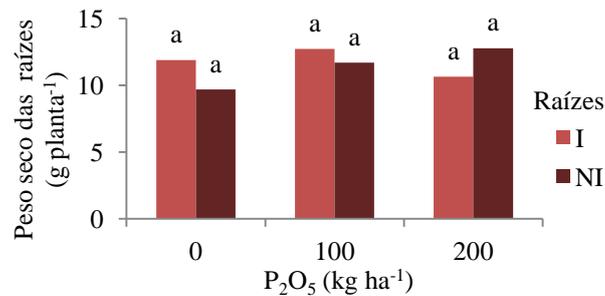


Figura 32. Peso seco das raízes da alface, 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos respectivos tratamentos.

3.2.3 Teor de nutrientes nas folhas e nas raízes da alface

Os valores obtidos para os teores de nutrientes nas folhas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos (Fig. 33). Numericamente verificou-se que para qualquer tratamento com P₂O₅, o teor de N nas folhas das alfaces com raízes inoculadas foi sempre superior em relação ao obtido nas alfaces com raízes não inoculadas; o teor de P nas folhas das alfaces com raízes inoculadas diminuiu com a aplicação de 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ ao contrário do sucedido nas alfaces com raízes não inoculadas e, ainda nas alfaces com raízes inoculadas, os teores de K, Ca, Mg e Fe aumentaram com a aplicação de doses crescentes de P₂O₅.

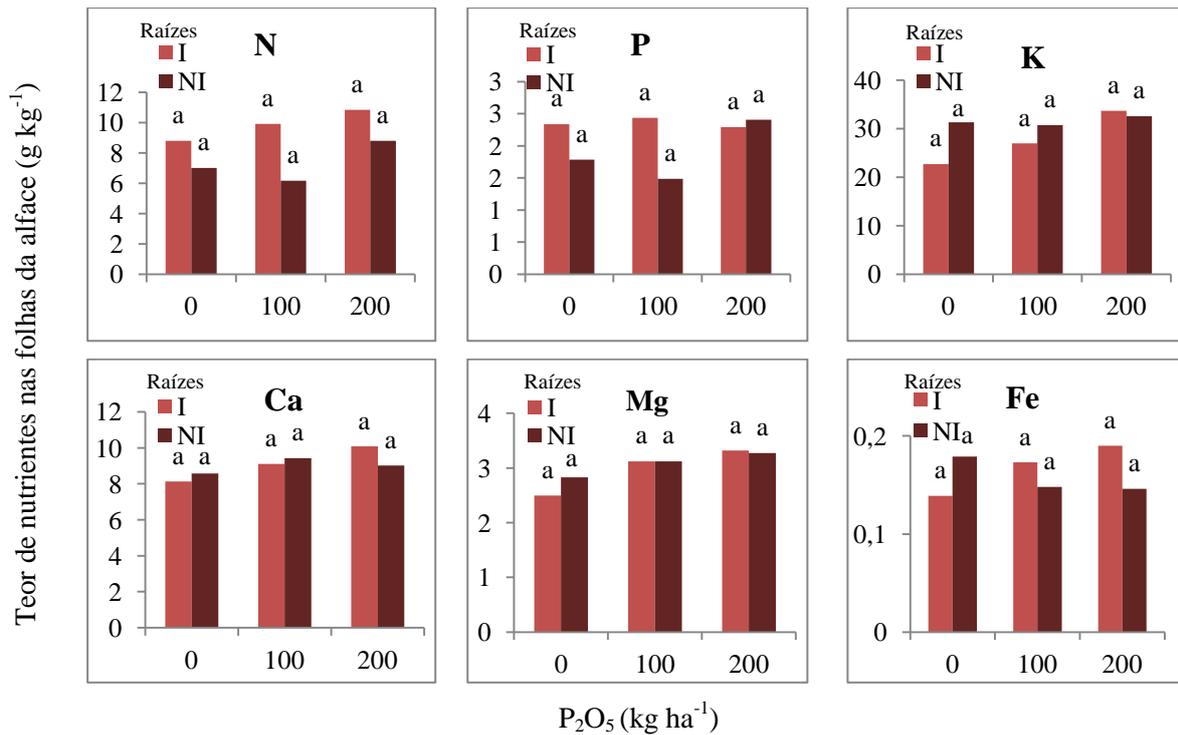


Figura 33. Teor de nutrientes das folhas da alface, 53 dias após a transplantação, com raízes inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

Nos teores de nutrientes nas raízes da alface (Fig. 34) também não se verificaram diferenças significativas (p < 0,05) entre os diferentes tratamentos. Com a aplicação da dose mais elevada de P₂O₅ no solo, o teor de N nas raízes inoculadas aumentou numericamente em relação aos valores obtidos nos restantes tratamentos, ao contrário do sucedido nas raízes não inoculadas. Em relação ao P, verificou-se que para qualquer tratamento com P₂O₅, o seu teor nas raízes inoculadas foi sempre numericamente superior ao encontrado nas raízes não inoculadas. Com a aplicação das doses de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ os teores de P, K, Ca, Mg e Fe nas raízes inoculadas foram iguais ou inferiores aos obtidos com o tratamento sem P₂O₅. Por outro lado, nas raízes não inoculadas os teores de P, K, Ca e Fe diminuíram com a aplicação de doses crescentes de fósforo.

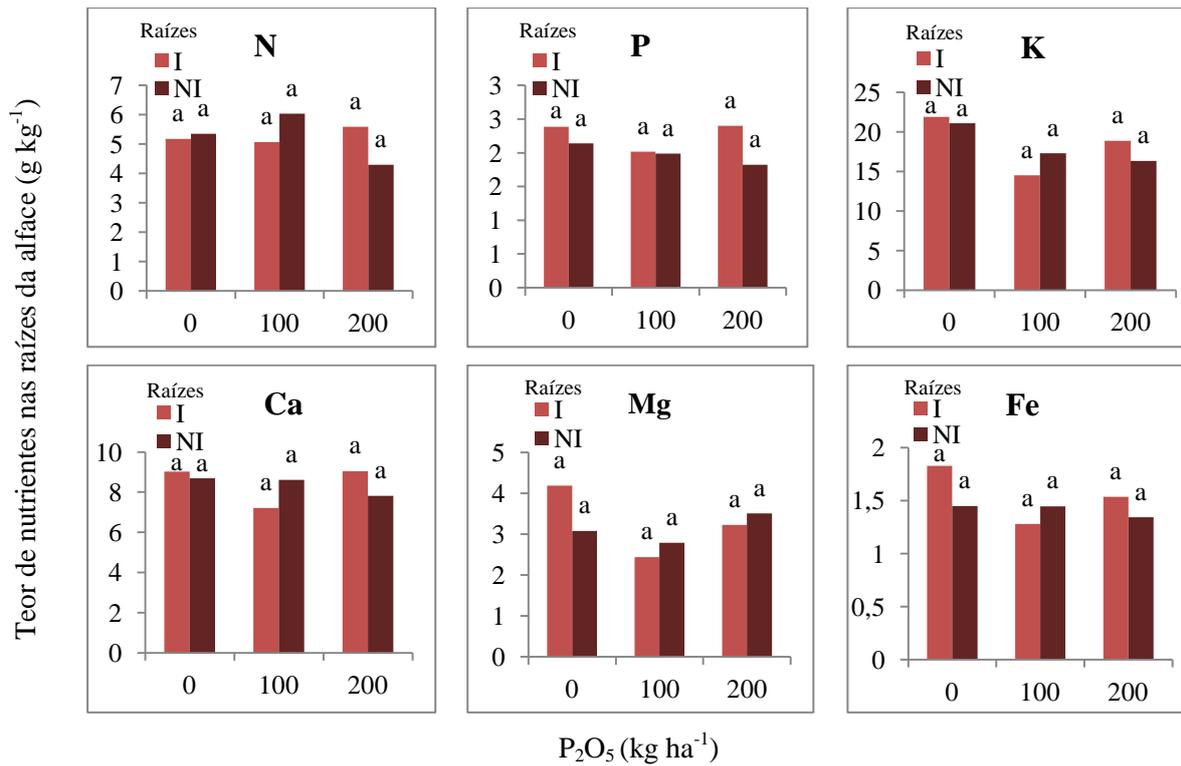


Figura 34. Teor de nutrientes nas raízes da alface, 53 dias após a transplantação, inoculadas (I) e não inoculadas (NI), em resposta à aplicação do fosfato de Gafsa (0, 100 e 200 kg P₂O₅ ha⁻¹) ao solo. Letras diferentes por cima das barras representam diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias dos respectivos tratamentos.

4. DISCUSSÃO

4.1 Crescimento da alface em solos de agricultura biológica e convencional

4.1.1 Peso fresco e peso seco da alface

A fertilização orgânica beneficia a produção da alface (Manojlovic, 2009; Silva, 2010; Porto, 2008) no entanto nesta experiência, os valores de produção da alface diminuíram com a aplicação de doses crescentes de adubo orgânico Phenix (0, 2 e 4 t ha⁻¹) em que a dose máxima originou valores de produção significativamente ($p < 0,05$) inferiores em relação ao tratamento sem fertilização. O efeito nefasto do Phenix na produtividade da alface explica-se pela sua elevadíssima condutividade eléctrica, 50,1 dS m⁻¹, que terá afectado a absorção de água pelas plantas, por sua vez sensíveis à salinidade. Por outro lado também o elevadíssimo teor de N-NH₄⁺, 18394 mg kg⁻¹ ms, que nestas concentrações é tóxico, prejudicou a produção da alface.

O solo biológico apresentou uma maior resistência ao efeito prejudicial do Phenix em comparação com o solo convencional contribuindo para quebras na produção de alface que não foram significativas entre os diferentes tratamentos, e para produtividades sempre superiores em comparação com os obtidos com o SC, quando se aplicou o adubo Phenix. Tal resistência foi provavelmente devido às suas características sendo relevante o seu maior teor de MO (64,5 g kg⁻¹ ms), em comparação com o do solo convencional (26,5 g kg⁻¹ ms). A MO do SB terá contribuído para uma elevada capacidade de troca catiónica no solo permitindo uma maior disponibilidade de nutrientes para além de constituir também uma reserva de nutrientes (Yilmaz, 2010). O maior teor de MO terá provavelmente contribuído, também, para uma boa permeabilidade e capacidade de retenção de água (Bayu, 2006) satisfazendo mais facilmente as necessidades hídricas da cultura. Além disso, a MO contribui para uma menor compactação do solo (Mamman, 2007) que, juntamente com o facto de o SB também ser menos denso do que o SC, favoreceu um maior desenvolvimento das raízes que apresentaram um peso superior ao das raízes das alfaces produzidas em SC.

No peso seco da alface, tanto das folhas como das raízes, o efeito prejudicial do Phenix já não se manifestou de forma significativa, o que confirma que o prejuízo na produção estaria relacionado com a maior dificuldade na absorção de água na presença do Phenix.

A maior fertilidade do SB em relação ao SC poderá estar relacionada com os teores mais elevados de MO e de N total do SB em comparação com o SC, e com a maior actividade

biológica do SB, como refere Silguy (1994), e que nesta experiência, se confirmou relativamente ao desenvolvimento dos FMA (Gryndler et al., 2006). Em ambos os solos verificou-se a presença de colonização micorrízica nas raízes das alfaces no entanto, no solo biológico, para além de a percentagem de micorrização ser muito reduzida, mesmo no solo não fertilizado, a acção dos FMA poderá ter sido afectada pelo efeito tóxico da aplicação de Phenix.

4.1.2 Colonização micorrízica das raízes da alface

A percentagem de colonização micorrízica das raízes das alfaces produzidas com SB foi superior à verificada nas alfaces produzidas com SC, em mais do dobro, correspondendo a uma diferença muito superior à de 30 % referida por Madder et al. (2000) após comparar a percentagem de colonização em culturas hortícolas produzidas no modo de produção biológico com culturas no modo de produção convencional. Esta diferença poderá ser explicada pelo facto de em agricultura biológica os solos possuírem uma maior diversidade de fungos e maior desenvolvimento do micélio dos FMA em relação aos solos de agricultura convencional, que permite a aplicação intensiva de fertilizantes nefastos aos FMA como refere He (2007).

O decréscimo da percentagem de colonização das raízes com a aplicação de doses crescentes de adubo (0, 2 e 4 t ha⁻¹) pode estar relacionado com o facto de os FMA existirem em maior quantidade na forma de esporos com o aumento da fertilização, como referem Gryndler et al. (2001) e está de acordo com os resultados de diversos autores, nomeadamente Azcón et al (2003) que verificaram a inibição da colonização micorrízica em alfaces com aplicação de níveis elevados de N e P no solo pois com a aplicação do adubo Phenix forneceu-se um elevado teor de N-NH₄⁺ aos solos e, em relação ao P, tanto o SB como o SC apresentaram valores muito elevados de P₂O₅, 463,54 e 406,52 mg kg⁻¹ ms respectivamente.

4.1.3 Teor de nutrientes na alface

Os teores de macronutrientes encontrados nas folhas das alfaces estão de acordo com os valores indicados para a alface por Varennes (2003) salientando-se porém a carência de N nas folhas das alfaces em SB não fertilizado, a carência de P nas folhas das alfaces em SC não fertilizado e o reduzido teor de K nas folhas das alfaces em SC. Em ambos os solos a relação N/P foi superior nas folhas (4,5 no SB e 5,4 no SC) em relação às raízes (3 no SB e 4,1 no SC). Por outro lado a relação N/Ca foi superior nas raízes (1,9 no SB e 2,1 no SC) do que nas folhas (1,2 no SB e 1,3 no SC).

4.2 Crescimento da alface com aplicação de inóculo micorrízico e fosfato de Gafsa

O teor de N nas folhas da alface foi numericamente superior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, estando este resultado de acordo com as experiências de Frey and Schuepp (1993) no milho. Nas alfaces inoculadas a concentração de N nas folhas foi superior em relação às raízes o que está de acordo com os resultados de Subremanian et al. (1999) reveladores da importância dos FMA na translocação de N das raízes para as folhas.

Lambert et al. (1979) referiram que para reduzidos ou elevados valores de P no solo a absorção dos nutrientes catiões em plantas colonizadas por FMA é variável e depende do tipo de planta e da espécie ou isolado fúngico que estabelece a simbiose. Nesta experiência, para reduzidos valores de P a absorção de K, Ca e Mg nas alfaces inoculadas foi numericamente inferior ou igual em relação às alfaces não inoculadas.

Em relação à produção de alface verificou-se um aumento significativo com a aplicação de 100 e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ em comparação com o tratamento controlo (sem P₂O₅). No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre a produção de alfaces com e sem inóculo micorrízico. Por outro lado, com a máxima aplicação de P o peso seco das folhas e o peso fresco das raízes da alface diminuíram significativamente nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Pelo contrário, com aplicações menores de P tanto o peso seco das folhas como o peso fresco das raízes apresentaram valores iguais nas alfaces inoculadas e não inoculadas. Este facto também se verificou em relação ao teor de P encontrado nas folhas, apesar de não existirem diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Estes resultados estão de acordo com as conclusões das experiências de Azcón et al. (2003) segundo as quais a aplicação de doses elevadas de N e P pode reduzir ou até eliminar o efeito benéfico dos FMA na fertilização da alface.

5. CONCLUSÕES

No primeiro ensaio deste trabalho constatou-se que a fertilização orgânica de alface através da aplicação do adubo Phenix, prejudicou a produção no solo biológico e no solo convencional, porque a elevadíssima condutividade eléctrica e o elevadíssimo teor de amónia deste adubo terão tido um efeito fitotóxico para as alfaces.

A elevada qualidade do solo de agricultura biológica demonstrada pela sua capacidade de resistência às perturbações provocadas pelo adubo Phenix, permitiu a obtenção de uma produção da alface significativamente superior à verificada no solo convencional. O elevado teor de MO e a menor densidade do solo biológico, em relação ao solo convencional, foram fundamentais para a sua maior fertilidade também relacionada com a elevada actividade biológica que terá beneficiado o desenvolvimento dos FMA e uma maior colonização micorrízica das alfaces, em comparação com o solo convencional.

A percentagem de colonização micorrízica das alfaces nos dois solos foi muito reduzida e diminuiu com a aplicação de doses crescentes de adubo orgânico (0, 2 e 4 t ha⁻¹), pelo que o seu contributo para a produtividade das alfaces terá sido mínimo ou mesmo nulo.

No segundo ensaio a aplicação de doses crescentes de fósforo resultou em aumentos significativos da produção de alface sem no entanto se verificarem diferenças significativas entre as alfaces inoculadas e as não inoculadas. Com a aplicação de 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅ o efeito prejudicial do excesso de fósforo nas alfaces com inóculo micorrízico foi visível no peso seco das folhas e no peso fresco das raízes para os quais se obtiveram valores inferiores ($p < 0,05$) em comparação com as alfaces não inoculadas. Este facto sugere que doses elevadas de fósforo possam ter um possível efeito inibidor da acção benéfica dos FMA na fertilização da alface. A verificação desta hipótese implicaria a quantificação da colonização micorrízica das alfaces.

São necessárias mais experiências para um maior conhecimento sobre as micorrizas de forma a aproveitar melhor a sua eficiência na nutrição e produtividade das culturas no modo de produção biológico.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adler, P.R., Sikora, L.J. 2003. Changes in soil phosphorus availability with poultry compost. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34: 81-95.
- Almeida, D. 2006. Manual de culturas hortícolas volume I. Ed. Presença, Portugal.
- Amlinger, F., Gotz, B., Dreher, P., Gestzi, J., Weissteiner, C. 2003. Nitrogen in biowaste compost: dynamics of mobilization and availability- a review. *European Journal of Soil Biology* 39: 117-116.
- Andrist-Rangel, Y., Hillier, S., Oborn, I., Lilly, A., Towers, W., Edwards, A.C., Paterson, E. 2010. Assessing potassium reserves in northern temperate grassland soils: A perspective based on quantitative mineralogical analysis and aqua-regia extractable potassium. *Geoderma* 158: 303-314.
- Anonymous 1996. *Techniques in Arbuscular Mycorrhiza Research: Laboratory Manual*. York Mycorrhiza Research Group.
- Augé, R.M., Stodola, A.J.W., Tims, J.E., Saxton, A.M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil* 230: 87-97.
- Augé, R.M., Sylvia, D.M., Soon, P., Bittery, B.R., Saxton, A.M., Moore, J.L., Keunho, C. 2004. Partitioning mycorrhizal influence on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. *Canadian Journal of Botany* 82: 503-514.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Azcón, R., Ambrosano, E., Charest, C. 2003. Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Science* 165: 1137-1145.
- Azcón, R., Rodríguez, Amora-Lazcano, E., Ambrosano, E. 2008. Uptake and metabolism of nitrate in mycorrhizal plants as affected by water availability and N concentration in soil. *European Journal of Soil Science* 59: 131-138.
- Baggs, E.M., Watson, C.A., Rees, R.M. 2000. The fate of nitrogen from incorporated cover crop and green manure residues. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 56: 153-163.
- Barea, J.M. 2000. Rhizosphere and mycorrhiza of field crop. *Biological Resource Management: Connecting Science and Policy*, pp 81-92.
- Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, D., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O’Gara, F., Azcon-Aguilar, C. 1998. Impact of arbuscular formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2304-2307.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. 2005b. 10 Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. *Soil Biology* 3: 195-212.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. 2005a. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1761-1778.

- Barea, J.M., Toro, M., Orozco, M.O., Campos, E., Azcón, R. 2002. The application of isotopic (^{32}P and ^{15}N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 63: 35-42.
- Bayu, W., Rethman, N.F.G., Hammes, P.S., Alemu, G. 2006. Application of farmyard manure improved the chemical and physical properties of the soil in a semi-arid area in Ethiopia. *Biological Agriculture and Horticulture* 24: 293-300.
- Benbi, D.K., Biswas, C.R., Bawa, S.S., Kumar, K. 1998. Influence of farmyard manure, inorganic fertilizers and weed control practices on some soil physical properties in a long-term experiment. *Soil Use and Management* 14: 52-54.
- Briggs, S. 2002. Nitrogen supply and management in organic farming. Institute of Organic Training and Advice.
- Brito, L.M. 2001. Lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata L.*) growth in soil mixed with municipal solid waste compost and paper mill ludge composted with bark. *Acta Horticulturae* 563: 131-137.
- Brito, L.M., Amorim, J.A., Coutinho, J. 2007. Recuperação pela alface (*Lactuca sativa L.*) do azoto mineralizado de um compostado de resíduos sólidos de chorume bovino. Projecto nº 794 financiado pela Acção 8.1 de DE & D do PO AGRO, INIAP.
- Brown, M.S., Thamsurakul, S., Bethlenfalvay, G. 1988. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. VIII. Phosphorus use efficiency of CO_2 and N_2 fixation in mycorrhizal soybean. *Physiologia Plantarum* 74: 159-163.
- Bullock, D.G. 1992. Crop rotation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 309-326.
- Caires, E.F., Maschietto, E.H.G., Garbuio, F.J., Churka, S., Joris, H.A.W. 2011. Surface application of gypsum in low acidic oxisol under no-till cropping system. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)* 68: 209-216.
- Chappell, M.J., Valle, L.A. 2011. Food Security and biodiversity: can we have both? An Agroecological Analysis. *Agric. Hum. Values* 28: 3-26.
- Cifu, M., Xiaonan, L., Zhihong, C., Zhengyi, H., Wanzhu, M. 2004. Long term effects of lime application on soil acidity and crop yields on a red soil in Central Zhejiang. *Plant and Soil* 265: 101-109.
- Clark, R.B. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and soil* 192: 15-22.
- Clark, R.B., Zeto, S.K. 1996. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 1505-1511.
- Clark, R.B., Zeto, S.K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23: 867-902.
- Datnoff, L.E., Nemeček, S., Pernezny, K. 1995. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5: 427-431.
- Degens, B.P., Sparling, G.P., Abbot, L.K. 1996. Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. *Applied Soil Ecology* 3: 149-159.

- Drew, E.A., Murray, R.S., Smith, S.E., Jakobsen, I. 2003. Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant and Soil* 251: 105-114.
- Drinkwater, L.E., Janke, R.R., Rossoni-Longnecker. 2000. Effects of tillage intensity on nitrogen dynamics and productivity in legume-based grain systems. *Plant and Soil* 227: 99-113.
- Drinkwater, L.E., Wagoner, P., Sarrantonio, M. 1998. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature*, pp 262-265.
- Duan, X.G., Newman, D.S., Reiber, J.M., Green, C.D., Saxton, A.M., Augé, R.M. 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47: 1541-1550.
- Duana, T., Faccelic, E., Smithc, S.E., Smithc, F.A., Nana, Z. 2011. Differential effects of soil disturbance and plant residue retention of arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses are not reflected in colonization of roots or hyphal development in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 571-578.
- Eghball, B., Wienhold, B.J., Woodbury, B.L., Eigenberg, R.A. 2005. Plant availability of phosphorus in swine slurry and cattle feedlot manure. *Agronomy Journal* 97: 542-548.
- Evanylo, G., Sherony, C., Spargo, J., Starner, D., Brosius, M., Haering, K. 2008. Soil and water environmental effects of fertilizer, manure and compost based fertility practices in an organic vegetable cropping system. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 127: 50-58.
- FAO 2000. Food safety and quality as affected by organic farming. 22nd FAO Regional Conference for Europe, Porto, Portugal. <http://www.fao.org>.
- Feng, G., Zhang, F.S., Li, X.L., Tian, C.Y., Tang, C. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugar in roots. *Mycorrhiza* 12: 185-190.
- Ferreira, J., Strech, A., Torres, L., Serrador, F., Marreiros, A., Silva, M., Queda, A.C.C., Vasconcelos, E., Rodrigues J. R., Franco J. C., Marques J. C., Valente F., Fernandes M. M., Ferreira A. T., Cabral F. 2009. *As bases de Agricultura Biológica. Tomo 1 Produção vegetal*. Ed. EDIBIO, Portugal.
- Frey, B., Schuepp, H. 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124: 221-230.
- Gaofei, G.E., Zhaojun, L.I., Fenliang, F., Guixin, C., Zhenan, H., Yongchao, L. 2009. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil* 326: 1-2.
- Gange, A.C. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth. *TREE* 15: 369-372.
- Gange, A.C. & Brown, V.K. 2002. Soil food web components affect plant community structure during early succession. *Ecological Research* 17: 217-227.
- Gange, A.C., Stagg, P.G., Ward, L.K. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi affect phytophagous insect specialism. *Ecology Letters* 5: 11-15.
- Gange, A.C., West, H.M. 1994. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago-lanceolata*. *New Phytologist* 128: 79-87.

- Gent, M.P.N. 2002. Growth and composition of salad greens as affected by organic compared to nitrate fertilizer and by environment in high tunnels. *Journal of Plant Nutrition* 25: 981-998.
- George, E., Marschner, H., Jakobsen, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 257-270.
- Godlewski, M., Adamczyk, B. 2007. The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 657- 664.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems and Environment* 113: 17-35.
- Graham, J.H. 2001. What do root pathogens see in mycorrhizas? *New Phytologist* 149: 357-359.
- Gryndler, M., Hrselova, H., Vosatka, M., Votruba, J., Klir, J. 2001. Organic fertilization changes the response of mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and their sporulation to mineral NPK supply. *Folia Microbiology* 46: 540-542.
- Gryndler, M., Larsen, J., Hrselova, H., Rezáčova, Gryndlerová, H., Kubát J. 2006. Organic mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16: 159-166.
- Guadagnin, S.G., Rath, S., Reyes, F.G.R. 2005. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Additives and Contaminants* 22: 1203-1208.
- Hawkins, H., Johansen, A., George, E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 275-285.
- Hammermeister, A.M., Astatkie, T., Jeliázkova, E.A., Warman, P.R., Martin, R.C. 2006. Nutrient supply from organic amendments applied to unvegetated soil, lettuce and orchardgrass. *Canadian Journal of Soil Science* 86: 21-33.
- He, X., Nara, K. 2007. Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition? *TRENDS in Plant Science* 12: 331-333.
- Helgason, T & A.H. Fitter, A.H. 2009. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of Experimental Botany* 60: 2465–2480.
- Hodge, A., Campbell, C.D., Fitter, A. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- Hodge, A., Helgason, T., Fitter, A.H. 2010. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 3: 267-273.
- Holness, R.L., Reddy, M.R., Crozier, C.R., Niedziela, C.E. 2008. Clover mixture fertilization of Spring Broccoli and lettuce by nitrogen tracing and mass balance. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1033-1045.
- Hrselová, H., Chvátalová, I., Vosátka, M., Klír, J., Gryndler, M. 1999. Correlation of abundance of arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and saprophytic microfungi with soil carbon, nitrogen and phosphorus. *Folia Microbiologica* 44: 683-687.

- IFOAM 2007. International Federation of Organic Agriculture Movements. <http://www.ifoam.org>.
- Isobe, K., Tsuboki, Y. 1998. The relationship between growth promotion by arbuscular mycorrhizal fungi and root morphology and phosphorus absorption in gramineous and leguminous crops. *Japanese Journal of Crop Science* 67: 347-352.
- Joner, E.J., Jakobsen, I. 1995. Uptake of P from labelled organic matter by mycorrhizal and non-mycorrhizal subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant and Soil* 172: 221-227.
- Karagiannidis, N. Bletsos, F., Staropoulos, N. 2002. Effect of Verticilium wilt (*Verticilium dahlia* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae* 94: 145-156.
- Kasiamdari, R.S., Smith, S.E., Smith, F.A., Scott, E.S. 2002. Influence of mycorrhizal, *Glomus coronatum*, and soil phosphorus on infection and disease caused by binucleate *Rhizoctonia* and *Rhizoctonia solani* on mung bean (*Vigna radiate*). *Plant and Soil* 238: 235-244.
- Kibblewhite, M.G., Ritz, K., Swift, M.J. 2008. Soil health in agricultural systems. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 685-701.
- Kielland, K., Mcfarland, J.W., Ruess, R.W., Olson, K. 2007. Rapid cycling of organic nitrogen in Taiga Forest ecosystems. *Ecosystems* 10: 360-368.
- Koide, R.T., Goff, M.D. Dickie. 2000. Component growth efficiencies of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. *New Phytologist* 148: 163-168.
- Koricheva, J., Gange, A.C., Jones, T. 2009. Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology* 90: 2088-2097.
- Koske, R.E., Gemma, J.N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-489.
- Lambert, D.H., Baker, D.E., Cole Jr, H. 1979. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 976-980.
- Lampkin, N. 2001. *Agricultura ecológica*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Leigh, J., Hodge, A., Fitter, A.H. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* 181: 199-207.
- Li, B.Y., Zhou, D.M., Cang, L., Zhang, H.L., Fan, X.H., Qin, S.W. 2007. Soil micronutrient availability to crops as affected by long-term inorganic and organic fertilizer applications. *Soil and Tillage* 96: 166-173.
- Li, H.Y., Smith, S.E., Holloway, R.E., Zhu, Y., Smith, F.A. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist* 172: 536-543.
- Li, X.L., George, E., Marschner, H. 1991. Phosphorus depletion and pH decrease at the root soil and hyphae soil interfaces of va mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. *New Phytologist* 119: 397-404.
- Lin, Y.H. 2011. Studies on Quantity and Intensity of Potassium in Some Taiwan Farmland Soils. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 39: 345-350.

- Lingua, G., D'Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M., Berta, G. 2002. Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza* 12: 191-198.
- Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R.I., Ma, B.L. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9: 331-336.
- Madder, P., Edenhofer, S., Boller, T., Wiemken, A., Niggli, U. 2000. Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biol. Fertil. Soils* 31: 150-156.
- Mamman, E., Ohu, J.O., Crowther, T. 2007. Effects of soil compaction and organic matter on the early growth of maize (*Zea mays*) in a vertisol. *International Agrophysics* 21: 367-375.
- Manojlovic, M., Cabilovski, R., Bavec, M. 2009. Organic materials: sources of nitrogen in the organic production of lettuce. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry* 34: 163-172.
- Marschner, H. 1996. Mineral nutrient acquisition in nonmycorrhizal and mycorrhizal plants. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 36: 61-68.
- Matsubara, Y., Kayukawa, Y., Yano, M., Fukui, H. 2000. Tolerance of asparagus seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus to violet root rot caused by *Helicobasidium mompa*. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science* 69: 552-556.
- Mengel, K. 1996. Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. *Plant and Soil* 181: 83-93.
- Miller, M.H. 2000. Arbuscular mycorrhizae and the phosphorus nutrition of maize: A review of Guelph studies. *Canadian Journal of Plant Science* 80: 47-52.
- Mills, L.S., Michael, E.S., Doak, D.F. 1993. The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience* 43: 220-224.
- Montemurro, F. 2010. Are organic N fertilizing strategies able to improve lettuce yield, use of nitrogen and N status. *Journal of Plant Nutrition* 33: 1980-1987.
- Mourão, I. M. 2007. *Manual de Horticultura no Modo de Produção Biológica*. Ed. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Portugal.
- Nasholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182: 31-48.
- Norman, J.R., Hooker, J.E. 2000. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. *Mycological Research* 104: 1069-1073.
- Nurlaeny, N., H. Marschne, H., George E. 1996. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acid soils. *Plant Soil* 181: 275-285.
- Öborn, I., Andrist-Rangel, Y., Askegaard, M., Grant, C., Watson, C., Edwards, A. 2005. Critical aspects of potassium management in agricultural systems. *Soil Use and Management* 21: 102-112.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., Silva, G.A. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2: 191-199.

- Pavlou, G.C., Elihaliotis, C.D., Kavvadias, V.A. 2006. Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae* 111: 319-325.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Porto, M.L., Alves, J.D., de Sousa, A.P., Araujo, R.D., de Arruda, J.A. 2008. Nitrate production and accumulation in lettuce as affected by mineral Nitrogen supply and organic fertilization. *Horticultura Brasileira* 26: 227-230.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M., Azcon-Aguillar, C. 2002. Localized versus system effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 525-534.
- Reeves, D.W. 1997. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil and Tillage Research* 43: 131-167.
- Ribeiro, H. M., Fangueiro, D., Alves, F., Ventura, R., Coelho, D., Vasconcelos E., Cunha-Queda, C., Coutinho, J., Cabral, F. 2010. Nitrogen mineralization from an organically managed soil and nitrogen accumulation in lettuce. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173: 260-267.
- Rubio, R., Borie, F., Schalchli, C., Castillo, C., Azcón, R. 2002. Plant growth responses in natural acidic soil as affected by arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus sources. *Journal of plant Nutrition* 25: 1389-1405.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. 1996. Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60:175-181.
- Schmidt, S., Mason, M., Sangtean, T., Stewart, G.R. 2003. Do cluster roots of *Hakea actities* (Proteaceae) acquire complex organic nitrogen? *Plant and Soil* 248: 157-165.
- Sikora, L.J. 1998. Benefits and drawbacks to composting organic by-products. *Beneficial Co-utilization of Agriculture, Municipal and Industrial by-Products*, pp 69-77.
- Sikora, L.J., Enkiri, N.K. 2005. Comparison of phosphorus uptake from poultry litter compost with triple superphosphate in codorus soil. *Agronomy Journal* 97: 668-673.
- Silguy, C. 1994. *L' Agriculture biologique, des techniques efficaces et non polluantes*. Terre Vivante, France.
- Silva, F.A.M., Villas Boas, R.L., Silva, R.B. 2010. Resposta da alface à adubação nitrogenada com diferentes compostos em dois ciclos sucessivos. *Maringá* 32: 131-137.
- Smith, F.A., Grace, E.J., Smith, S.E. 2009. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182: 347-358.
- Smith, S.E., Facelli, E., Pope, S., Smith, F.A. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326: 3-20.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Third edition. Academic Press, Great Britain.

- Soumaré, M., Demeyer, A., Tack, F.M.G., Verloo, M.G. 2002. Chemical characteristics of Malian and Belgian solid waste compost. *Bioresource Technology* 81: 97-101.
- Subremanian, K.S., Charest, C. 1999. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza* 9: 69-75.
- Talavera, M., Itou, K., Mizukubo, T. 2001. Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus spp.*) in tomato *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidognidae) and carrot *Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: Pratylenchidae) pathosystems. *Applied Entomology and Zoology* 36: 387-392.
- Tobar, R., Azcon, R., Barea, J.M. 1994a. Improved nitrogen uptake and transport from N-15 labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* 126: 119-122.
- Tobar, R., Azcon, R., Barea, J.M. 1994b. The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 4: 105-108.
- Varennes, A. 2003. *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora, Portugal.
- Vázquez, M.M., César, S., Azcón, R., Barea, J.M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15: 261-272.
- Viadé, A., Fernandez-Marcos, M.L., Hernandez-Nistal, J., Alvarez, E. 2011. Effect of particle size of limestone on Ca, Mg and K contents in soil and in sward plants. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz)* 68: 200-208.
- Vicari, M., Hatcher, P.E., Ayres, P.G. 2002. Combined effect of foliar and mycorrhizal endophytes on an insect herbivore. *Ecology* 83: 2452-2464.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., Piché, Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 5004-5007.
- Watson, C.A. 2002. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management* 18: 239-247.
- Weissenhorn, I., Leyval, C., Belgy, G., Berthelin, J. 1995. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea mays L.*) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5: 245-251.
- Whipps, J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82: 1198-1227.
- Yilmaz, E., Alagoz, Z. 2010. Effects of short-term amendements of farmyard manure on some soil properties in the Mediterranean region of Turkey. *Journal of Food Agriculture & Environment* 8: 859-862.
- Zaller, J.G., Kopke, U. 2004. Effects of traditional biodynamic farmyard manure amendment on yield, soil chemical, biochemical and biological properties in a long term field experiment. *Biology and Fertility of Soils* 40: 222-229.

Zucconi, F., de Bertoldi, M. 1987. Composts specifications for the production and characterization of composts from municipal solid waste, in: de Bertoldi, M., Ferranti, M.P., L'Hermite, P., Zucconi, F. (Eds), Compost: Quality and Use. Elsevier Applied Science, London, 30-50.