



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO FITOTECNIA

**Diversidade Funcional de Fungos Micorrízicos Nativos na
Proteção do Trigo Contra a Toxicidade de Mn.**

Diogo Joaquim Vinha Murteira de Carvalho

Orientador: Professora Doutora Isabel Maria de Oliveira Brito

Co-Orientador: Professor Doutor Mário José Gouveia Pinto Rodrigues Carvalho

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2015



Agradecimentos

A Deus;
À Professora Doutora Isabel Brito;
Ao Professora Doutor Mário Carvalho;
À minha Família;
Aos meus amigos mais próximos e colegas de curso;
Aos Professores que participaram na minha formação académica;
À Universidade de Évora

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares são microrganismos com ação extremamente importante em processos fisiológicos de mais de 80% das plantas, ação que acontece devido a uma relação de simbiose entre fungo e planta de onde resultam benefícios para os intervenientes.

O presente trabalho pretende avaliar a existência de ligações preferenciais entre FMA e famílias botânicas, assim como avaliar a diversidade funcional dos fungos micorrízicos nativos na proteção do trigo contra toxicidades de Mn.

Quando o ERM se manteve intacto após o crescimento do Developer, o trigo apresentou taxas de colonização micorrízica mais elevadas, demonstrando que este beneficiou da presença da rede de micélio intacto previamente desenvolvida pela planta Developer. Relativamente ao Mn na parte aérea do trigo, observaram-se valores de extração de Mn mais altos após a serradela, margaça e erva vaqueira, valores estes que resultaram de um maior crescimento do trigo e não de uma concentração de Mn mais elevada.

Palavras-chave: Fungos micorrízicos arbusculares nativos, Trigo (*Triticum* spp.), Ligações preferenciais, Micélio extra-radicular, Toxicidade Mn.

Functional diversity of Native Mycorrhizal fungi in the Wheat Protection Against Mn toxicity .

Abstract

The mycorrhizal fungi are microorganisms with extremely important action in physiological processes of more than 80% of the plants, an action that happens because of a symbiotic relationship between fungi and plant which result benefits to stakeholders.

This study aims to assess the existence of preferential links between FMA and botanical families, as well as evaluate the functional diversity of native mycorrhizal fungi on wheat protection Mn toxicities. When the ECM remained intact after the Developer growth, wheat showed higher mycorrhizal colonization rates, demonstrating that this benefit of the presence of intact mycelia previously developed by the plant (Developer). Regarding Mn in wheat were observed Mn extracting values higher after “serradela”, “margaça” “erva vaqueira” , which are values resulted from an increased grain growth and not from a higher Mn concentration.

Keywords: Native arbuscular mycorrhizal fungi, Wheat (*Triticum* spp.), Preferred links, Extra-radical mycelium, Mn toxicity.

Índice:

| | |
|---|------------|
| AGRADECIMENTOS | III |
| RESUMO | IV |
| ABSTRACT | V |
| ÍNDICE: | VI |
| ÍNDICE DE TABELAS: | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS: | VII |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS: | VII |
| 1 - INTRODUÇÃO: | 1 |
| 2 - PANORAMA AGRÍCOLA MUNDIAL E NACIONAL: | 3 |
| 2.1 - SITUAÇÃO DA ATIVIDADE AGRÍCOLA E DESAFIOS IMPOSTOS: | 3 |
| 2.2 - VIAS POSSÍVEIS PARA FAZER FACE AOS DESAFIOS IMPOSTOS: | 9 |
| 3 - TOXICIDADE DE MANGANÊS: | 12 |
| 4 - O SOLO E A SUA BIODIVERSIDADE ENQUANTO SISTEMA: | 15 |
| 5 - AS ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS: | 18 |
| 5.1. - OS VÁRIOS TIPOS DE ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS: | 19 |
| 6 - MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA): | 22 |
| 6.1. - DISPERSÃO: | 22 |
| 6.2. - MORFOLOGIA E MODO DE COLONIZAÇÃO CARACTERÍSTICO: | 23 |
| 6.3. - BENEFÍCIOS DECORRENTES DA MICORRIZAÇÃO: | 25 |
| 6.4. - FONTES DE INOCULO NATURAL E O INOCULO COMERCIAL: | 27 |
| 6.5. - PLANTAS HOSPEDEIRAS - LIGAÇÕES PREFERENCIAIS: | 29 |
| 7 - HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJECTIVOS: | 30 |
| 8 - MATERIAL E MÉTODOS: | 31 |
| 8.1. - LOCALIZAÇÃO: | 31 |
| 8.2. - COLHEITA E CARACTERIZAÇÃO DO SOLO: | 31 |
| 8.3. - METODOLOGIA EXPERIMENTAL E CONDUÇÃO DO ENSAIO: | 32 |
| 8.4. - PROCEDIMENTO LABORATORIAL: | 36 |
| 8.4.1. - <i>Peso Seco da Parte Aérea (SDW) e Peso seco da raiz (RDW):</i> | 36 |
| 8.4.2. - <i>Taxa de Colonização Arbuscular:</i> | 36 |
| 8.4.3. - <i>Análise de dados:</i> | 38 |
| 9 - RESULTADOS: | 39 |
| 10 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO: | 52 |
| 11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 55 |

Índice de Tabelas:

| | |
|---|----|
| <i>Tabela 1 - Cálculo da colonização arbuscular (AC) e colonização por hifas (HC) (McGonigle et al., (1990)).</i> | 38 |
| <i>Tabela 2 - Valores de peso seco da parte aérea (SDW), colonização arbuscular (AC) e colonização por hifas (HC) obtidos para cada Developer.</i> | 39 |
| <i>Tabela 3 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) no peso seco da parte aérea do trigo (SDW) (mg/planta).</i> | 40 |
| <i>Tabela 4 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) no peso seco da raiz do trigo (RDW) (mg/planta).</i> | 41 |
| <i>Tabela 5 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na taxa de colonização micorrízica por arbúsculos (AC) do trigo.</i> | 42 |
| <i>Tabela 6 - Influência da condição do micélio no teor de nutrientes presentes na parte aérea do trigo e rácio Mg/Mn.</i> | 43 |
| <i>Tabela 7 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de fósforo (P) pela parte aérea do trigo (mg/planta).</i> | 44 |
| <i>Tabela 8 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de magnésio (Mg) pela parte aérea do trigo (mg/planta).</i> | 45 |
| <i>Tabela 9 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de enxofre (S) pela parte aérea do trigo (mg/planta).</i> | 46 |
| <i>Tabela 10 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de zinco (Zn) pela parte aérea do trigo (µg/planta).</i> | 47 |
| <i>Tabela 11 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de manganês (Mn) pela parte aérea do trigo (µg/planta).</i> | 48 |

Índice de Figuras:

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1 - Ensaio com Margaça (à esquerda), Erva-Vaqueira (à direita).</i> | 34 |
| <i>Figura 2 - Ensaio com azevém (à esquerda) e serradela (à direita).</i> | 34 |
| <i>Figura 3 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Centeio.</i> | 35 |
| <i>Figura 4 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Serradela.</i> | 35 |
| <i>Figura 5 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Margaça.</i> | 35 |

Índice de Gráficos:

| | |
|---|----|
| <i>Gráfico 1 - Relação entre o teor de Mn (mg/kg) e o peso seco da parte aérea do trigo (mg/planta) após cada Developer nas duas condições de micélio.</i> | 50 |
| <i>Gráfico 2 - Relação entre o teor de Mn (mg/kg) e o peso seco da parte aérea do trigo (mg/planta) após cada Developer na condição de micélio intacto.</i> | 50 |

1 - Introdução:

Atualmente a humanidade encontra-se numa situação, de certa forma, preocupante pois os desafios e tendências impostas pelas circunstâncias em que nos encontramos remete-nos para a necessidade de procura de novas soluções nas mais variadas áreas. A agricultura é uma das áreas onde essa necessidade de mudança é importante visto que, devido ao recurso a práticas agronomicamente incorretas, esta atividade torna-se insustentável a longo prazo e com impactos extremamente negativos no ambiente e no equilíbrio dos ecossistemas naturais. O recurso às práticas convencionais de mobilização do solo durante anos consecutivos provoca uma quebra na fertilidade natural do solo, perda de matéria orgânica, perturbação o processo de estruturação do solo, deixando-o assim exposto aos factores ambientais que por sua vez desencadeiam processos de erosão com conseqüente perda de solo produtivo ao longo dos anos. Tendo em conta que o solo é considerado um recurso não renovável e atendendo aos números crescentes da fome mundial, bem como às tendências de aumento da população mundial, as formas de fazer agricultura devem ser estrategicamente pensadas, pois requerem profundas alterações sob pena da humanidade perder capacidade produtiva de bens alimentares para fazer face ao aumento da população mundial previsto. Assim, um dos caminhos a seguir é a aposta em técnicas e práticas agrícolas de conservação do solo que preservem ou melhorem as características físicas, químicas e biológicas, pois o solo é elemento essencial na atividade agrícola e a produtividade está diretamente relacionada com as características edáficas. As práticas de conservação de solo, aliadas a outras práticas culturais acessórias como, por exemplo, a rotação de culturas, são formas agronomicamente corretas de fazer agricultura com impactos positivos na qualidade dos solos a todos os níveis e, desta forma, consegue-se explorar este recurso a “curto prazo” sem o comprometer a “longo prazo”. A adopção deste tipo de práticas promove, entre muitos outros benefícios, um aumento da flora microbiana do solo que é essencial para o bom estabelecimento e desenvolvimentos de qualquer cultura devido às relações que se estabelecem, diretamente por via das simbioses mutualistas e indiretamente por via do seu papel nos processos de mineralização ou indiretamente, entre os microrganismos e as plantas. Estas relações que se estabelecem têm todo o interesse do ponto de vista agrícola pois podem ser excelentes aliadas no Homem a vários níveis. As relações de simbiose mutualista que se estabelecem entre plantas e fungos micorrizicos arbusculares (FMA) são um exemplo que espelham com clareza a importância dos microrganismos do solo, relações essas que consistem num processo complexo e dinâmico de

onde resultam inúmeros benefícios, não só para a planta como também para o fungo. Estas relações têm sido alvo de inúmeros estudos e em todos eles há evidências da importância destas para a produção agrícola e sustentabilidade dos ecossistemas. Por outro lado, ao preservarmos a rede de hifas desenvolvida por este fungo (Micélio extra-radicular - ERM) através da eliminação das mobilizações, a colonização da cultura seguinte irá estabelecer-se mais rapidamente e, conseqüentemente, a capacidade de absorção de nutrientes assim como outros benefícios decorrentes da micorrização podem fazer-se sentir desde os primeiros períodos de crescimento da planta, daí a importância das práticas de conservação do solo na promoção deste tipo de fenómenos. Outra das grandes vantagens que advém deste tipo de relações mutualistas é o facto de conferirem à planta alguma tolerância a stresses provocados por excesso de certos nutrientes (Mn por exemplo) em condições de acidez do solo, fenómenos esses que são um factor limitante à produção agrícola e que, devido aos largos anos de práticas agrícolas incorretas com recurso à mobilização de solo com conseqüente degradação e perda de fertilidade, são uma das principais causas de abandono da atividade agrícola.

No plano nacional, e tendo em conta que no Alentejo predominam solos pobres, de baixa fertilidade e com alguns problemas de acidez e conseqüente presença excessiva de certos nutrientes, o conhecimento e estudo destas relações tem todo o interesse em ser realizado para que através dos benefícios delas resultantes a área explorada pela atividade agrícola possa eventualmente crescer sem comprometer a produtividade.

A presente dissertação vem nesse sentido, pois o objectivo é estudar o impacto que a presença e integridade de uma rede de micélio (ERM) desenvolvida por uma cultura precedente tem na proteção da cultura do trigo contra fenómenos de toxicidade provocados pelo Mn. Esta dissertação visa também o estudo de algumas questões relacionadas com ligações preferenciais entre fungos nativos e plantas com diferentes afinidades do ponto de vista botânico, com o objectivo de perceber se a planta precedente à cultura principal, que neste caso é o trigo, confere maior proteção quando a família botânica é a mesma. A escolha da cultura do trigo é em tudo oportuna visto que é um dos cereais mais importantes na alimentação humana e animal, e onde Portugal é mais deficitário recorrendo à importação que está sujeita às grandes variações dos mercados.

A micorrização, inserida num sistema de agricultura de conservação, não é certamente a resolução de todos os problemas em torno da produção agrícola mas certamente é um fenómeno que pode ajudar na recuperação de solo dito “improdutivo” e no aumento da produção nacional.

2 - Panorama agrícola mundial e nacional:

2.1 - Situação da atividade agrícola e desafios impostos:

A agricultura foi uma das principais atividades que esteve na base do desenvolvimento das grandes civilizações mundiais e atualmente continua como sendo uma atividade fundamental na economia de qualquer país, visto que é através da prática da mesma que as necessidades alimentares de uma crescente população mundial são asseguradas. Esta atividade desempenhou um papel preponderante e o seu aparecimento determinou um marco de extrema relevância na história da humanidade. Nos primórdios da raça humana o alimento era conseguido através da mudança constante de sítio, denominado nomadismo, mas a partir do momento em que o Homem conseguiu domesticar e produzir plantas e animais, e assim conseguir a auto-suficiência, o estilo de vida alterou-se para um estilo sedentário. Esta mudança de estilo de vida despontado pela capacidade de produzir o próprio alimento foi a chave para a fixação dos primeiros povos e formação das primeiras civilizações mundiais, estando estas na base do desenvolvimento de todas as comunidades ao longo da história. Com o passar dos séculos as técnicas foram sucessivamente aperfeiçoadas, nomeadamente técnicas de rega e cultivo, o que deu origem num aumento da capacidade produtiva mas o Homem sempre foi dependente da natureza e da produção vinda dos terrenos agrícolas e durante a maior parte de nossa história, a humanidade viveu presa a factores relacionados com a produção agrícola, ao mesmo tempo que procurava formas de aumentar ainda mais a sua produtividade. O ponto de viragem na história da agricultura mundial dá-se com a Revolução Industrial, no século XVIII, que criou indústrias nos centros urbanos e desenvolveu tecnologias que foram aplicadas à agricultura, nomeadamente máquinas capazes de potencializar as tarefas, introduzindo o conceito de Mecanização Agrícola, o que fez avançar enormemente as capacidades produtivas e que está sempre em constante evolução, respondendo a novas pesquisas e tecnologias. Outro dos factores que contribuiu para o aumento da produtividade mundial foi os avanços conseguidos na área dos fitofármacos, com o surgimento de novas fórmulas e moléculas mais eficazes que fizeram disparar as produções um pouco por todo o mundo.

Ao mesmo tempo a medicina conseguia avanços consideráveis, que permitiu grandes aumentos na taxa de crescimento populacional em todo o mundo e perante o cenário de uma população mundial em expansão, muitos países procuraram aumentar a auto-suficiência da produção de alimentos para evitar os problemas de abastecimento enquanto foram redesenhando as relações políticas e comerciais. Este aumento da população mundial deve-se em

muito aos avanços conseguidos na área da medicina, nomeadamente com o aparecimento de vacinas e novos medicamentos permitindo a cura e prevenção de doenças que no passado era fatais, aumentando assim a qualidade de vida e esperança média de vida. Era necessário um aumento na produção agrícola mundial e os avanços na mecanização agrícola ajudaram em muito a alcançar esse objectivo pois surgiram no mercado alfiões e tratores agrícolas mais evoluídos e com maior capacidade de trabalho, contribuindo assim para uma maior e melhor eficácia na produção. Contudo, este aumento da população pode tornar-se um problema se não forem tomadas medidas adequadas e capazes de fazer face a este aumento, principalmente na questão alimentar.

Estima-se que a população mundial cresce em 83 milhões de pessoas por ano e visto que nos dias de hoje 7 biliões de pessoas habitam o nosso planeta, caso esta tendência se mantenha em 2050 já haverá 9 biliões de pessoas no mundo. A manterem-se estas tendências e tendo em conta os elevados números da fome no mundo atualmente, a humanidade enfrenta o enorme desafio de conseguir alimento suficiente para garantir as necessidades alimentares de tanta gente. Perante estes números, relatórios realizados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) alertam para a necessidade de se aumentar a produção mundial de alimentos em cerca de 70% nos próximos 40 anos para assim garantir alimento. A mesma fonte refere ainda que os números da “fome crónica” no mundo sofreram um significativo aumento de pelo menos 100 milhões nos últimos anos e hoje em dia esses números já ultrapassam 1 bilhão de pessoas que são afectadas pela fome. Perante o cenário da população mundial atingir os 9 biliões em 2050, 90% dos quais em países em desenvolvimento e onde a água é um factor limitante à produção, o desafio será produzir e fornecer o alimento necessário, seguro e nutritivo, de uma forma sustentável para uma população mundial crescente. Segundo outra fonte, o Banco Mundial, estima-se que a produção de cereais deve aumentar em 50% (de 2,1 a 3 biliões de toneladas), entre 2000 e 2030, para atender às necessidades alimentares mundiais. Perspectiva-se por isso um crescimento quase obrigatório na produção agrícola mundial, pois o aumento da população mundial e a expansão dos centros urbanos assim o exigem, no entanto as alterações climáticas e a existência de recursos naturais, como o solo, cada vez mais reduzidos e fragilizados aumentam as dificuldades de enfrentar o desafio com sucesso. Esta degradação das características físicas, químicas, biológicas e erosão do solo está intimamente relacionada com as práticas de agricultura convencional utilizadas pelo Homem ao longo de vários anos, com recurso a mobilização intensiva e repetida do solo, bem como outras práticas que lhe estão associadas como a queima dos resíduos das culturas. Ao mesmo tempo a pressão de utilização de fertilizantes e pesticidas intensificou-se o que, aliado às mobilizações intensivas praticadas na altura, teve um impacto

ambiental altamente negativo, nomeadamente na qualidade do ar e água, e contribuiu ainda para a redução da fertilidade do solo. Para além de travar os vários processos associados à perda de fertilidade e produtividade dos solos cultivados, e para fazer face à crescente procura de alimento decorrente do crescimento da população mundial, há necessidade de aumentar as áreas cultivadas, afectando à produção agrícola solos de pior qualidade e até agora desprezados pelo seu baixo potencial produtivo, pelo que novas abordagens agronómicas são fundamentais para ajudar a inverter esta condição.

A agricultura é uma atividade onde a Natureza é soberana e a probabilidade de ocorrência de imprevistos é relativamente elevada dado que a dinâmica e a interação entre os vários recursos naturais envolvidos dita muitas vezes o sucesso ou insucesso da produção agrícola, interação essa que deixa ao Homem pouca capacidade de intervenção na maioria dos casos. Durante largos anos foi esquecida toda essa parte ecológica e interação de factores que envolve a atividade e as práticas agrícolas seguidas até então estavam, de certa forma, a tornar a agricultura insustentável a longo prazo, ao mesmo tempo a redução a fertilidade dos solos, tornando-os cada mais improdutivo. O solo agrícola produtivo é um ecossistema não renovável, pois a sua degradação ocorre a uma velocidade muito maior que a sua regeneração, que é um processo muito mais lento e segundo o International Soil Reference and Information Centre, nos últimos quarenta anos cerca de 30% dos solos destinados à agricultura foram abandonados devido à erosão e à sua degradação, o que corresponde a um número próximo dos 1.5 biliões ha. É por isso importante reformular a agricultura mundial apostando em técnicas e práticas que mantenham ou melhorarem a fertilidade do solo e preservem o ambiente de forma que as futuras gerações possam retirar produtividade igual ou superior não pondo em causa a segurança alimentar mundial.

Em Portugal a atividade agrícola sempre revelou uma grande importância, principalmente desde os tempos do Estado Novo. Nesta altura, na década de 50, a agricultura e o Mundo Rural registavam uma população ativa de mais de 1,5 milhões de pessoas, atingindo a maior expressão demográfica de todos os tempos representando 47% da população ativa. A agricultura era a atividade mais relevante na economia portuguesa contribuindo com 32% para o Produto Interno Bruto (PIB) e mantendo a balança comercial agrícola com saldo positivo. O processo de industrialização em Portugal trouxe grandes mudanças na agricultura, quer em termos de organização das explorações da altura quer no modo de produção, uma vez que a mecanização, a utilização de adubos químicos, sementes certificadas, pesticidas e herbicidas, passaram a fazer parte do quotidiano agrícola da altura, no entanto só os agricultores com maior capacidade

económica conseguiram suportar os custos de tanta mudança o que levou com que a agricultura familiar perde-se expressão, conduzindo também ao abandono de muita área até então cultivada. A industrialização provocou ainda o acentuar do decréscimo na população agrícola ativa uma vez que a mecanização agrícola veio substituir a mão de obra, logo era necessário menos gente a trabalhar na agricultura o que levou a população a procurar novas formas de ganhar o sustento. Com o avanço da industrialização e urbanização, surgiram novas oportunidades de emprego nos grandes centros urbanos e industriais dado origem ao começo do declínio da atividade agrícola em Portugal. A agricultura começava a perder importância na economia nacional e na década de 70 a contribuição desta atividade para o PIB caiu para 17%, ao mesmo tempo que o saldo da balança comercial agrícola se tornou gravemente negativo e a área anualmente cultivada sofreu um decréscimo de 23%. Como resultado de todas estas transformações políticas, sociais e económicas ocorridas ao longo dos anos o sector agrícola caiu numa situação fracamente delicada e Portugal passou a depender quase exclusivamente da importação de certos produtos agrícolas do estrangeiro, situação que se manteve até aos dias de hoje ao ponto de não ser garantida a auto-suficiência em bens tão essenciais como cereais, carne ou frutos. O termo auto-suficiência alimentar pode ser definido como sendo a capacidade de um país satisfazer as necessidades de consumo em bens alimentares da população. Assim, a agricultura e a agro-indústria de um país só assegurará a sua auto-suficiência agro-alimentar se conseguir satisfazer o consumo interno com base na respectiva produção nacional ou com base na importação de bens alimentares de origem agrícola, desde que esta seja totalmente paga pelas receitas geradas pela exportação de bens alimentares da mesma origem. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), Portugal apresenta em média um grau de auto-suficiência alimentar de 81% no conjunto dos produtos provenientes da agricultura, da pesca e da indústria alimentar e das bebidas, no entanto estes valores camuflam um pouco a realidade uma vez que a dependência do exterior de produtos como os cereais e carne bovina é extremamente elevada. O impacto da dependência da importação de produtos agrícolas manifesta-se essencialmente na contas económicas do país e numa altura em que a população portuguesa consome cada vez mais alimentos, para conseguir assegurar as necessidades alimentares em cereais o país gasta largos milhares de euros anualmente. Tendo em conta esta grande dependência da importação de alguns bens alimentares, Portugal fica assim bastante vulnerável a situações de escassez em bens alimentar e a oscilações nos preços de mercado, o que leva à ocorrência de saldo negativo na balança comercial dos produtos agrícolas. Segundo dados do INE referentes ao ano de 2012, Portugal aumentou as suas exportações 8,5% em relação a 2011, o que corresponde a um total de 4 216 milhões de euros, no

entanto importou produtos agrícolas e agroalimentares no valor de 7 185 milhões de euros dando origem a um saldo negativo na balança comercial de 2 969 milhões de euros. A tendência do aumento das exportações deve-se muito a produtos como o vinho e o leite nos quais Portugal é auto-suficiente e aposta na exportação dos mesmos, gerando divisas que contribuem para o equilíbrio da balança comercial, no entanto a elevada dependência de outros produtos leva ao seu desequilíbrio. É de salientar que nos últimos tempos Portugal tem vindo a apostar no aumento da produção de certos produtos de origem agrícola, como é o caso das hortícolas, frutas processadas e azeite, dando largos passos até à auto-suficiência nestes produtos, mas por outro lado apresenta um forte dependência externa de cereais, plantas oleaginosas e carne bovina e é nestes produtos que é gasto a maioria do montante referente às importações. A importação de cereais e oleaginosas é responsável por cerca de 50% do valor global das importações agrícolas do país, valores que traduzem bem o impacto que estes gastos tem nas contas económicas referentes à agricultura e ao mesmo tempo dão uma ideia do quanto Portugal é dependente do exterior para garantir estes produtos à população. Em Portugal cerca de 59% dos cereais utilizados tiveram como destino a alimentação animal e apenas 30% foram para a alimentação humana, ao mesmo tempo que a área semeada com cereais sofreu uma redução de cerca de 400 000 ha desde o início da década de noventa, passando de 750 000 hectares para 390 000 hectares cultivados em 2006, o que representa a perda de quase 50% do total de área ocupada pelos cereais. Um dos casos mais flagrantes ocorreu na produção de trigo duro, onde aconteceu uma redução extremamente notória entre 2002 e 2006, passando de 188 000 ha para apenas 3 199 ha após a reforma da PAC de 2003. No mesmo período o centeio registou também uma redução de 81% na área semeada, 18 225 ha semeados em 2006 face a 95 069 ha em 1990. Por sua vez, segundo o Gabinete de Planeamento e Política Agro-Pecuária (GPPAA) do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas (MADRP), a SAU sofreu também um decréscimo para metade, passando de 20% em 1990 para 10% em 2005. Esta tendência verificada nos cereais manteve-se até à actualidade e segundo o INE, a produção entre as campanhas 2008/2009 e 2010/2011 decresceu 27%, representando um decréscimo de 312 mil toneladas. O decréscimo verificado na produção de cereais torna Portugal ainda mais dependente do exterior e as transações de cereais, segundo o INE continuam a representar o maior saldo negativo com um défice de -820 milhões de euros em 2012. Actualmente Portugal importa cerca de 80% dos cereais que consome, factor que contribui em 15% para o défice da balança comercial de produtos agrícolas, conduzindo por sua vez ao aumento do défice balança comercial alimentar em 25%. Estes valores são preocupantes e colocam o país numa situação de grave dependência externa pelo que Portugal deveria aumentar

o nível de aprovisionamento de alguns cereais através da produção nacional, contudo os recursos naturais existentes levantam alguns obstáculos, nomeadamente no que a solos diz respeito.

Em matéria de solos Portugal apresenta uma enorme heterogeneidade ao longo de todo o território nacional, sendo um dos países da Europa onde o cenário é mais desfavorável visto que em geral os solos nacionais são jovens, pouco desenvolvidos e com características muito próprias relacionadas com a natureza de rocha-mãe, relevo e clima. Segundo a classificação utilizada pela FAO, os Cambissolos é o tipo de solo predominante em Portugal que geralmente se caracterizam por serem solos jovens, pouco desenvolvidos, pouco profundos, com teores de argila e matéria orgânica muito baixos. Apresentam algumas restrições ao uso agrícola pois o risco de erosão e degradação é elevado, a ocorrência de afloramentos rochosos é comum, são solos pobres em nutrientes e geralmente ácidos. O segundo tipo de solo com mais expressão no território nacional apresenta também alguns problemas que podem limitar a produção agrícola e predominam nas zonas onde a temperatura média é elevada e com fraca precipitação, como é o caso de Trás-os-Montes, Beira Interior e Alentejo. Este tipo de solo, Litossolos, tem geralmente como base uma rocha dura de xisto ou granito, apresentam uma profundidade muito reduzida (entre os 10cm e 30cm no melhor dos cenários) o que provoca um fraco ou nulo desenvolvimento dos perfis, sendo por isso solos muito mal estruturados e com a rocha-mãe muito próxima da superfície criando assim um obstáculo ao desenvolvimento do sistema radical das culturas. Assim, em Portugal predominam os tipos de solo com características que limitam a produção agrícola e a Carta de Solos é o espelho claro desta realidade visto que 66% dos solos nacionais estão classificados como solos de baixa qualidade e com pouca aptidão para a praticar agricultura. Segundo a mesma carta, apenas 4% da área total do território nacional possui solos considerados de elevada qualidade para a produção de grandes quantidades de biomassa, é o caso dos Barros que ocupam pequenas áreas muito dispersas na zona de Lisboa e Baixo Alentejo e os Aluviosolos que se desenvolvem em zonas adjacentes a linhas de água. No entanto a actividade agrícola e florestal em Portugal ocupa 80% da área total do território, o que significa que a maioria destas actividades agro-florestais estão a ser praticadas em solos de baixa qualidade e com grandes limitações do ponto de vista estrutural e de fertilidade.

A formação do solo depende essencialmente de uma série de factores naturais como o clima, organismos, rocha-mãe, relevo e tempo de formação, e é a acção combinada destes factores que dita a qualidade e existência de diferentes tipos de solos por todo o mundo. Em Portugal a interacção destes factores é desfavorável e resulta na formação de solos pouco profundos, com pouca fertilidade e com pouca aptidão para a agricultura, sendo que a natureza

da rocha-mãe e o clima existentes são os dois maiores responsáveis pela má qualidade dos solos do território português. O factor clima tem um papel decisivo na formação do solo, pois a mesma rocha-mãe pode dar origem a solos completamente distintos se as condições climáticas forem diferentes ou, por outro lado, se diferentes tipos de rocha-mãe forem expostos às mesmas condições atmosféricas por um longo período de tempo podem originar solos semelhantes. A acção deste factor, através de precipitação e temperatura, acelera os processos físicos, químicos e biológicos de meteorização das rochas conduzindo à formação de solo e neste aspecto as condições que predominam em Portugal não são favoráveis à constituição de solos bem estruturados, profundos e férteis. No que diz respeito ao factor litológico o cenário também não é favorável tendo em conta a natureza dos diferentes tipos de rocha-mãe existentes no território nacional, resultando que cerca de 3/4 dos solos nacionais derivam de formações onde predomina o xisto e o granito que são rochas ígneas ou metafóricas ácidas e tendencialmente formam solos pobres em minerais. Outra das grandes limitações imposta pela natureza do material litológico é a tendência para a formação de solos ácidos que condiciona muito a prática agrícola, dado que a maioria das plantas, e em especial os cereais, são extremamente sensíveis a este fenómeno. A causa mais relevante para a formação de solos ácidos, para além da natureza da rocha-mãe, está relacionada com a perda de bases arrastadas pela água infiltrada e tendo em conta que em Portugal a precipitação está concentrada num curto espaço de tempo aumenta assim a probabilidade dos solos se tornarem cada vez mais ácidos. É por isso natural que, segundo a Carta de Acidez e Alcalinidade dos Solos de Portugal, 80% dos solos nacionais possuem valores de pH considerados ácidos, dentro dos quais 40% com valores de pH extremamente preocupantes inferiores a 5,5. Tendo em conta estes valores não é de estranhar que surjam situações de toxicidade provocadas por certos elementos como o manganês, que ocorre sobretudo em solos arenosos derivados de granito, prejudicando fortemente o crescimento vegetal.

2.2 - Vias possíveis para fazer face aos desafios impostos:

Como foi referido anteriormente a humanidade enfrenta desafios extremamente delicados, tais como a fome, alterações climáticas, degradação de recursos, etc. e é na agricultura que podem estar algumas das vias para minimizar os impactos da junção dos efeitos negativos que os desafios acima acarretam. A atividade agrícola, quando feita de forma sustentável, é uma ajuda vital na manutenção de ecossistemas, que por sua vez tem um impacto positivo do ponto de vista ambiental, ao mesmo tempo que se obtém bens alimentares. Contudo, e como já foi dito no ponto anterior, a atividade agrícola nem sempre foi feita da forma mais sustentável e como

resultado de largos anos de más práticas hoje em dia assistimos ao seu resultado ao observarmos a degradação progressiva dos recursos naturais e à perda de solo produtivo. De acordo com Freixial *et al.* (2004), i) A plena consciência da insustentabilidade agronómica, ambiental e económica do sistema convencional de instalação e manutenção de culturas com recurso a sequências de operações de mobilização do solo com impacto ambiental negativo; ii) A constatação do processo gradual de empobrecimento dos solos, manifestado sobretudo pela diminuição dos já baixos teores de M.O. e pela degradação das suas características físicas, químicas e biológicas, com reflexos negativos nas produtividades das culturas; iii) A impossibilidade face às atuais regras da Política Agrícola Comum (PAC) e tendências do Mercado Mundial, de manutenção de uma atividade, no que respeita à produção de culturas arvenses, com elevados custos de produção (no sistema convencional) e com sucessivos abaixamentos quer nos preços do produto final quer nas ajudas às referidas culturas, reporta-nos para a necessidade de alterar não só o processo de instalação de culturas mas também todo o sistema. Surge por isso a necessidade de inverter a filosofia por trás de todas as políticas agrícolas praticadas até então e fazer agricultura procurando manter ou melhorar a fertilidade do solo, pois esta atividade está a caminhar para uma situação insustentável do ponto de vista agronómico, ambiental e económico. Nesse sentido foram então feitas sucessivas reformas direcionadas para a multifuncionalidade da agricultura e assente na ideia que a agricultura vai muito para além da produção.

A agricultura passa a ser encarada como uma atividade que, para além da função de produção, mantém paisagens, ecossistemas, relações sociais, aspectos culturais e dinamiza zonas rurais evitando a desertificação. Assim, preservando o solo e os ecossistemas, a atividade torna-se sustentável a longo prazo não só numa perspectiva de produção de alimentos mas também com extrema importância no ornamento do território, manutenção e sustentabilidade do Mundo Rural e outras atividades que a agricultura faz movimentar. É importante reformular a agricultura mundial apostando em técnicas e práticas que mantenham ou melhorem a fertilidade do solo e preservem o ambiente de forma que as futuras gerações possam retirar produtividade igual ou superior não pondo em causa a segurança alimentar mundial. Nesse sentido, cabe aos Governos mundiais seguir uma abordagem estratégica com diretivas cada vez mais baseadas na procura de sistemas de produção mais sustentáveis do ponto de vista ambiental e financeiro, contribuindo também para o aumento da produção nacional e revitalização de um sector que está fracamente debilitado. Aparece assim o conceito de agricultura de conservação (AC) que tem como objectivo melhorar uso dos recursos agronómicos, recorrendo à gestão integrada da água, solo e recursos biológicos, combinando-os com o uso limitado de inputs externos (FAO), e desta forma recuperar

a fertilidade dos solos através da melhoria das suas características físicas, químicas e biológicas. Através deste modo de fazer agricultura pretende-se recuperar da fertilidade dos solos degradados e prejudicados na sua estrutura e assim travar o ciclo de degradação que ocorre no modo convencional, com o recurso à mobilização, a quando da instalação de culturas.

As práticas de agricultura de conservação tem vindo a ganhar espaço no panorama agrícola e um exemplo é precisamente é o recurso cada vez mais generalizado à técnica de sementeira direta (SD), atualmente praticada em várias culturas (trigo, milho, girassol) em mais de 50 000 ha. Adoptando práticas de agricultura de conservação como a sementeira direta, a manutenção de resíduos, a rotação de culturas e ainda outras práticas acessórias, conseguimos evitar erosão e ao mesmo tempo manter ou melhorar a estrutura do solo, criando assim condições favoráveis para o desenvolvimento e manutenção dos organismos do solo bem como uma elevação do teor de matéria orgânica. Outra das grandes vantagens associada às práticas de AC/SD, e numa altura em que temas como “crise económica” e “recessão económica”, são uma redução direta e indireta dos custos de produção. A sementeira direta ao dispensar as operações de mobilização do solo para a instalação das culturas, reduz as necessidades de tração (menor dimensionamento do parque de máquinas, maior período de vida útil dos tratores, menores custos de manutenção, etc.), o consumo de combustíveis e as necessidades de mão-de-obra. (Freixial, 2009). A melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo, com o aumento da sua fertilidade, vai permitir após a consolidação do sistema, uma redução na utilização de fertilizantes e pesticidas, o que se traduz numa redução indireta dos custos de produção. A redução direta e indireta dos custos de produção que se verifica em AC/SD, conferem ao sistema, sustentabilidade também do ponto de vista económico (Carvalho, 2009).

Quadro1 - Resumos de encargos anuais em sistema de mobilização tradicional e de sementeira directa.

| QUADRO RESUMO DE ENCARGOS ANUAIS | | | |
|---|--|---------------------------------|-----------------------|
| | MOB. CONVENCIONAL (Ano 2000) | S. DIRECTA (Ano 2003) | REDUÇÃO (%) |
| REPARAÇÃO E MAUTENÇÃO DE TRACTORES | 10 450,47 € | 1 507,15 € | 85 |
| REPARAÇÃO E MAUTENÇÃO DE EQUIPAMENTO | 8 158,41 € | 1 840,40 € | 77,5 |
| GASÓLEO | 17 460 € | 7 110 € | 60 |
| MÃO-DE-OBRA | 25 000 € | 15 000 € | 40 |
| TOTAL ANUAL | 61 068,88 € | 18 347,55 € | 70 |

Fonte: Ricardo Freixial(Comunicação Pessoal)

Nos dias de hoje, sistemas de baixo *input* baseados na sementeira direta associados a um delineamento correto da rotação de culturas, ao uso racional dos nutrientes, a manutenção dos resíduos das culturas anteriores, é a forma mais sustentada do ponto de vista agronómico e ambiental em comparação com a preparação convencional dos solos, visto que tem efeitos positivos nas propriedades mais importantes do solo e são potenciais geradores de aumentos da produtividade. Em Sementeira Direta registam-se ao nível do solo, maiores valores de matéria orgânica, azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, como também maiores valores de pH e maior capacidade de troca catiónica, mas menores teores de Al (Derpsch *et al.* 1991; Crovetto, 1992). Esta prática permite ainda o aumento da atividade biológica no solo visto que as operações de mobilização são eliminadas, o que proporciona condições mais favoráveis de humidade, temperatura e arejamento mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Esta atividade biológica, constituída essencialmente por populações de minhocas, artrópodes, fungos e bactérias (rizóbios, actinomicetas e outras), tem todo o interesse em ser preservada visto que podem ser excelentes aliados do agricultor. Com a preservação da atividade biológica conseguimos que seja criada no solo uma rede de galerias e canais, que ajudará a melhorar a drenagem e arejamento, e por outro lado podemos ainda tirar partido de interações benéficas que se podem estabelecer. É por isso importante que o Homem “trabalhe” em sintonia com a Natureza, respeitando-a e deixando-a expressar todo o seu potencial, pois só desta forma é que a humanidade terá um futuro assegurado. Neste contexto o recurso a simbioses que ocorrem naturalmente, como as micorrizas arbusculares, pode constituir uma importante via para a exploração mais adequada dos nutrientes do solo e por outro lado “reabilitar” e explorar solos marginais com problemas de natureza química, como excesso de Mn e pH baixo.

3 - Toxicidade de Manganês:

O solo é composto por matérias orgânicas e inorgânicas e é destas matérias que provêm os nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas, animais e microrganismos que nele habitam, no entanto, podem ocorrer situações nas quais a presença excessiva de certos compostos ou elementos podem gerar situações de toxicidade. As plantas, assim como os microrganismos, podem ser afetados quando os níveis metais pesados presentes no ambiente de crescimento são elevados, metais pesados esses que podem advir do material de origem do solo em questão, das atividades industriais, urbanas ou agrícolas. Nesse sentido, o caso de Portugal não se traduz num cenário muito animador visto que a baixa qualidade dos solos existentes é um

dos factores que mais pesa na produção agrícola. Os solos nacionais apresentam geralmente uma baixa fertilidade “química” muito por causa das condições de formação que prevalecem, nomeadamente o clima, o relevo, a geologia e a idade das formações geológicas. Em Portugal, como foi anteriormente referido, cerca de 75% dos solos derivam de formações onde predomina o xisto e o granito que são rochas ígneas ou metafóricas ácidas, resultando assim numa tendência para a formação de solos pobres em minerais e em alguns nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Por outro lado a natureza do material geológico é propícia à formação de solos ácidos e com elevados níveis de certos metais pesados como o manganês (Mn), factor que condiciona muito a prática agrícola visto que a maioria das plantas, e em especial os cereais, são extremamente sensíveis a este fenómeno.

O Mn é um micro-nutriente essencial para a maioria dos organismos, sendo que nas plantas este participa na estrutura de proteínas e enzimas fotossintéticas e o seu deficit é prejudicial pois afecta a atividade dos cloroplastos ao nível do sistema de divisão das moléculas de água no fotossistema II (PSII), que fornece os eletrões necessários à fotossíntese (Buchanan *et al.*, 2000). No entanto, níveis excessivos deste nutriente no solo podem causar efeitos de toxicidade nas plantas tendo em conta que, segundo Clarkson, (1988), existem discrepâncias entre a necessidade e o teor de Mn encontrado nos tecidos vegetais indicando que, ao contrário da maioria dos nutrientes, a absorção de Mn é pouco regulada pela planta e pode levar à acumulação de Mn até níveis tóxicos. Devido a esta aparente falta de mecanismo de regulação para o Mn as plantas podem absorver e transportam este nutriente em quantidades excessivas, acumulando-o na parte aérea sendo esta a mais afetada pela toxicidade de Mn, provocando o amarelecimento ou até mesmo pontos necróticos nas folhas. A parte radicular é menos afectada pela toxicidade de Mn numa fase mais inicial mas com a persistência deste tipo de stress acaba por ser também ela prejudicada. Por outro lado, concentrações excessivas deste nutriente nas plantas pode provocar a alteração de vários processos metabólicos tais como a atividade enzimática que por sua vez vai influenciar a absorção, translocação e utilização de outros elementos minerais (*e. g.* Ca, Mg , Fe e P) e causar stress oxidativo (Ducic *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2007) . Assim, a maior parte dos estudos relacionados com o Mn na nutrição de plantas refere-se à toxicidade que este nutriente provoca, principalmente em solos com problemas de drenagem e com valores de pH inferiores a 5,5 que são factores que levam ao aumento da sua disponibilidade (Abreu *et al.*, 1994). A toxicidade provocada por este nutriente tem sido reconhecida como um importante factor limitante no crescimento e desenvolvimento das plantas em solos ácidos e mal drenados. Apesar disso, a tolerância pode diferir consideravelmente entre espécies e entre diferentes cultivares

dentro da mesma espécie devido às características genéticas e fatores ambientais tais como a disponibilidade de nutrientes no solo. Segundo Chinnery e Harding, (1980) e Lohnis, (1960), a presença de outros iões tais como Fe, Ca e Mg podem modificar a absorção de Mn da solução do solo e Maas *et al.*, (1969) demonstrou que os iões de cálcio estimulam a captação de iões de Mn por parte das raízes mas que o magnésio por sua vez reduz a absorção. Para além disso, estes estudos permitiram ainda concluir que a presença de cálcio aumenta a inibição da absorção de magnésio, factor que por sua vez vai permitir que seja absorvido uma maior quantidade de Mn, pelo que o rácio Mn/Mg na solução do solo se torna decisivo para a manifestação de sintomas de toxicidade de Mn na planta (Goss & Carvalho, 1992) O encharcamento do solo potencia condições de anaerobiose que podem levar a um aumento da solubilidade de Mn, que por sua vez associada à lavagem de Mg das camadas superficiais, contribui para uma diminuição do rácio Mn/Mg (Goss & Carvalho, 1992) fazendo com que em anos chuvosos as situações de toxicidade de Mn para as plantas possam ser agravadas. Posto isto, verifica-se que a absorção de Mn está intimamente relacionada com uma vasta conjugação de factores naturais e biológicos que interagem entre si e ditam a presença deste nutriente no ambiente, e por sua vez na planta, sendo que a definição de limites de toxicidade de Mn nas plantas é uma tarefa complexa uma vez que os seus efeitos negativos dependem da concentração de outros iões. No entanto a natureza desenvolveu os seus próprios meios para manter o equilíbrio nos sistemas ecológicos e neste contexto as micorrizas desempenham o papel de agente estabilizador e regulador. Vários trabalhos de pesquisa (Hwang *et al.*, 1992; Raven *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2006) demonstram que a colonização micorrízica realizada por FMA desempenha um papel importante em situações onde a presença de Mn no solo é bem marcada. Segundo os resultados destes estudos, as plantas colonizadas por FMA tornaram-se mais tolerantes ao excesso de Mn e até inclusivamente conseguiram superar a toxicidade, não só de Mn mas também de outros metais pesados, pela diminuição dos seus teores na parte aérea da planta (Bethlenfalvay & Franson, 1989; Cardoso, 1996; Díaz *et al.*, 1996; Nogueira & Cardoso, 2000). Os mecanismos que estão por trás deste fenómeno são ainda pouco conhecidos mas os resultados de alguns estudos levados a cabo neste âmbito relevaram a atuação de processos pelos quais os metais pesados, por exemplo, ficam retidos nas hifas intracelulares dos FMA (Dehn & Schüepp, 1989) ou são adsorvidos às hifas externas (Joner *et al.*, 2000) ou pela oxidação nas raízes (Foy *et al.*, 1988).

Assim, uma micorrização eficiente e com FMA nativos bem adaptados às condições edafoclimáticas, podem ser uma arma extremamente poderosa na prevenção, atenuação ou até mesmo eliminação dos fenómenos de toxicidade provocados pelo Mn nos cereais. Tendo em conta que os

solos nacionais contem níveis de Mn consideráveis e visto que este factor se torna um factor limitante à produção em certas zonas de Portugal, os AMF podem ser um aliado com peso elevado numa estratégia de recuperação de zonas improdutivas.

4 - O solo e a sua biodiversidade enquanto sistema:

O solo, para além de servir como substrato de crescimento a toda a flora terrestre, é também um meio vivo e dinâmico onde ocorrem processos biológicos imprescindíveis para a manutenção e equilíbrio dos mais variados ecossistemas. Os processos biológicos são realizados por comunidades de organismos micro e macroscópicos que habitam o solo, realizando atividades tão importantes como a decomposição de matéria orgânica, reciclagem de nutrientes, eliminação de agentes patogénicos ou a fixação de azoto atmosférico, que são necessárias para manter ou aumentar a qualidade de qualquer solo e assim proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento de qualquer planta. O solo é o habitat de uma grande variedade e quantidade de organismos vivos que apresentam uma elevada diversidade metabólica e fisiológica, sendo estes os principais responsáveis pela qualidade e fertilidade de um solo pois as ações que nele realizam criam reservas de nutrientes para a flora terrestre tornando-se na principal fonte natural de nutrientes. É na imensa diversidade metabólica e fisiológica que reside uma das grandes mais valias da presença destes organismos, pois no solo conseguimos encontrar organismos biófagos, saprófagos, simbiotróficos que possuem diferentes formas de obter alimento e assim é conseguido o aproveitamento total de toda a matéria passível de ser transformada em nutrientes que as plantas possam absorver. Os primeiros exercem uma das principais bases de controlo biológico através da predação visto que se alimentam de outros seres vivos (fungos, plantas e micróbios), tendo como exemplo os nemátodes, ácaros e insectos. Este seres tem ainda uma importante acção na estruturação, arejamento e drenagem do solo dado que criam galerias e canais por onde o ar e água podem circular livremente contribuindo para uma boa oxigenação das raízes e uma melhor drenagem da água para os aquíferos e reservas subterrâneas e assim evitar situações de encharcamento. Ao mesmo tempo estes seres vivos geram resíduos com a sua alimentação, atividade e aquando a sua morte serão decompostos e transformados por outras formas de vida existentes no solo. Esta decomposição esta a cargo de outro tipo de organismo presente no solo, os organismos saprófitas que se alimentam da matéria orgânica vegetal e animal morta em decomposição e tem um papel fundamental no ciclo de reciclagem de nutrientes pois conseguem decompor esta matéria orgânica em matéria inorgânica, matéria da qual as plantas

retiram os nutrientes necessários à sua subsistência. Assim, é importante aumentar os níveis de matéria orgânica dos solos visto que esta é a principal fonte alimentar para garantir uma saudável atividade biológica, atividade esta que, segundo Carvalho, (2012), é a base da fertilidade de qualquer solo. De acordo com o mesmo autor a estratégia mais eficaz para a recuperação da fertilidade dos solos portugueses passa pelo aumento do teor de matéria orgânica, visto que atualmente quase 3/4 dos solos nacionais apresentam um teor de matéria orgânica inferior a 1%, valor extremamente baixo e incapaz de garantir uma saudável atividade da fauna e flora microbiana do solo. Este aumento de matéria orgânica, tendo em vista o incremento da fertilidade para aproveitamento agrícola, passa pela adopção de algumas práticas como a manutenção dos resíduos das culturas (raízes e palha) e aplicação de estrume, substâncias ricas em carbono orgânico que é a principal fonte de energia para a maioria destes microrganismos e na qual o solo é pobre (Cardoso *et al.*, 1992). Associado a estas práticas, é necessário ainda eliminar as mobilizações, visto que estas destroem a estrutura e estabilidade dos agregados do solo ao mesmo tempo que alteram as condições em que todos os organismos benéficos se desenvolvem, levando à diminuição da presença destes prejudicando assim a sua fertilidade. Para além disso, ao promover a destruição e arejamento sobretudo de macro agregados, a mobilização do solo acelera o processo de mineralização da matéria orgânica fazendo com que a disponibilização dos vários componentes minerais ocorra de forma concentrada e, no caso da nossa situação climática, em períodos de precipitação mais acentuada, promovendo a lavagem destes elementos antes que o seu aproveitamento pelas plantas seja possível. Uma grama de solo em boas condições pode conter 600 milhões de bactérias pertencentes a 15000 ou 20000 espécies diferentes, já nos solos desérticos, estes valores diminuem para 1 milhão e 5000 a 8000 espécies, respectivamente, o que é um indicador claro da importância de todos os organismos do solo na instalação e manutenção da flora terrestre (Confagri, 2007). Estudos relevam que os microrganismos e invertebrados representam quase 90% das espécies da Terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas, no entanto conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus e menos que 5% dos fungos. Embora menos estudados, muitos grupos de microrganismos são essenciais para a sobrevivência das formas de vida na terra e uma vez que o solo é habitado por uma infindável quantidade e diversidade destes microrganismos, torna-se quase obrigatório conservar e respeitar estas comunidades para que o equilíbrio dos ecossistema se mantenha.

É por isso necessário alterar a mentalidade dos agricultores, no que às práticas agrícolas diz respeito, e optar por técnicas agrícolas de conservação e não perturbação do solo tendo em vista a conservação desta imensa biodiversidade macro e microbiana benéfica para a sustentabilidade a

longo prazo de todos os sistemas agrícolas. O sistema de rotação das culturas é também uma forma de promover a atividade biológica do solo pois oferece uma fonte de alimentação variada aos microrganismos do solo (FAO, 2008). As raízes exsudam diferentes substâncias orgânicas que “atraem” os diversos tipos de bactérias e fungos, os quais têm uma função importante na transformação dessas substâncias em nutrientes disponíveis para as plantas, pelo que a diversidade de culturas em rotação, contribui para uma vida microbiana variada. No solo há ainda outro tipo de organismos que se destacam, os organismos simbiotróficos, que se nutrem de substâncias provenientes de relações de simbiose com outros organismos vivos. Estas relações de simbiose podem ser mutualistas, na qual ambos os seres vivos envolvidos beneficiam, ou parasíticas onde apenas o organismo parasita tira partido ao mesmo tempo que prejudica o hospedeiro. Os organismos simbiotróficos presentes no solo merecem especial atenção pois estes desencadeiam processos que influenciam, de certa forma, a fertilidade e a capacidade que cada solo possui para garantir o saudável desenvolvimento das plantas. Um dos exemplos mais conhecidos e estudados referente às relações mutualistas ocorridas no solo é o caso da simbiose estabelecida entre espécies de plantas da família *Leguminosae* e bactérias do género *Rhizobium* (rizóbios), na qual os rizóbios conseguem fixar o azoto molecular presente na atmosfera e transforma-lo em formas assimiláveis (NH_3), originando assim impactos diretos no crescimento das plantas visto que o azoto é um dos elementos fundamentais para o seu desenvolvimento. Do ponto de vista agrícola a relação estabelecida entre leguminosas e rizóbios ganha especial relevância dado que as necessidades de aplicação de adubos azotados nas culturas que estabelecem a simbiose ficam significativamente mais reduzidas e ao mesmo consegue-se um enriquecimento, ainda que pouco significativo, em compostos azotados no solo que num sistema de rotação de culturas poderão ser aproveitados pela cultura seguinte. Mas não são apenas as bactérias que estabelecem este tipo de relações com as plantas, os fungos são também um exemplo de microrganismo que estabelece relações mutualistas com as plantas. No solo, os fungos são os principais responsáveis no desencadeamento de vários processos microbiológicos e ecológicos que influenciam a fertilidade do solo, como a decomposição, reciclagem de minerais e matéria orgânica. Os fungos são microrganismos heterotróficos e como tal não possuem a capacidade de produzir o seu próprio alimento, sendo por isso necessário recorrer a fontes externas de carbono, carbono que é o elemento vital à sobrevivência destes seres, para conseguir energia para completar os seus processos biológicos. Estes microrganismos desenvolveram ao longo dos séculos três estratégias tróficas diferentes para obter carbono, o saprofitismo, a necrofagia ou através do estabelecimento de relações de simbiose com outros seres vivos (Finlay,

2008). As relações de simbiose estabelecidas entre as raízes e determinados fungos presentes no solo é a forma mais antiga e ocorre na esmagadora maioria das espécies vegetais existentes no mundo, sendo por isso uma das formas tróficas com mais objectos de estudo e mais interesse do ponto de vista agrícola dadas as suas particularidades únicas e influencia no bem estar e nutrição de plantas.

5 - As associações micorrízicas:

Em 1885, o botânico alemão Albert Bernard Frank sugeriu o termo “ micorriza”, do grego *mycos* [fungo] e *rhiza* [raiz], para descrever este tipo de estruturas que se estabeleciam nas raízes e desde então tem sido o termo utilizado para nos referir-mos estas relações simbióticas entre fungos e raízes de plantas (Smith & Read, 2008). Segundo o mesmo mesmo botânico alemão, esta associação representava uma situação comum que ocorria na esmagadora maioria das espécies vegetais resultante de uma união orgânica entre raízes e o micélio de fungos a um órgão morfológicamente independente, com dependência fisiológica íntima e recíproca, onde ambas as partes tiravam partido com funções fisiológicas muito estreitas. Frank propôs ainda a hipótese de esta associação eventualmente interferir na nutrição e desenvolvimento das plantas, no entanto a comunidade científica da altura deitou por terra esta suposição pois consideravam que esta relação era uma relação estritamente parasítica. Ciente e convencido que era dono da razão neste aspecto, Frank demonstrou em 1894 de forma convincente que a colonização das raízes pelos fungos influenciava o desenvolvimento das plantas na medida em que ajudava a absorver nutrientes do solo e do húmus sem que a presença do fungo causasse qualquer transtorno ou disfunção na raiz, caracterizando-a então como uma relação de natureza mutualista. (Siqueira e Franco,1988).

Albert Bernard Frank foi assim o primeiro botânico a especular uma eventual relação de simbiose entre fungos presentes no solo e raízes de plantas, teorias que foram comprovadas através de investigações levadas a cabo pelo mesmo naquela época e que mais tarde viriam a ser confirmadas através da utilização das técnicas da ciência moderna constituindo uma das principais bases do estudo das micorrizas. As micorrizas podem então ser definidas como uma associação simbiótica mutualista estabelecida entre raízes de plantas superiores terrestres e certos fungos existentes no solo, onde tanto a planta hospedeira como o fungo simbiote são beneficiados. Passados largos anos um outro investigador que se debruçava sobre o estudo das relações de simbiose ocorridas entre fungos e raízes de plantas, J.L. Harley, enunciou a frase: “As plantas não

têm raízes, elas têm micorrizas”, citação que espelha com clareza a importância da existência destas relações, visto que em condições naturais, a maioria das plantas terrestres as estabelece. Ainda segundo van der Heijden *et al.*, (1998a,b), um outro grupo de investigadores neste campo, enfatizaram que “associações micorrízicas devem sempre ser consideradas quando se tenta entender a ecologia e evolução de plantas, as suas comunidades e ecossistemas”. Esta consideração está baseada em experiências que demonstram o papel dessa simbiose no resultado da competição e sucessão de plantas, bem como na hipótese de que a evolução de plantas terrestres ter sido dependente da presença dessa simbiose (van der Heijden *et al.*, 1998a,b; Kiers *et al.*, 2000; Klironomos *et al.*, 2000; Cairney, 2000; Brundrett, 2002; Allen *et al.*, 2003). Assim, o estudo e conhecimento do fenómeno micorrízico torna-se quase fundamental numa actividade como a agricultura onde se procura garantir às culturas todas as condições ao seu normal desenvolvimento para estas expressem todo o seu património genético porque não adianta ter sementes/plantas com elevado potencial genético se depois as condições onde se desenvolvem não permitem que ele se expresse.

5.1. - Os vários tipos de associações micorrízicas:

Na relação micorrízica, a planta transloca para o fungo fotoassimilados que auxiliam na manutenção e desenvolvimento de novas formas de propágulos de infecção e/ou estruturas morfológicas fúngicas, enquanto que o fungo melhora a produtividade da planta através da melhoria do seu estado nutricional uma vez que é ampliada a superfície de contato da raiz com o solo, devido ao desenvolvimento de hifas extrarradiculares, optimizando assim a absorção de água e nutrientes principalmente aqueles considerados pouco móveis. Além disso, a micorrização pode proporcionar à planta tolerância a situações de stress biótico e abiótico, auxiliando assim as plantas numa melhor colonização de todo o tipo de solos, desde os mais pobres aos mais férteis. As micorrizas estiveram ainda na base da evolução, estabelecimento e adaptação das plantas aos vários biosistemas terrestres especialmente no período Devónico há 400 milhões de anos atrás, a partir do qual as plantas aquáticas com a ajuda das micorrizas conseguiram colonizar o meio terrestre até aos dias de hoje, razão pela qual estas associações estão presentes em quase todos os grupos de plantas terrestres (Barea e Azcon-Aguilar, 1983). As associações micorrízicas podem ocorrer de várias formas e são classificadas tendo em conta a sua estrutura, morfologia, modo de infecção e tipo de organismo mutualista que as estabelecem, sendo que actualmente são reconhecidos para efeitos práticos principalmente dois grandes grupos de micorrizas:

Ectomicorrizas e Endomicorrizas (Harley e Smith, 1983; Harley e Harley, 1987). Esta classificação atende essencialmente à zona onde as hifas dos fungos se desenvolvem, assim, os fungos cujas hifas penetram as células da raiz são incluídas no grupo das endomicorrizas, ao passo que as ectomicorrizas inclui os fungos que se desenvolvem nos espaços inter-celulares das células radiculares. As ectomicorrizas são essencialmente encontradas no hemisfério norte em bosques de zonas temperadas com solos onde existe um horizonte marcadamente formado por húmus e onde o teor em matéria orgânica é elevado, podendo ainda ser encontradas em bosques tropicais e subtropicais e em ambientes onde o azoto é um factor limitante. Os fungos simbiotes que estabelecem este tipo de associação pertencem às divisões Ascomycotina e Basidiomycotina, possuem geralmente um elevado grau de especificidade e actualmente são conhecidas 5.000 espécies de fungos que estabelecem associações ectomicorrízicas, (Raven *et al.*, 1996), sendo estas associações características da maioria das lenhosas. As ectomicorrizas estão presentes em cerca de 3% das plantas herbáceas com semente e em certos grupos árvores e arbustos de maior porte como a família *Fagaceae*, a família *Salicaceae*, a família *Pinaceae* e outras famílias de árvores tropicais que formam densos agregados. A associação entre as ectomicorrizas e estas famílias de arvores torna-as de alguma forma mais resistentes às rigorosas condições de frio e seca, condições essas que são muitas vezes limitantes ao desenvolvimento de outro tipo de flora terrestre, desempenhando assim um papel fundamental na no estabelecimento e desenvolvimento das famílias de arvores mencionadas.

Por outro lado, muitos deste fungos ectomicorrízicos participam activamente e de uma forma decisiva na manutenção e estabilidade das comunidades florestais dado que são fonte de alimento para alguns animais em florestas temperadas e tropicais (Taylor, 1991). O modo de infecção das ectomicorrizas é diferente do modo ocorrido nos fungos endomicorrízicos. A infecção ectomicorrízica inicia-se quando são reunidas as condições de humidade e temperatura para activar e germinar os propágulos do fungo, que neste caso são esporos, formando um aglomerado de hifas na rizosfera que colonizam a superfície das raízes das plantas e finalmente penetram através das junções celulares na Zona de Infecção Micorrízica (ZIM) que se localiza logo atrás da zona meristemática apical da raiz. Os fungos ectomicorrízicos envolvem mas não penetram as células vivas da raiz, sendo que o crescimento das hifas do fungo ocorre entre as células do córtex da raiz criando uma estrutura característica inter-radicular, denominada rede de Hartig, que se revela bastante benéfica pois prolonga a vida das células, da raiz e conseqüentemente da própria planta. Esta penetração e interação fungo-planta promove modificações acentuadas nos hábitos de crescimento e morfologia dos segmentos de raízes colonizadas, permitindo assim a visualização

das ectomicorrizas a “olho nu” (Souza *et al.*, 2006). Nas árvores em que ocorre a colonização com ectomicorrizas, as funções dos pêlos radiculares são aparentemente desempenhadas pelas hifas que envolvem a raiz com uma “camada de hifas” e a partir da qual se estendem filamentos micélicos por todo o solo envolvente (Souza *et al.*, 2006). Alguns autores relacionam, ainda que de forma pouco fundamentada, estas associações ectomicorrízicas com a elevada longevidade que algumas árvores conseguem atingir.

Na natureza, para além das associações ectomicorrízicas, podemos ainda encontrar outras famílias de fungos micorrízicos que também estabelecem relações de simbiose mutualistas com a flora terrestre, os fungos endomicorrízicos. As associações endomicorrízicas são mais comuns que as associações ectomicorrízicas, pois apresentam um baixo grau de especificidade no que diz respeito ao hospedeiro levando à ocorrência destas na esmagadora maioria das famílias de plantas vasculares existentes no mundo. O facto destas associações não serem tão específicas, podendo uma espécie de fungo colonizar várias famílias de plantas, aliado à elevada capacidade que as endomicorrizas possuem para resistir às condições ambientais porque os seus esporos crescem facilmente e podem sobreviver no solo sem que haja contacto com uma raiz, fazem deste tipo de associação uma das mais abundantes nos vários ecossistemas terrestres existentes no mundo. Estão descritas apenas cerca de 200 espécies de fungos que formam associações endomicorrízicas, pertencendo a um Filo próprio, os Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2013). Neste tipo de associações, ao contrário do que acontece nas associações ectomicorrízicas, o fungo penetra e desenvolve-se nas células da raiz sem que a planta seja danificada e daí a utilização do afixo “endo” para diferenciar este tipo de fungos dos fungos que se desenvolvem nos espaços intercelulares da raiz sem que haja penetração das células, utilizando assim o afixo “ecto”. Segundo Sieverding, (1991), o grupo das endomicorrizas pode ser divididas em seis sub-tipos: Arbuscular, Arbutóide, Ericóide, Ecto-endomicorrizas, Monotropóide e Orquidóide. Alguns destes possuem uma grande especificidade no que diz respeito à planta hospedeira e como tal são apenas encontrados em algumas famílias de plantas terrestres, no entanto, as Micorrizas Arbusculares (MA) assumem um papel que merece especial importância pois são o sub-tipo mais relevante e abundante na natureza. Este sub-tipo está presente na maioria das famílias de plantas terrestres bem como na grande maioria dos ecossistemas encontrados no mundo. Assim, as MA ganham especial importância pois estão presentes na maioria dos sistemas agrícolas mundiais e o mediterrâneo não foge à regra, sendo as suas relações com as famílias de plantas envolvidas com interesse agrícola altamente relevante. As MA estabelecem relações de simbiose com uma das famílias botânicas mais importantes de todas para o ser humano quer a nível alimentar quer a

nível económico, a família “*Poaceae*”, que inclui plantas como o trigo, centeio, milho, cevada, arroz, aveia, sorgo, etc. Estas culturas, como foi abordado no capítulo da introdução, ocuparam um papel fundamental na história da humanidade e nos dias de hoje a sua importância prevalece sendo por isso oportuno conhecer e estudar todas as relações em que estas estão envolvidas a fim de criar as condições óptimas para o seu desenvolvimento e assim diminuir dos maiores flagelos da humanidade, a fome e a falta de cereais a nível mundial. Para além da família “*Poaceae*”, as MA estão presentes ainda noutras famílias botânicas com elevado interesse agrícola nomeadamente família “*Fabaceae*”, família “*Solanaceae*”, família “*Cucurbitaceae*”, etc, o que leva a que este sub-tipo de endomicorrizas seja um dos mais importantes e mais estudados, visto que as relações fungo-planta são essenciais para o bom desenvolvimento das culturas.

6 - Micorrizas Arbusculares (MA):

6.1. - Dispersão:

A presença das Micorrizas Arbusculares (MA) estende-se por todo o globo e estas podem ser encontradas em quase todos os ecossistemas terrestres visto que, e segundo vários estudos realizados, 80 % das famílias de plantas formam MA, sendo por isso mais fácil listar as plantas que não formam este tipo associação (Siqueira e Franco, 1988). É devido à ubiquidade desta simbiose que as MA tem sido consideradas tão importantes e o facto de estas estabelecerem relações com um numero tão elevado de plantas faz com que a expressão destes fungos no solo seja bem marcada, podendo mesmo representar quase 50% da biomassa microbiana em sistemas agrícolas (Olsson *et al.*, 1999). A relação de simbiose entre MA e plantas é considerada a mais primitiva de entre todas as relações micorrizicas conhecidas visto que, e segundo levantamentos fósseis realizados, as primeiras plantas a colonizar o meio terrestre já estabeleciam relações simbióticas com fungos que apresentavam estruturas miceliais e esporos similares aos dos atuais fungos micorrizicos arbusculares (Redecker *et al.*, 2000b). Os levantamentos fosseis realizados foram fundamentais para entender e saber, ainda que com relativamente pouca precisão, a origem desta simbiose que remonta ao período Ordoviciano (há 450 milhões de anos atrás) onde já se regista com nitidez a existência da relação entre fungos e plantas em fósseis da época (Redecker *et al.*, 2000a). A maioria dos autores especula que os fungos micorrizicos arbusculares cumpriam as funções de absorção nutricional sendo fundamentais para a colonização do meio terrestre por parte das plantas dado que as primeiras plantas terrestres registadas em fósseis eram desprovidas

de pêlos radicares. Além disso, o que hoje chamamos raiz não era mais que uma estrutura similar a rizóides, sem tecidos vasculares e sem capacidade de absorção de nutrientes, cuja principal função era a de suporte (Malloch *et al.*, 1980; Raven e Edwards, 2001). Ainda que a origem e modo como esta associação teve início seja motivo de discussão e controvérsia, o papel desempenhado por esta relação de mutualismo é claro, sendo fundamental na ecologia e evolução das espécies vegetais. Como tal, devido à ancestralidade e importância da relação, a promoção e manutenção desta relação deve ser levada em conta nos sistemas agrícolas e actuar com benefícios no desenvolvimento das culturas visto que a acção das micorrizas arbusculares nas plantas promove inúmeras vantagens, principalmente a nível nutricional e na resistência a stress bióticos e abióticos.

6.2. - Morfologia e modo de colonização característico:

Os fungos MA, sem excepção, são simbioses obrigatórios o que significa que dependem da simbiose com plantas compatíveis para concluir o seu ciclo de vida e se multiplicarem. Estes, como já foi referido, estão englobados no grupo das endomicorrizas e como tal o modo de acção, modo de infecção, ciclo biológico e estruturas difere do que encontramos nas ectomicorrizas. No que às MA diz respeito, a infecção pode iniciar-se a partir de estruturas típicas e próprias deste tipo de fungo que estão presentes no solo denominadas propágulos, podendo ser esporos, fragmentos de raízes colonizadas (hifas intercelulares) ou hifas que crescem de raízes colonizadas (micélio extra-radicular). O esporo é uma das fontes de inoculo das MA e não é mais que um aglomerado de células, envolvidas por uma parede celular, que as protege até que as condições ambientais se mostrarem favoráveis à sua germinação. Um dos principais factores para que a germinação do esporo ocorra, e visto que se trata de um simbionte obrigatório, é quando a presença da planta é “notada” pelo fungo por via de alguns exudatos da planta, sendo os flavonóides um dos compostos que se suspeita que tenha mais influência (Bécard *et al.*, 1995). Numa segunda fase estes propágulos, quando estimulados pelos componentes edafo-climáticos e pelas condições físico-químicas da rizosfera, germinam e formam hifas de infecção que crescem, aumentando assim a probabilidade de criar contacto com a planta e estabelecer a associação. No entanto, vários autores têm mostrado que o inoculo existente no solo composto por fragmentos de raízes e estruturas como o micélio extraradical (ERM), apresentam maior eficiência na colonização quando comparado ao que acontece por via de esporos, problema ainda mais agravado quando estes esporos estão em baixas quantidades (Sieverding, 1991). O ERM é uma

rede de hifas extremamente longas e finas que se espalham pelo solo, sendo mais eficientes que as raízes na captura de nutrientes. Por serem finas, com cerca de 2 μm de diâmetro, as hifas arbusculares podem explorar volumes do solo inatingíveis por estruturas radiculares (pêlos radiculares apresentam valores de 10–20 μm de diâmetro e raízes laterais de 100–500 μm) e portanto, estas são capazes de absorver os elementos minerais, como uma raiz, mas de maneira mais eficiente. A quantidade de micélio extra-radicular pode atingir até 1,5 m de hifa por cm de raiz colonizada, ou 55 m/g de solo rizosférico (Siqueira e Franco, 1988). Numa fase posterior da infecção, as hifas ao entrarem em contacto com as raízes das plantas aderem à epiderme ou pêlos radiculares e formam estruturas que tem uma função de suporte sem que haja trocas de nutrientes denominada aperssório. Uma vez formado o aperssório e por acção mecânica e enzimática, as hifas invadem córtex intercelularmente tornando-se, posteriormente, intracelulares através da penetração das células da epiderme na zona de diferenciação e alongamento, formando assim uma “unidade de infecção” (Souza *et al.*, 2006). É devido às enzimas que a MA liberta que a planta “reconhece” que está a ser invadida por um ser simbiote e reage de forma a permitir a colonização do meio celular da raiz, caso contrário a planta responderia com a formação de componentes da parede celular primária e secundária, contendo compostos como calose, fenóis e proteínas, como se de um patógene se trata-se. Em relação à colonização efectuada por fungos micorrízicos arbusculares são muito poucas as plantas que reagem a nível celular à formação de aperssório ou hifa de infecção, não ocorrendo assim nenhuma reacção na parede celular das células epidérmicas. Porém, ocasionalmente em algumas plantas, ocorre o engrossamento da parede das células epidérmicas no ponto de contato do aperssório mas na sua composição não constam substancias como calose ou fenóis, que apenas ocorrem em situações de infecção patogénica (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). A única reacção que acontece é a síntese de membrana e deposição de parede celular permitindo que a hifa do fungo se entranhe no ambiente celular, diz-se então que as plantas hospedeiras não possuem resposta de defesa típica ao fungo micorrízico (Bonfante-Fasolo, 1984; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). Este mecanismo biológico ocorrido entre o fungo e a planta é como se, metaforicamente, ocorre-se uma “conversa” entre os dois e onde se estabelecia um acordo de mutualismo onde os dois seriam beneficiados e só desse forma a planta deixa o fungo entrar no seu meio. Esta relação tão estreita ocorrida entre as plantas e aos FMA é possível graças ao facto de o fungo produzir hifas extra e intra-radulares capazes de absorver elementos minerais do solo e transferi-los para o ambiente celular. É já em ambiente celular que se encontra aquela que é considerada, do ponto de vista fisiológico, a principal estrutura promotora desta troca bidirecional, os arbúsculos, que são

estruturas únicas e características formadas pelos fungos do filo Glomeromycota tornando-os especialmente peculiares. Esta estrutura é considerada a “chave” para o desenvolvimento da simbiose micorrízica e a sua formação depende da completa interação genética e funcional entre combinações fungo-planta (Harrison, 1999). Os arbúsculos são estruturas formadas pela interação das hifas emitidas pelos AMF com a membrana plasmática de algumas células do córtex e tem origem na penetração de células corticais pela hifa, causando invaginações na plasmalema. Ao penetrar a parede celular a hifa torna-se extremamente fina e ramifica-se, com diâmetro menor que 1 μm , originando uma matriz de troca com a plasmalema da célula vegetal sem a ultrapassar. Devido à ramificação ocorrida, aumenta-se fortemente a superfície de contato entre as membranas dos simbioses, o que permite uma eficiente troca de metabólitos, sinais, nutrientes e compostos orgânicos entre a planta e o fungo (Berbara *et al.*, 2006). Por outro lado, a presença dos arbúsculos provoca ainda outras modificações morfológicas e fisiológicas na célula das raízes colonizadas, nomeadamente a diminuição do tamanho dos vacúolos, aumento do tamanho do núcleo, aumento do volume do citoplasma e aumento no número de alguns organelos celulares como mitocôndrias, plastídeos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Esta estrutura tem um período de vida bastante curto, aproximadamente de 4 a 5 dias, período após o qual entra em fase de senescência e sofre degeneração, voltando a célula a ter o aspecto e a actividade normal anterior à colonização (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). As MA possuem ainda uma outra grande particularidade do que diz respeito às estruturas que as compõem, a criação de vesículas. Estas estruturas são corpos globosos, inter ou intracelulares, com tamanho de 30 a 100 μm ricas em lípidos, o que sugere tratar-se de órgãos de reserva. As vesículas têm origem no inchamento de uma hifa geralmente terminal e principalmente nas espécies de fungos do género *Glomus* pode chegar a engrossar as paredes e tornar-se num esporo (Bonfante-Fasolo, 1984). Segundo Walker (1995), todos os fungos micorrízicos arbusculares formam arbúsculos, mas alguns não formam vesículas, sendo este o principal argumento para alterar a denominação de “micorrizas vesículo-arbusculares” para “micorrizas arbusculares”.

6.3. - Benefícios decorrentes da micorrização:

São inúmeros os benefícios que esta relação origina no estado da planta, sendo a função nutricional das MA das mais importantes e mais estudada pelos investigadores desta área ao longo dos anos, especialmente no que se refere a elementos pouco móveis na solução do solo como o P, no entanto o potencial desta relação de simbiose mutualista vai muito mais além fazendo com que as MA tenham um elevado interesse ecológico a ser explorado. Para além da

função nutricional os fungos MA envolvidos nesta relação promovem inúmeros benefícios no crescimento e desenvolvimento das plantas conferindo-lhes resistência perante ataques patogênicos (Hwang *et al.*, 1992), tolerância a situações de stress hídrico e aumento da eficiência fotossintética (Brown e Bethlenfalvay, 1987), bem como resistência a níveis tóxicos de certos minerais como o Mn (Cardoso *et al.*, 2003), que é uma das causas responsável pela perda de solo produtivo no território português dado que a maioria dos solos nacionais são ácidos e com problemas de excesso deste mineral que prejudica fortemente o desenvolvimento vegetal. A presença das MA nos ecossistemas proporciona ainda um impacto benéfico significativo sobre a estruturação e estabilidade de agregados do solo fruto da ocorrência de uma imensa quantidade de hifas produzidas por FMA (Jastrow *et al.*, 1998). Nesta simbiose, os fungos MA podem receber mais de 10% dos fotoassimilados produzidos pela planta hospedeira e estas por sua vez beneficiam da presença dos fungos através da melhoria do estado nutricional, especialmente em solos onde o nível de nutrientes pouco móveis é baixo. Os FMA também têm sido estudados em relação ao seu potencial como agentes de bio-control de doenças e pragas (Zambolim *et al.*, 1992; Fitter & Gorbaye, 1994; Maia *et al.*, 2005) e pela capacidade que têm de aumentar a densidade do sistema radicular, ajudando na recuperação, quando as plantas são sujeitas a situações de stress hídrico (Bryla & Duniway, 1997). Como já foi referido, a presença das MA traz grandes benefícios para as plantas e nesses benefícios está uma melhoria na eficiência de absorção de certos elementos essenciais como o P, S e Mg, elementos que muitas vezes estão pouco disponíveis em condições normais. Estes elementos participam nos processos metabólicos mais importantes da planta e a falta deles pode traduzir-se na perda de população, atrasos no desenvolvimento normal ou até mesmo a morte da planta, o que num contexto agrícola significa perdas de produção. Neste sentido, a associação fungo-planta traduz-se em inúmeros benefícios ampliando a capacidade produtiva dos sistemas agrícolas e numa altura em que os solos nacionais apresentam graves sintomas de degradação, não só devido à própria natureza litólica dos solos mas também muito por causa do modo como o temos cultivado (Carvalho, 2004), uma das estratégias para contornar e melhorar a capacidade produtiva dos nossos solos pode passar pela adopção de práticas agrícolas de conservação de solo que conseqüentemente conservam e incrementam a actividade microbiana trazendo assim melhorias na produtividade dos sistemas agrícolas. Nas regiões tropicais, que tradicionalmente apresentam solos com níveis baixos de fósforo (P), as associações micorrízicas merecem mais atenção considerando que, do ponto de vista económico, podem minimizar os gastos com inputs, tais como fertilizantes minerais, irrigação e pesticidas (Sieverding, 1991).

6.4. - Fontes de inoculo natural e o Inoculo comercial:

Os esporos são as estruturas que asseguram a permanência dos AMF nos sistemas de mobilização convencional dado que, devido à acção mecânica gerada pelas alfaías no solo, a rede de hifas é destruída o que diminui significativamente a fonte de inoculo associada ao micélio extra-radicular. A infecção que acontece a partir de esporos é normalmente mais lenta relativamente ao que acontece nas outras fontes de inoculo, uma vez que é necessário ocorrerem as condições ambientais ideais para que esta aconteça e o seu desenvolvimento, até que a relação esteja totalmente estabelecida, é mais demorado. Por outro lado, se a rede de micélio extraradical for abundante e desde que esta rede se mantenha intacta, a cultura ao chegar ao solo entra em contacto com a fonte de inoculo que proporciona uma colonização mais rápida. Logo, a cultura fica mais rapidamente colonizada o que a beneficia, tanto na protecção contra stresses bióticos ou abióticos como na absorção de nutrientes, desde as fases iniciais do ciclo vegetativo devido à presença da micorriza. Assim, e visto que a cultura envolvida neste estudo é o trigo cuja sementeira é realizada em Novembro onde a temperatura é baixa, o processo de germinação dos esporos é fracamente mais lento, e portanto a colonização micorrízica do trigo na sua fase inicial está fortemente dependente de uma outra fonte de inoculo, a rede de micélio extraradical (ERM). Este ERM pode ser desenvolvido no solo de várias formas: pela cultura precedente da rotação, desde que seja micotrófica; pelas próprias infestantes que germinam após as primeiras chuvas de Setembro antes da sementeira das culturas de Outono/Inverno ou, para as culturas de Primavera/Verão por uma cover crop micotrófica especialmente semeada para o efeito. Se conservarmos esta rede de hifas criada pela cultura antecedente através de técnicas de conservação de solo como a sementeira directa, as probabilidades de ocorrência da infecção são aumentadas uma vez que o ERM permanece intacto e com a manutenção desta rede de hifas, a infecção irá ocorrer mais depressa comparativamente aos esporos. Portanto, ao mobilizar o solo estamos a reduzir a taxa de colonização por FMA uma vez que a rede do micélio extraradical é rompida e como consequência a colonização é essencialmente iniciada por fontes de inoculo de crescimento mais lento.

A utilização e aplicação destes fungos através da inoculação dos terrenos agrícolas é ainda restringida pela baixa disponibilidade de inoculantes comerciais com qualidade e quantidade, devido ao facto de os fungos MA serem biotróficos obrigatórios, ou seja, só completam o seu ciclo de vida quando associados a um hospedeiro vegetal vivo. Este facto, aliado à falta de tecnologia

adequada para produção de inoculantes MA, torna este processo com pouco interesse comercial e fora de questão no contexto de uso em agricultura (Saggin Júnior & Lovato, 1999). Para além disso os inóculos comerciais são geralmente constituídos por apenas 3 ou 4 espécies de FMA, pelo que a sua biodiversidade é muito reduzida. A aplicação de inoculante poderia ainda levantar problemas ecológicos e interferir com outros organismos do solo e prejudicar os fungos MA nativos com consequências directas na capacidade de colonização a curto e longo prazo. Então, a melhor forma de garantir e conseguir boas taxas de colonização iniciais da cultura é evitar a destruição da rede de micélio extraradical do inóculo nativo e naturalmente biodiverso, utilizando técnicas de conservação do solo como a sementeira directa que mantém a estrutura do solo inalterada. A sustentabilidade da actividade agrícola está intimamente relacionada com a forma como cultivamos os nossos solos, assim, adoptando práticas de conservação de solo conseguimos aumentar a presença das MA no solo que inevitavelmente irá afectar positivamente a produtividade das culturas em solos degradados num processo lento mas com grande valência a longo prazo. Com isto conseguimos ainda que as espécies nativas proliferem, espécies estas que estão bem adaptadas às condições edafo-climáticas de cada região e a sua resposta aos vários factores envolvidos na colonização será certamente mais positiva e benéfica tanto para o fungo como para a planta. Factores como a velocidade de crescimento, diferenciação intra e extra-radicular e esporulação, estão altamente dependentes da espécie de fungo em questão, do património genético da planta hospedeira e das condições do solo, no entanto a disseminação dos FMA é relativamente rápida e uma vez que estão bem adaptados mais rápido se torna o processo de colonização. A promoção das micorrizas nativas é, por isso, um aspecto a ter em conta dado que estas estão melhor adaptadas às condições climáticas da zona em questão e como tal a sua acção e persistência são francamente mais elevadas quando comparadas com micorrizas de ecossistemas diferentes. Este é outro dos motivos pelos quais a comercialização de inoculo para aplicação agrícola está fora de questão pois as micorrizas nativas iriam certamente ter um melhor desempenho em relação às aplicadas, para além de que as micorrizas aplicadas iriam ter dificuldades de adaptação às condições climáticas o que atrasaria o estabelecimento da comunidade. As micorrizas nativas são sem dúvida a melhor fonte de inoculo quando comparado com inoculo comercial e Tchabi *et al.* (2010), demonstraram num estudo o elevado potencial das MA nativas para fornecer benefícios de crescimento a plantas para micro-propagação de inhame na fase de transplantação. Foram testados vários isolados de várias espécies de fungos MA, no entanto as micorrizas nativas e, curiosamente, alguns isolados não nativos mas que ocorrem na zona próxima do local de estudo foram os que promoveram um melhor crescimento de tubérculos

de inhame demonstrando assim mais eficiência na colonização. A eficiência da colonização traduz-se numa melhor e mais rápida acção das micorrizas sobre as plantas no que diz respeito aos benefícios que esta relação acarreta.

6.5. - Plantas hospedeiras - ligações preferenciais:

As micorrizas arbusculares possuem um leque extremamente alargado no que diz respeito às plantas hospedeiras, pois tem sido encontradas em associações com várias famílias botânicas o que revela uma especificidade relativamente baixa (Law, 1985; Smith e Read, 1997; Hoeksema, 1999). Contudo, o impacto positivo da micorrização numa planta varia de acordo com a espécie ou espécies de fungos MA envolvidos. Há cada vez mais evidências que a promoção do crescimento vegetal proporcionado por fungos MA depende da planta específica e combinações fúngicas, o que demonstra que há diferenças de especificidade na resposta das plantas à presença dos fungos MA (Adjoud *et al.*, 1996;. Streitwolf-Engel *et al.*, 1997; Van der Heijden *et al.*, 1998). Por outro lado, o desenvolvimento e diversidade das espécies de fungos MA depende da composição da comunidade vegetal e das espécies de plantas hospedeiras existentes no meio, fazendo com que esta especificidade exercida tanto por fungos como por plantas possa ter consequências importantes em ecologia vegetal, visto que a diversidade e composição da comunidade fúngica também demonstra exercer uma grande diversidade de efeitos sobre a planta e composição vegetal (Johnson *et al.*, 1992b;. Sanders e Fitter, 1992; Bever *et al.*, 1996; Van der Heijden *et al.*, 1998; Eom *et al.*, 2000.).

As espécies de FMA diferem acentuadamente na sua acção de melhoria da nutrição e saúde vegetal da planta, no entanto sabe-se relativamente pouco sobre a diversidade funcional em cada nível taxonómico. O desenvolvimento de ferramentas moleculares permitiu observar que existiam diferenças intra-específicas nas espécies de fungos, por exemplo, nas sequências ribossomais e na morfologia dos esporos, sendo dos dois critérios base utilizados na taxonomia destes organismos (Vandenkoornhuyse e Leyval, 1998; Kjølner & Rosendahl, 2000; Clapp *et al.*, 2001). O significado desta variação genética numa perspectiva ecológica e agrícola permanece incerto, uma vez que ainda não é possível relacionar a diversidade de uma comunidade FMA com as suas propriedades funcionais e muito pouco se sabe sobre a diversidade funcional dentro dessas espécies. Numa tentativa de tentar perceber o impacto que esta interdependência mútua entre planta e FMA podem ter a nível agrícola, Johnson *et al.*, (1991) desenvolvem um estudo e no qual é identificada uma mudança na composição dos esporos de fungos MA presentes no solo devido à rotação que foi introduzida no Oeste dos Estados Unidos entre milho e soja. A rotação foi

introduzida por causa da queda de rendimento provocada pela monocultura e foi então notado um aumento e diversificação das espécies de fungos, levando a pensar que essa queda de rendimento poderia resultar de alterações na composição de comunidade fúngica provocadas pela monocultura (Johnson *et al.*, 1992a). Numa outra experiência Bever (2002), concluiu que as espécies FMA embora se associem com a maior parte das famílias de plantas, demonstraram diferenças específicas nas taxas de crescimento populacional perante diferentes plantas hospedeiras. Perante estes estudos podemos concluir que as plantas influenciam as espécies existentes na comunidade fúngica bem como as espécies fungos existentes no solo influenciam a composição da flora terrestre, criando assim um equilíbrio ecológico. Numa perspectiva agrícola, as particularidades que se prendem com esta relação de simbiose podem ter alguma relevância do ponto de vista da promoção das comunidades fúngicas mais benéficas para as culturas a instalar e assim criar no solo uma massa de fungos de espécies com apetência natural para colonizar a cultura e beneficia-la em aspectos específicos desde os primeiros momentos. Nesse sentido, e aplicando as conclusões acima referidas neste estudo, se soubermos quais as culturas que promovem o desenvolvimento das micorrizas que colonizam preferencialmente o trigo garantindo os benefícios pretendidos, podemos procurar aplicar esse conhecimento e provavelmente promover uma colonização mais precoce devido à maior afinidade, com as vantagens na nutrição e saúde vegetal da cultura que este tipo de relação de simbiose acarreta. A questão da afinidade botânica entre as espécies de fungos e diferentes culturas pode ter influencia na promoção e desenvolvimento da micorrização, como tal é importante desvendar todas estas questões e tentar tirar partido destes fenômenos naturais na agricultura.

7 - Hipótese de trabalho e objectivos:

O trabalho experimental proposto vem de encontro a algumas das temáticas abordadas nos capítulos anteriores, no que à micorrização e suas particularidades diz respeito, na tentativa de entender alguns dos processos que estão por trás deste fenómeno e tirando o melhor partido do ponto de vista agrícola. Ao comparar esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) com fragmentos de raízes colonizadas, o micélio extra-radicular (ERM) intacto é a fonte de inoculo mais eficiente para iniciar novas colonizações de micorrizas arbusculares. O facto de ter a crescer antes da cultura uma planta que desenvolva um abundante ERM (Developer), e desde que este se mantenha intacto, a cultura ao chegar ao solo entra logo em contacto com uma fonte de inoculo preferencial e por isso fica mais rapidamente colonizada, beneficiando desde o início do seu ciclo

vegetativo da presença da micorriza na protecção contra stresses bióticos ou abióticos assim como na absorção de nutrientes. Nesse sentido, sabemos que a serradela (*Ornithopus compressus*) ou o azevém (*Lolium rigidum*) podem desempenhar esse papel de multiplicador de inoculo micorrízico (funcionando como Developer) em situações de solo com elevado nível de Mn, permitindo uma boa colonização micorrízica inicial do trigo (Brito *et al.*, 2014) ou do trevo subterrâneo (Alho *et al.*, 2012) e como consequência uma melhoria nas condições de desenvolvimento. No entanto os resultados obtidos evidenciam algum grau de diversidade funcional associada a cada um dos *Developers* atendendo a que o crescimento das culturas testadas não é o mesmo após cada um deles, ou seja os FMA selecionados pela planta Developer e passados ao trigo ou ao trevo via colonização por ERM, parecem determinar o maior ou menor crescimento da cultura. Assim os objectivos do presente estudo consistem em saber se:

- Numa situação de stress associada a elevado nível de Mn do solo, diferentes plantas Developer condicionam de forma também distinta os parâmetros de crescimento da cultura subsequente (diversidade funcional).

- A afinidade do grupo botânico entre Developer e cultura, influencia a expressão da diversidade funcional.

8 - Material e Métodos:

8.1. - Localização:

O trabalho experimental foi realizado em 2014 num dos polos da Universidade de Évora, a Herdade da Mitra, Alentejo, Portugal (38°32'N; 08°00'W), numa estufa com ambiente controlado com o intuito de reduzir as oscilações das condições ambientais e assim garantir que as culturas a utilizar não vão encontrar no ambiente um factor limitante ao seu normal desenvolvimento. Com isto as eventuais hipóteses das condições ambientais interferirem no estudo, e como consequência direta uma alteração na interpretação resultados, ficam reduzidas e os valores que resultarem do ensaio serão mais direccionados para os objetos em estudo.

8.2. - Colheita e Caracterização do Solo:

Um dos principais objetos de estudo deste trabalho experimental é a avaliação do comportamento do trigo micorrizado quando exposto a uma situação de excesso de Mn no solo, assim, foi necessário localizar um solo que cumprisse este requisito visto que é fundamental no desenrolar de todo o trabalho e nos objectivos a atingir. A Herdade da Mitra foi local onde foi

também recolhido o solo para utilizar nos ensaios, solo este cujas características já eram previamente conhecidas e no qual o teor em Mn se situava em níveis relativamente elevados susceptíveis de causar efeitos negativos no desenvolvimento da cultura, procurando desta forma simular as condições reais de campo em termos edáficos. O solo foi recolhido de uma pastagem natural e tendo em conta a sua baixa fertilidade, a recolha foi feita apenas na camada mais superficial a uma profundidade até 20cm. Na classificação portuguesa está classificado como um solo do tipo litólico não húmido de granitos e rochas afins (Pg). Este solo, segundo Cardoso, (1965), é um solo franco-arenoso mal estruturado, apresentado um teor em matéria orgânica extremamente baixo (1,1%) e um pH de 6.0 que o torna ligeiramente ácido. Em termos químicos, este solo apresenta, expresso em ppm por elemento nutritivo, em MgO valores de 200ppm (valor de referencia para este tipo de solo: 75 ppm), em P₂O₅ valores de 7ppm (valor de referencia para este tipo de solo: 50ppm), SO₃ valores de 20ppm (valor de referencia para este tipo de solo: 25ppm) e em Mn valores de 22,6ppm (valor de referencia para este tipo de solo: 3,8ppm).

É de salientar também o facto da importância de o solo a utilizar seja proveniente de uma zona natural, visto que só assim conseguimos incorporar no estudo as micorrizas nativas já adaptadas e capazes de resistir às condições edáfo-climáticas da zona. Só desta forma é possível estudar que influencia poderão ter as micorrizas nativas, quando associadas ao trigo, na proteção contra situações de stress provocado pelo Mn e na melhoria da função nutricional.

8.3. - Metodologia experimental e condução do ensaio:

O trabalho experimental desenvolvido teve inicio no dia 22 de Novembro de 2013 e foi dividido essencialmente em duas fases. No referido dia, o solo recolhido foi crivado (utilizando um crivo com 4mm de malha) com o objectivo de o uniformizar ao máximo em termos de estrutura, para retirar pedras e outros obstáculos que pudessem ser um factor limitante, criando problemas ao desenvolvimento das raízes, e também para que possíveis micélios fúngicos nele existentes fossem destruídos e assim procurar garantir em todos os vasos as mesmas condições em termos de substrato. Em seguida, a parte interior de cada um dos vasos foi forrada com papel absorvente com o intuito de evitar o crescimento preferencial das raízes pelas paredes dos vasos e procedeu-se ao enchimento dos 40 vasos, com o solo anteriormente crivado, todos o com mesmo peso em cada um deles, ou seja, aproximadamente 8,200kg. A primeira fase do ensaio tem então inicio com a instalação dos Developers, sendo eles Serradela (*Ornithopus compressus* L.); Margaça (*Chamaemelum Mixtum* (L.) All); Centeio (*Secale cereale* L.) instalados dia 22/11/2013 com 5 plantas por vaso e Erva Vaqueira (*Calendula arvensis* L.); Azevém (*Lolium rigidum* L.) instalados

dia 26/11/2013 com 1 planta por vaso e 5 plantas por vaso respectivamente, a fim de permitir desenvolvimento de cada Developer para assim estabelecer uma rede de micélio micorrízico necessária a uma boa colonização da planta a instalar posteriormente. Em seguida foi feita a disposição do ensaio na estufa onde os vasos foram divididos em cinco grupos, cada grupo correspondendo a um Developer, com oito vasos por grupo totalizando assim os quarenta vasos necessários neste trabalho experimental. De referir ainda que os oitos vasos pertencentes a cada grupo de Developer serão ainda divididos em dois grupos de quatro para que um dos objectivos deste trabalho experimental seja alcançado, ou seja, estudar a influencia da mobilização com consequente quebra do micélio extra-radicular (ERM) na colonização na cultura do trigo. Assim, cada grupo está dividido em dois sub-grupos de quatro vasos onde num dos sub-grupos o solo é mobilizado (Ex: Margaça; P) e no outro o solo é mantido com a estrutura criada (Ex: Azevém; NP) como o esquema abaixo pretende ilustrar.

Esquema 1 – Disposição do ensaio

| | | | | | | | | | |
|----------------|---------------|-------------------------|------------------------|---------------|-----------|------------------|--------------|----------------|---------------|
| Margaça; NP | Margaça; P | Erva Vaquiera; NP | Erva Vaqueira; P | Azevém; NP | Azevém; P | Serradela; NP | Serradela; P | Centeio; NP | Centeio; P |
| Margaça; NP | Margaça; P | Erva Vaquiera; NP | Erva Vaqueira; P | Azevém; NP | Azevém; P | Serradela; NP | Serradela; P | Centeio; NP | Centeio; P |
| Margaça; NP | Margaça; P | Erva Vaquiera; NP | Erva Vaqueira; P | Azevém; NP | Azevém; P | Serradela; NP | Serradela; P | Centeio; NP | Centeio; P |
| Margaça; NP | Margaça; P | Erva Vaquiera; NP | Erva Vaqueira; P | Azevém; NP | Azevém; P | Serradela; NP | Serradela; P | Centeio; NP | Centeio; P |

Uma vez disposto o ensaio na estufa, a partir deste ponto é necessário decorrer um período de tempo de 6 a 7 semanas para que a simbiose se estabeleça. Durante este período foram efectuadas regas sempre que necessário com água, água essa que necessariamente tem que ser desmineralizada para que não ocorram entradas de nutrientes que possam afectar os objectivos do estudo.



Figura 1 - Ensaio com Margaca (à esquerda), Erva-Vaqueira (à direita) Figura 2 - Ensaio com azevém (à esquerda) e serradela (à direita)

Na segunda fase, e com o período de tempo de estabelecimento e desenvolvimento da simbiose já decorrido, teve lugar a retirada dos Developers dos vasos e instalação do trigo. No dia 07/02/2014 os Developers foram retirados dos vasos com a eliminação da parte aérea através do corte abaixo do colo junto à raiz e nos vasos destinados à simulação de mobilização o solo de cada vaso foi individualmente passado por um crivo (4mm de malha) para destruir a rede de micélio de fungo existente e novamente colocado no vaso repetindo o processo de revestir o interior do vaso com papel absorvente. No processo de crivagem do solo as raízes dos Developers foram recolhidas para posterior análise e quantificação da taxa de colonização que ocorreu a fim de avaliar qual deles é o que estabelece melhor a relação de simbiose e se haveria alguma relação entre a taxa de colonização do antecedente cultural e do trigo no que diz respeito ao desenvolvimento de micorrizas. Os restantes vasos destinados à manutenção da estrutura o solo não foram perturbados e a rede de micélio foi mantida intacta. A parte aérea dos Developers foi individualmente recolhida de apenas quatro dos oito vasos pertencentes a cada grupo de Developer e cada parte aérea foi colocada num cartucho de secagem para posterior pesagem do peso seco. No dia 11/02/2014 o trigo, que havia sido previamente germinado em tabuleiro com substrato húmido, foi instalado com a colocação de quatro plântulas por vaso onde a única ação mecânica no solo para a instalação foi a abertura de um pequeno sulco. Uma vez cheios todos os vasos, fez-se uma fertilização, contendo na calda 15ml/vaso de solução de NH_4NO_3 1M (75 mg N kg^{-1} ou 180 kg de N ha^{-1}) e 320 μL /vaso de solução 1M de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.4 mg Zn kg^{-1} ou 8 kg de Zn ha^{-1} e 4 Kg de S ha^{-1}), apenas para corrigir alguns défices de nutrientes e procurar garantir que todos os vasos partiam em igualdade de circunstâncias.

O trigo instalado permaneceu em crescimento durante aproximadamente 3 semanas e no dia 17/03/2014 procedeu-se ao levantamento do ensaio e recolha das raízes e parte aérea.



Figura 3 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Centeio



Figura 4 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Serradela



Figura 5 - Solo perturbado VS. Solo não perturbado - Developer: Margaça

A parte aérea foi recolhida de todos os vasos individualmente e colocada num cartucho de secagem para se proceder à desidratação em estufa. As raízes foram meticulosamente lavadas para eliminar restos de solo ou outras partículas, seguidamente foram pesadas e retirada uma amostra de cada raiz para avaliar a taxa de colonização sendo o restante de cada raiz novamente pesado e anotado o seu peso fresco. Uma vez anotado o peso fresco, as mesmas raízes foram submetidas a um processo de secagem para encontrar o seu peso seco

8.4. - Procedimento Laboratorial:

Após o levantamento final dos ensaios foi necessário realizar alguns procedimentos em laboratório com o objectivo obter os dados necessários. A parte aérea dos Developers e do trigo foram recolhidas para quantificar o seu peso seco. Para além deste processo, as raízes dos Developers e do trigo recolhidas sofreram um processo de coloração para permitir a visualização das micorrizas ao microscópico e posteriormente efetuar a quantificação da taxa de colonização.

8.4.1. - Peso Seco da Parte Aérea (SDW) e Peso seco da raiz (RDW):

A determinação do peso seco da parte aérea do trigo foi realizada após um processo de secagem em estufa de secagem. A quando da recolha da parte aérea, esta foi colocada em cartuchos de secagem que depois foram colocados na estufa de secagem a 60°C durante 72 horas para desidratar as folhas por evaporação e assim eliminar a água nelas presente. Terminado este período de tempo, o material contido nos cartuchos foi pesado com auxílio de uma balança semi-analítica.

Em relação ao peso seco das raízes do trigo, e depois das raízes serem meticulosamente lavadas para retirar todo o material que pudesse contaminar as amostras, o processo de secagem para desidratação foi idêntico ao realizado na parte aérea, com a particularidade de ser retirada uma pequena amostra para medir a taxa de colonização.

8.4.2. - Taxa de Colonização Arbuscular:

Nesta componente do trabalho experimental foi feita a observação microscópica e quantificação da taxa de colonização arbuscular, porem foi necessário todo um processo de tratamento das raízes em laboratório com a finalidade de evidenciar as estruturas fúngicas, antes conseguir esses objectivos. O processo envolve a coloração com um corante que tem apenas ação sobre as estruturas do fungo, permitindo assim distingui-las do material vegetal quando observados ao microscópio. Para este efeito foi utilizada a amostra de raiz, em fresco, e foi seguido o procedimento de coloração;

- 1 - Introduzir cerca de uma grama da amostra de raiz numa cassete de histologia;
- 2 - Este processo foi repetido para cada uma das amostras de raiz;
- 3 - Mergulhar todas as cassetes de histologia já com a amostra numa solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% (w/v);

4 - De seguida, e com a finalidade de eliminar conteúdos citoplasmáticos, as cassetes foram colocadas na autoclave a 120°C durante 13 minutos;

5 - Decorrido esse tempo, as cassetes foram retiradas e lavadas com água corrente abundante para eliminar o excesso de KOH;

6 - A coloração é o passo seguinte recorrendo a uma solução com 0,1% de Azul Tripano em lactoglicerol na proporção de (1:1:1; glicerol, ácido láctico a 80% e água) durante 10 minutos a uma temperatura de 70°C.

7 - Por ultimo, as cassetes já com as raízes coradas são colocadas numa outra solução de glicerol a 50% (v/v) e podem ser observadas ao microscópio após 48 horas.

As cassetes com a amostra corada, desde que submersas na solução de glicerol, podem permanecer guardadas durante longos períodos de tempo (ou até mesmo anos) sem que a coloração seja danificada. A solução de glicerol a 50% (v/v) tem também a finalidade de dissolver o Azul Tripano que não atuou nas estruturas fúngicas e desta forma é conseguido um contraste melhor entre material vegetal e material fúngico, evidenciando por exemplo os arbúsculos. Terminado todo o processo acima descrito, a determinação da taxa de colonização por arbúsculos micorrízicos foi o próximo passo e para este efeito utilizou-se o método de intersecção onde a contagem é convertida em percentagem de acordo com o descrito por McGonigle *et al.*, (1990). Para isso, as raízes coradas são alinhadas paralelamente ao longo de uma lâmina e em seguida é colocada uma lamela sobre as raízes, evitando bolhas de ar entre a lamina e lamela. Uma vez concluído este processo, as raízes são observadas ao microscópio óptico com mira vertical, com uma ampliação de 200x, sendo a quantificação feita percorrendo a lâmina na sua totalidade de forma perpendicular ao seu eixo longitudinal e contabilizando o número de intersecções da linha vertical com raízes. No processo de contagem a mudança do campo de visão deve ser constante. Quando se dá o momento da intersecção, é contabilizado como colonização arbúscular se for observado arbúsculo, ou colonização apenas com hifas se for intersectada uma hifa, ou não colonizado caso o arbúsculo ou hifa seja inexistente. Importa referir que a contabilização das hifas requer especial atenção, pois as hifas de qualquer fungo coram com azul Trypano e é por isso fundamental que ao contabilizarem-se intersecções com hifas haja a certeza de que se tratam de hifas de FMA, o que nem sempre é fácil. Efectuou-se a montagem, observação e quantificação de duas lâminas por amostra de raiz corada e a taxa de colonização foi calculada como se ilustra na Tabela 1.

Tabela 1 - Cálculo da colonização arbuscular (AC) e colonização por hifas (HC) (McGonigle et al., (1990)).

| Amostra | Lâmina | Hifas | Vesículas | Arbus. | Neg. | Total |
|---------|--------|-------|-----------|--------|------|-------|
| 2 | a | 4 | 1 | 9 | 59 | 73 |
| | b | 6 | 0 | 7 | 54 | 67 |
| | c | 6 | 0 | 4 | 46 | 56 |
| | d | 4 | 0 | 5 | 43 | 52 |
| | SUM | 20 | 1 | 25 | 202 | 248 |

Foi apenas tida em consideração a colonização por arbúsculos tanto nas amostras de trigo como nas amostras dos Developers, pois este tipo de colonização é o mais relevante para o estudo uma vez que não permite dúvidas quanto ao facto de se estar a contabilizar a presença de AMF e não de outros fungos, como poderia acontecer ao ter em conta a colonização por hifas. Assim, de acordo com McGonigle *et al.*, (1990) e com a Tabela 1 extraída do mesmo artigo, as taxas de colonização foram calculadas da seguinte forma: Colonização arbuscular- $25/248=0,10$; Colonização por vesículas- $1/248=0,004$; Colonização por hifas - $(248-202)/248=0,19$.

8.4.3. - Análise de dados:

Terminada a quantificação e organização dos dados em tabela, estes foram alvo de uma análise estatística com o auxílio do programa MSTAT-C (versão 1.42), tendo o tratamento estatístico seguido uma ANOVA com dois factores: Factor A - planta Developer (5 níveis) e factor B - integridade do ERM (2 níveis) e um teste Tukey utilizado para separação de médias. A quantificação da absorção dos nutrientes P, S, Mg, Zn e Mn pela parte aérea do trigo foi executada pelo método analítico de espectrometria de massas e em seguida foi feito numa amostra compósita das quatro repetições para cada Developer e condição de micélio, uma vez que só desta forma se conseguia reunir a quantidade mínima de material vegetal requerida pelo método utilizado, . Assim, para efeitos de análise estatística do teor de nutrientes na parte aérea para as duas condições de micélio considerou-se como repetições os cinco valores referentes aos Developers em estudo.

9 - Resultados:

Os resultados são apresentados sob a forma de tabelas, para uma leitura mais fácil. Na Tabela 2 apresentam-se os resultados dos parâmetros medidos referentes aos Developers e nas restantes, cada tabela apresenta os resultados do efeito da interacção dos factores em estudo (Developers e integridade do micélio), nos vários parâmetros medidos no trigo .

Tabela 2 - Valores de peso seco da parte aérea (SDW), colonização arbuscular (AC) e colonização por hifas (HC) obtidos para cada Developer.

| Developer | Peso seco da parte aérea (g/vaso) | Colonização arbuscular (AC) |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Margaça | 0,767 <i>c</i> | 0,800 |
| Erva Vaqueira | 0,223 <i>d</i> | 0,760 |
| Azevém | 1,305 <i>b</i> | 0,772 |
| Serradela | 1,328 <i>b</i> | 0,827 |
| Centeio | 1,907 <i>a</i> | 0,797 |

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao peso seco da parte aérea (SDW) dos Developers. Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 2 apresenta a média dos resultados alcançados pelos Developers, no que ao peso seco da parte aérea e colonização arbuscular (AC) diz respeito.

Em relação ao peso seco da parte aérea dos Developers é possível verificar que o centeio se destaca significativamente das restantes ao atingir um peso seco médio significativamente superior a todos os outros. Por outro lado, a erva vaqueira também alcançou diferenças significativas em relação às restantes culturas mas no sentido oposto do centeio, sendo por isso o Developer que apresentou um peso seco médio mais baixo. O azevém e a serradela apresentam valores médios de peso seco sem diferenças significativas entre si. Por fim, a margaça atingiu um peso seco médio de 0,767g/vaso e como tal apresenta diferenças significativas relativamente às restantes culturas.

Na colonização micorrízica dos Developers não foram detectadas diferenças significativas entre as plantas envolvidas. No entanto, a serradela foi a planta que apresentou uma AC mais elevada, com uma média de 82,7% .

Tabela 3 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) no peso seco da parte aérea do trigo (SDW) (mg/planta).

| | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|
| Integridade do micélio (Facto B) | Margaça | Erva Vaqueira | Azevém | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 250 <i>ab</i> | 252,5 <i>ab</i> | 227,5 <i>bc</i> | 265 <i>a</i> | 195 <i>c</i> | 238 A |
| Micélio Fragmentado | 87,5 <i>d</i> | 102,5 <i>d</i> | 95 <i>d</i> | 87,5 <i>d</i> | 77,5 <i>d</i> | 90 B |
| Média Factor A | 168,75 A | 177,5 A | 161,25 A | 176,25 A | 136,25 B | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do *Developer* (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interacção entre a integridade do micélio e os *Developers*.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, que dizem respeito ao efeito dos diferentes Developers e a condição do micélio no peso seco da parte aérea do trigo, verificamos a existência de diferenças significativas entre os factores em estudo.

O efeito que a presença dos Developers (factor A) exerceram no peso seco médio por planta de trigo, não revelou diferenças significativas entre a margaça, erva vaqueira, azevém e serrada dado que os valores médios relativos a estas plantas foram muito próximos. Já o Developer centeio, foi de todas as plantas a que proporcionou ao trigo um menor peso da parte aérea.

Verificaram-se diferenças significativas no efeito das duas condições do micélio sobre o peso seco médio da parte aérea das plantas de trigo, sendo o peso seco mais que duplica quando o micélio se encontrava intacto.

A interacção dos factores em estudo (Developers e integridade do micélio) foi significativa. Na condição de micélio intacto o benefício para o trigo foi menor após o centeio e o azevém. No entanto, o SDW médio do trigo após o azevém também não apresenta diferenças significativas em relação aos valores médios após a margaça e erva vaqueira. A serradela foi a planta que conduziu a um peso médio da parte aérea do trigo mais elevado, no entanto as diferenças em relação os valores atingidos após a margaça e erva vaqueira não foram significativamente diferentes. De acordo com a Tabela 3, é possível ainda verificar que o trigo após a serradela apresenta valores de peso seco médio por planta maiores e com diferenças significativas em relação ao azevém e centeio, sempre na condição de micélio intacto. Já na condição de micélio fragmentado o peso seco da parte aérea do trigo após os vários Developers é significativamente menor e as diferenças entre eles foram esbatidas, não se observando diferenças significativas entre os vários valores.

Tabela 4 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) no peso seco da raiz do trigo (RDW) (mg/planta).

| Integridade do micélio (Factor B) | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|--------|-----------|---------|----------------|
| | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 77,5 | 85 | 67,5 | 75 | 50 | 71 A |
| Micélio Fragmentado | 52,5 | 57,5 | 52,5 | 45 | 47,5 | 51 B |
| Média Factor A | 65 A | 71,25 A | 60 AB | 60 AB | 48,75 B | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).
Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).
Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 4 apresenta os valores referentes ao efeito dos factores em estudo e sua interacção no peso seco médio da raiz de trigo (RDW), expresso em mg por planta de trigo.

Em relação ao efeito da presença dos Developers como planta antecedente (factor A) no peso seco médio da raiz do trigo, foram registadas diferenças significativas entre o peso médio após o centeio em relação aos atingidos após a margaça e a erva vaqueira. No entanto, quando comparados os resultados após o centeio e após o azevem e a serradela as diferenças entre as médias de peso seco da raiz não foram significativamente diferente. De referir ainda que entre a margaça, erva vaqueira, azevem e serradela não foram registadas diferenças significativas nos pesos seco médios da raiz de trigo.

De acordo com os resultados obtidos em relação ao efeito da condição do micélio (factor B) no peso seco médio da raiz de trigo, registaram-se diferenças significativas sendo o peso seco médio da raiz mais elevado quando o micélio se apresentava intacto.

Neste caso, o efeito da interacção entre os diferentes Developers e a integridade do micélio no peso seco médio da raiz não foi significativa.

Tabela 5 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na taxa de colonização micorrízica por arbúsculos (AC) do trigo.

| Integridade do micélio (Factor B) | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 83,2% <i>a</i> | 80,2% <i>ab</i> | 76,5% <i>ab</i> | 84,3% <i>a</i> | 73% <i>b</i> | 79,4% A |
| Micélio Fragmentado | 16,5% <i>cd</i> | 9,7% <i>d</i> | 18,3% <i>c</i> | 11% <i>cd</i> | 10,8% <i>cd</i> | 13,2% B |
| Média Factor A | 49,9% A | 45% AB | 47,4% AB | 47,6% A | 41,9% B | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interacção entre a integridade do micélio e os Developers.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 5 contem os resultados referentes ao efeito que os factores em estudo, e a interacção deles, exerceram na taxa de colonização por arbúsculos do trigo instalado.

De acordo com os resultados do efeito dos Developers (factor A) na AC do trigo, a serradela e a margaça deram origem a taxas de colonização do trigo mais altas, com 48% e 50% respectivamente, valores que quando comparados com os restantes apenas são significativamente diferentes da situação em que o centeio foi o Developer. O trigo após centeio registou a taxa de colonização mais baixa, 41%, no entanto a análise estatística realizada não detecta diferenças significativas em comparação com este e os Developers erva vaqueira e azevém.

O efeito da condição do micélio (factor B) na AC do trigo registou diferenças claras, sendo a que a taxa de colonização é cerca de seis vezes superiores quando o micélio associado às raízes dos Developers permaneceu intacto.

Analisando o efeito da interacção dos factores em estudo na taxa de colonização do trigo é nítido que para todos os Developers as taxas foram mais elevadas na condição de micélio intacto. Dentro da condição de micélio intacto, margaça e serradela deram origem a percentagens de colonização do trigo mais altas, no entanto sem diferenças significativas em relação ao azevém e erva vaqueira. O centeio, para a mesma condição de micélio, foi o Developer que proporcionou ao trigo a taxa de colonização mais baixa mas as diferenças não foram significativas quando comparado com azevém e erva vaqueira. Na condição de micélio fragmentado as taxas foram todas abaixo de 20%, e as diferenças entre Developers muito menos acentuadas. Verifica-se que o efeito mais favorável na colonização do trigo proporcionada pelos Developer margaça e serradela em condição de micélio intacto deixa de se fazer sentir na situação de micélio fragmentado.

Tabela 6 - Influência da condição do micélio no teor de nutrientes presentes na parte aérea do trigo e rácio Mg/Mn

| Integridade do micélio | Mn (mg/kg) | Mg (mg/kg) | Rácio Mg/Mn | P (g/kg) | Zn (mg/kg) | S (g/kg) |
|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------|----------------|------------------|----------------|
| Micélio Intacto | 126,530 <i>b</i> | 2322,880 <i>b</i> | 18 <i>a</i> | 1,860 <i>a</i> | 136,240 <i>b</i> | 3,000 <i>a</i> |
| Micélio Fragmentado | 300,580 <i>a</i> | 3626,960 <i>a</i> | 12 <i>b</i> | 0,800 <i>b</i> | 254,260 <i>a</i> | 2,640 <i>b</i> |

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à condição do micélio.
Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 6 retrata a influência da integridade do micélio nos teores encontrados na parte aérea do trigo de fósforo, zinco, enxofre magnésio e manganês, nas respectivas unidades de medida, bem como o resultado do rácio entre magnésio e manganês para as mesmas condições de micélio. Recorda-se que para este parâmetro, os Developers foram utilizados como repetições da condição do micélio.

Para a condição de micélio intacto, o trigo registou valores significativamente mais altos de, fósforo e enxofre, assim como do rácio Mg/Mn quando comparados com os valores obtidos na condição de micélio fragmentado. Por outro lado, e em comparação com a condição de micélio intacto, foram registados teores significativamente mais elevados de manganês, magnésio e zinco na parte aérea do trigo quando o micélio desenvolvido pelos Developers se encontrava fragmentado.

Os valores relativos à absorção de nutrientes mostrados nas tabelas seguintes, resultam a multiplicação do teor de cada elemento na parte aérea do trigo pelo seu peso seco nos respectivos tratamentos.

Tabela 7 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de fósforo (P) pela parte aérea do trigo (mg/planta).

| | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Integridade do micélio (Factor B) | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 0,472 <i>a</i> | 0,455 <i>a</i> | 0,368 <i>b</i> | 0,492 <i>a</i> | 0,400 <i>b</i> | 0,437 <i>A</i> |
| Micélio Fragmentado | 0,070 <i>c</i> | 0,085 <i>c</i> | 0,075 <i>c</i> | 0,070 <i>c</i> | 0,060 <i>c</i> | 0,072 <i>B</i> |
| Média Factor A | 0,271 <i>A</i> | 0,270 <i>A</i> | 0,221 <i>B</i> | 0,281 <i>A</i> | 0,230 <i>B</i> | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interacção entre a integridade do micélio e os Developers.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

Na Tabela 7 são apresentados os resultados do efeito dos factores em estudo e sua interação na absorção de fósforo (P) pela parte aérea do trigo, expresso em mg por planta de trigo.

Analisando o efeito da presença dos Developers (factor A) na absorção de fósforo pela parte aérea do trigo verifica-se que esta foi significativamente superior quando a margaça, erva vaqueira ou a serradela o antecederam.

De acordo com os resultados obtidos em relação ao efeito da condição do micélio (factor B) na quantidade de fósforo absorvido pela parte aérea do trigo, verificaram-se diferenças significativas nas médias, sendo que o teor médio em fósforo foi mais elevado quando o micélio se apresentava intacto.

Relativamente ao efeito da interação dos factores em estudo na absorção de fósforo pela parte aérea das plantas de trigo verificaram-se diferenças significativas nos valores apresentados quando o micélio está intacto e fragmentado, pois para todos os Developers e na condição de micélio fragmentado a absorção de fósforo foi inferior sem diferenças significativas entre os Developers. No entanto, na condição de micélio intacto a absorção de fósforo pela parte aérea do trigo após o centeio e o azevem apresentou valores médios significativamente mais baixos e sem diferenças entre si. Na mesma condição de micélio, após a margaça, a erva vaqueira e a serradela, o trigo apresentou valores de absorção média de fósforo pela parte aérea mais elevados e também sem diferenças significativas entre si, sendo que a serradela é a planta que conduziu ao valor de fósforo mais elevado no trigo, com 0,492 mg/planta.

Tabela 8 - Efeito dos fatores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de magnésio (Mg) pela parte aérea do trigo (mg/planta).

| Integridade do micélio (Factor B) | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|---------|-----------|----------|----------------|
| | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 0,555 | 0,590 | 0,485 | 0,600 | 0,522 | 0,551 A |
| Micélio Fragmentado | 0,263 | 0,348 | 0,305 | 0,380 | 0,320 | 0,323 B |
| Média Factor A | 0,409 C | 0,469 AB | 0,395 C | 0,490 A | 0,421 BC | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

Os resultados apresentados na Tabela 8 dizem respeito ao efeito dos factores em estudo e sua interação na absorção de magnésio (Mg) pela parte aérea do trigo, expresso em mg por planta de trigo.

Relativamente ao efeito que a presença dos Developers (factor A) exerceu na absorção média de magnésio pela parte aérea do trigo, foram observados valores significativamente diferentes entre deles. Desde logo se nota que nos vasos onde previamente esteve instalada a serradela os valores médios de Mg medidos no trigo foram os mais altos, com 0,490 mg/planta, destacando-se assim de forma significativa dos restantes Developers, com exceção da erva vaqueira.. Por outro lado, o trigo instalado depois do azevém apresentou uma absorção média em Mg pela parte aérea mais baixa, no entanto, as diferenças entre os resultados obtidos após o azevém, a margaça e o centeio não foram significativas. O trigo instalado depois do centeio apresentou uma absorção média de Mg de 0,421 mg/planta, valor este que quando comparado com o obtido após os restantes Developers apresenta apenas diferenças significativas em relação aos valores obtidos após a serradela.

Tendo em conta os resultados obtidos em relação ao efeito da condição do micélio (factor B) na absorção média magnésio pela parte aérea do trigo, verificaram-se diferenças significativas, sendo que o valor foi mais elevado quando o micélio se apresentava intacto. De acordo com a análise estatística realizada, o efeito da interação dos factores em estudo na absorção de magnésio pela parte aérea das plantas de trigo não foi significativo.

Tabela 9 - Efeito dos fatores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de enxofre (S) pela na parte aérea do trigo (mg/planta).

| | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|----------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Integridade do micélio (Facto B) | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 0,618 <i>c</i> | 0,717 <i>b</i> | 0,672 <i>bc</i> | 0,815 <i>a</i> | 0,710 <i>b</i> | 0,706 A |
| Micélio Fragmentado | 0,195 <i>d</i> | 0,285 <i>d</i> | 0,255 <i>d</i> | 0,232 <i>d</i> | 0,215 <i>d</i> | 0,237 B |
| Média Factor A | 0,406 <i>B</i> | 0,501 <i>A</i> | 0,464 <i>AB</i> | 0,524 <i>A</i> | 0,463 <i>AB</i> | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interacção entre a integridade do micélio e os Developers.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 9 apresenta os resultados referentes ao efeito dos factores em estudo e respectiva interacção na absorção de enxofre (S) pela parte aérea das plantas de trigo expresso em mg/ planta.

No efeito que a presença dos Developers (factor A) exerceu na absorção de enxofre foram registadas algumas diferenças significativas. Numa primeira análise é possível observar que o trigo instalado depois da serradela extraiu mais S, valor que não registou diferenças significativas nos obtidos após a erva vaqueira, o azevém e o centeio. Já após a margaça, o trigo registou uma absorção em S mais reduzida, com 0,406 mg/planta, no entanto este valor não apresentou diferenças considerados significativas em relação ao registado após o azevém e o centeio.

Relativamente ao efeito da condição do micélio (factor B) na absorção de enxofre (S) pelo trigo, verificou-se que a extração de enxofre foi mais elevada quando o micélio se apresentava intacto.

Na interacção dos factores em estudo (Developers e integridade do micélio) em relação à absorção de enxofre pela parte aérea das plantas de trigo, verificaram-se diferenças significativas nos valores médios apresentados quando o micélio estava intacto, ao passo que para a condição de micélio fragmentado o valor médio de absorção de S foi baixo e sem diferenças significativas entre os Developers. Para a condição de micélio intacto, o trigo depois da serradela apresentou uma absorção de S mais elevada, com 0,815 mg/planta, valor que apresenta diferenças significativas em relação aos restantes precedentes. Para a mesma condição de micélio, não foram registadas diferenças significativas quando comparado o trigo depois da erva vaqueira, azevém, e centeio. O trigo instalado depois da margaça, na condição de micélio intacto, foi o que registou a

absorção em S na parte aérea mais baixa, valor que apresenta por isso diferenças significativas em relação aos restantes precedentes, com exceção do azevém.

Tabela 10 - Efeito dos factores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de zinco (Zn) pela parte aérea do trigo ($\mu\text{g/planta}$).

| Integridade do micélio (Factor B) | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 35,770 <i>a</i> | 34,170 <i>a</i> | 32,508 <i>a</i> | 36,825 <i>a</i> | 23,585 <i>b</i> | 32,572 A |
| Micélio Fragmentado | 19,522 <i>b</i> | 31,588 <i>a</i> | 23,265 <i>b</i> | 21,738 <i>b</i> | 19,120 <i>b</i> | 23,047 B |
| Média Factor A | 27,646 <i>B</i> | 32,879 A | 27,886 <i>B</i> | 29,281 AB | 21,353 C | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interação entre a integridade do micélio e os Developers.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

Na Tabela 10 são apresentados os resultados relativos ao efeito dos factores em estudo na absorção em zinco (Zn) pela parte aérea das plantas de trigo, desta feita expresso em microgramas por planta.

Ao analisar o efeito que a presença dos Developers (factor A) exerceu na absorção de zinco observam-se algumas diferenças significativas entre eles. De acordo com os resultados, o trigo instalado depois da erva vaqueira registou uma extração de zinco mais alta, 32.879, apresentando diferenças significativas em comparação com os restantes Developers, à exceção da serradela. O trigo instalado após a margaça e azevém registou uma absorção de 27.646 $\mu\text{g/planta}$ e 27.886 $\mu\text{g/planta}$ respectivamente, valores que quando comparados entre si e entre os valores obtidos na serradela não apresentaram diferenças significativas. O trigo após a presença do centeio registou uma absorção de zinco mais baixa, distanciando-se assim de forma significativa das médias registadas nos restantes Developers.

O efeito da condição do micélio (factor B) na absorção de zinco (Zn) deu origem a diferenças significativas nas médias, sendo que o valor foi mais elevado quando o micélio se apresentava intacto.

Analisando os resultados do efeito da interação dos factores em estudo (Developers e integridade do micélio) na absorção de Zn pelas plantas de trigo verifica-se que, para a condição de micélio intacto, o valor registado não apresentou diferenças significativas após os diferentes precedentes, com exceção do centeio, registando o trigo após a serradela o valor mais alto com 36.825 $\mu\text{g/planta}$. Para a condição de micélio fragmentado os valores registados foram mais

baixos em todos os Developers, apresentado por isso diferenças significativas e relação à condição de micélio intacto sem contar com o centeio, em que o trigo registou uma absorção em zinco próxima da registada na observada na condição de micélio fragmentado.

Tabela 11 - Efeito dos fatores em estudo (Developer e integridade do micélio) na absorção de manganês (Mn) pela parte aérea do trigo ($\mu\text{g/planta}$).

| Integridade do micélio (Factor B) | Developers (Factor A) | | | | | Média Factor B |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| | Margaça | Erva Vaqueira | Azevem | Serradela | Centeio | |
| Micélio Intacto | 36,225 <i>a</i> | 34,132 <i>a</i> | 26,813 <i>cd</i> | 34,332 <i>a</i> | 20,528 <i>e</i> | 30,406 A |
| Micélio Fragmentado | 25,315 <i>ce</i> | 32,462 <i>ab</i> | 28,500 <i>bc</i> | 27,893 <i>bc</i> | 21,555 <i>de</i> | 27,145 B |
| Média Factor A | 30,770 <i>AB</i> | 33,297 <i>A</i> | 27,656 <i>B</i> | 31,112 <i>AB</i> | 21,041 <i>C</i> | |

Letras maiúsculas - Separam as médias referentes ao efeito da integridade do micélio (Factor B).

Letras maiúsculas em itálico - Separam as médias referentes ao efeito do Developer (Factor A).

Letras minúsculas em itálico - Separam as médias referentes à interação entre a integridade do micélio e os Developers.

Valores com letras diferentes são significativamente diferente para $P \leq 0,05$

A Tabela 11 apresenta os resultados relativos ao efeito dos factores em estudo na absorção de manganês (Mn) pela parte aérea das plantas de trigo, expresso em microgramas por planta.

O efeito da presença dos diferentes Developers (factor A) conduziu a algumas diferenças expressivas na extração de manganês pela parte aérea do trigo, sendo a erva vaqueira o que deu origem ao valor mais elevado, valor esse que não apresentou diferenças significativas relativamente à margaça e serradela, embora em relação ao azevém e centeio as diferenças tenham sido significativas. Por outro lado, o trigo após o azevém atingiu um valor de absorção de Mn de 27.656 μg de Mn/planta que em comparação com os restantes Developers apenas foram registadas diferenças significativas em relação ao valor atingido no centeio e erva vaqueira. O centeio foi o Developer que revelou, neste aspecto, o valor mais baixo e como tal a sua média distancia-se de forma significativa das restantes.

O efeito da condição do micélio (factor B) na absorção de manganês (Mn) pela parte aérea do trigo verificou diferenças significativas sendo que o valor mais elevado foi quando o micélio se apresentava intacto.

Relativamente ao efeito da interação dos factores em estudo (Developers e integridade do micélio) a extração de manganês pela parte aérea das plantas de trigo apresentou diferenças significativas entre Developers. O trigo instalado depois da serradela e margaça na condição de

micélio intacto e depois da erva vaqueira na condição de micélio intacto e fragmentado, registaram valores mais elevados e sem diferenças significativas entre si. Na condição de micélio intacto, os Developers centeio e azevém registaram os valores de Mn mais baixos. Na condição de micélio fragmentado o centeio destacou-se pela negativa pois atingiu também uma extração de Mn mais baixa. Para a mesma condição de micélio, o trigo após a margaça, o azevém e a serradela, apresentou valores sem diferenças significativas entre si. Já após a erva vaqueira o trigo atingiu uma absorção de Mn que não apresentou diferenças significativas nas duas condições de micélio. Em síntese, só os Developers margaça e serradela fizeram variar de forma significativa a absorção de Mn nas plantas de trigo em função da integridade do micélio.

Gráfico 1 - Relação entre o teor de Mn (mg/planta) e o peso seco da parte aérea do trigo (mg/planta) após cada Developer nas duas condições de micélio.

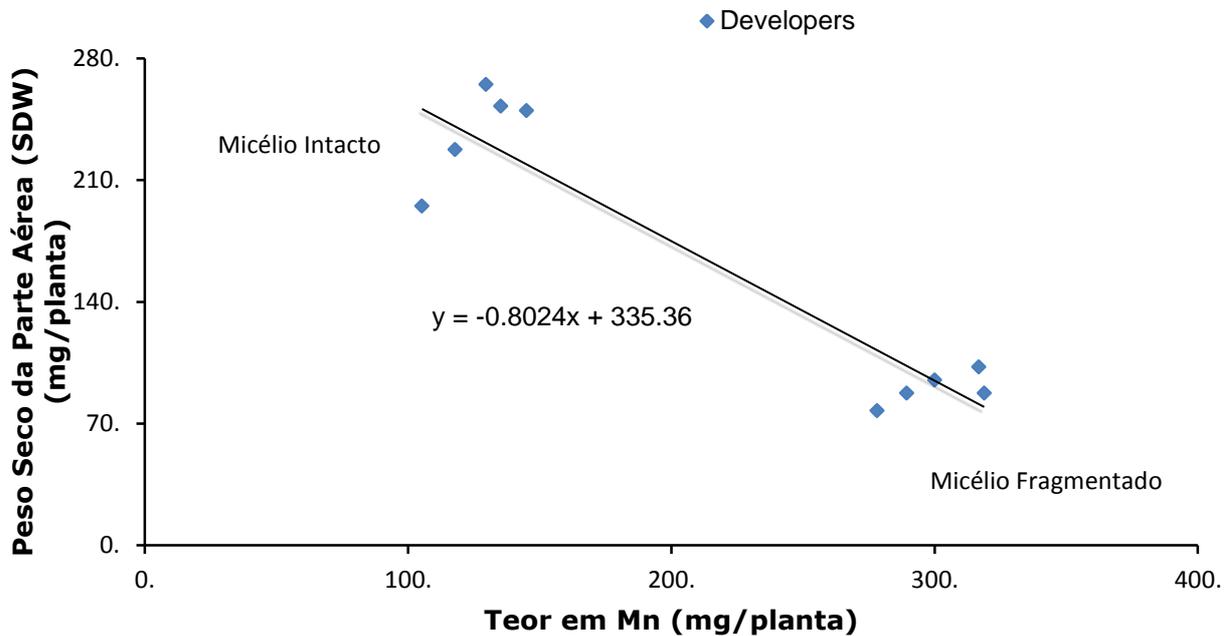
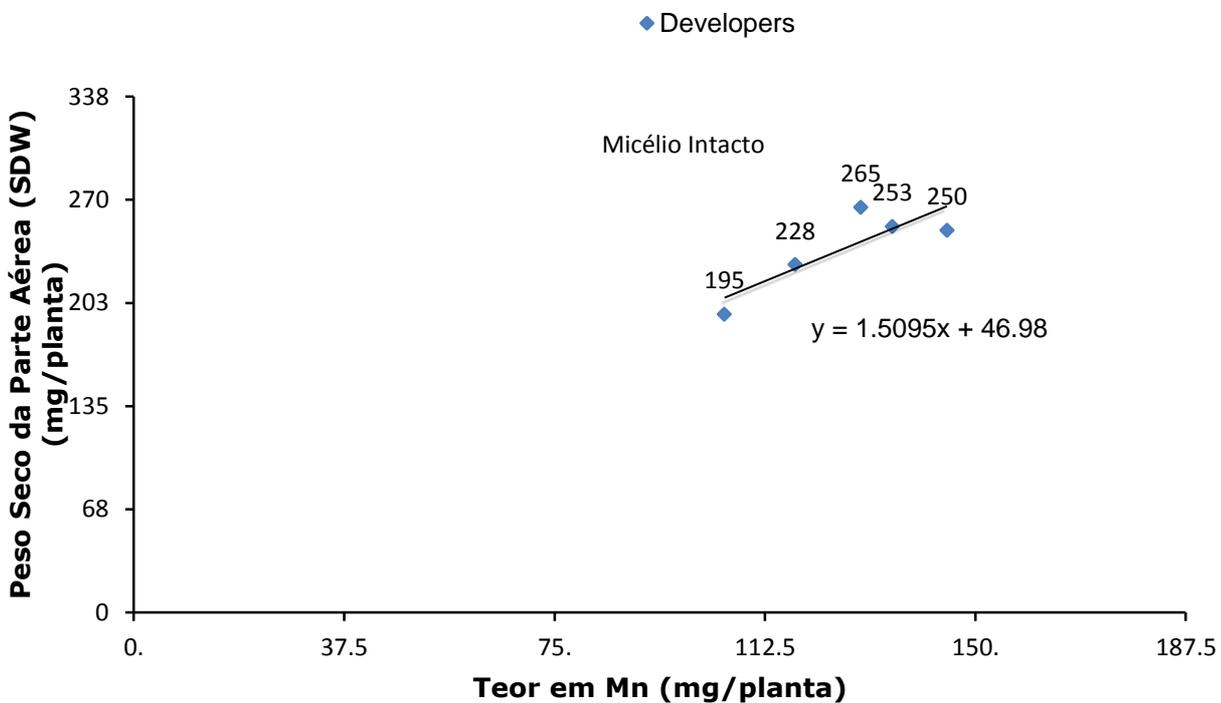


Gráfico 2 - Relação entre o teor de Mn (mg/planta) e o peso seco da parte aérea do trigo (mg/planta) após cada Developer na condição de micélio intacto.



Os Gráficos 1 e 2 foram obtidos através da utilização de uma regressão linear, uma metodologia estatística que relaciona duas variáveis de uma forma muito estreita, sendo possível

a partir de uma variável tirar ilações antecipadas acerca de outra ou outras variáveis envolvidas na análise. Neste caso foi relacionado o teor em manganês presente no trigo com peso seco da parte área do trigo e conseqüente crescimento depois de cada um dos Developers e em diferentes situações de integridade de micélio.

No Gráfico 1 está ilustrada a regressão acima descrita nas duas condições de micélio, onde é possível verificar que a condição de micélio fragmentado conduziu a uma maior absorção de Mn no trigo e que por sua vez se traduziu num crescimento deficiente com valores de SDW naturalmente baixos no trigo depois de todos os Developers. Com o micélio intacto o trigo registou menor absorção de Mn por planta, resultando daí um melhor crescimento visto que os valores de SDW são mais elevados.

O Gráfico 2 pretende individualizar os resultados obtidos para a condição de micélio intacto sendo os valores correspondentes ao trigo depois de cada Developer da seguinte forma: Margaça - 250mg/kg; Erva-vaqueira - 252,5mg/kg; Serradela - 265mg/kg; Azevém - 227,5mg/kg; Centeio - 195mg/kg. Tendo em conta estes resultados é possível verificar que as dicotiledóneas e planta composta (margaça) conduziram o trigo a valores mais altos de SDW, bem como de os níveis de Mn que também foram mais altos. Os restantes dois Developers, que pertencem à mesma classe botânica do trigo, conduziram a valores relativamente mais baixos de SDW mesmo com teores mais baixos de Mn.

10 - Discussão dos resultados e conclusão:

Todos os Developers testados apresentaram um elevado grau de micorrização (Tabela 2) confirmando que podem funcionar como precedente para o desenvolvimento de uma extensa rede de micélio no solo, antes da instalação da cultura do trigo.

Atendendo aos resultados obtidos nos ensaios realizados, é possível verificar diferentes comportamentos e desenvolvimentos do trigo quando este é precedido da instalação dos Developers em estudo e em diferentes condições do micélio. Em todos os parâmetros avaliados e quando o micélio extra radicular se manteve intacto após o crescimento do Developer, o comportamento do trigo demonstrou que este beneficia em termos de crescimento (Tabelas 3 e 4) da presença de uma rede de micélio intacto previamente desenvolvida pela planta Developer. Assim, quando o micélio extra radicular foi mantido intacto, servindo de fonte preferencial de inoculo, a colonização das raízes de trigo foi maior (Tabela 5) uma vez que se iniciou mais cedo e desenvolveu de forma mais rápida, de acordo com Fairchild & Miller (1988), neste caso independentemente do tipo de Developer. O facto da colonização se ter iniciado de forma mais precoce e rápida traduziu-se em vantagens para o trigo ao nível do desenvolvimento, da aquisição de nutrientes (Tabelas 7 a 10) e dos mecanismos de proteção contra situações de stress provocado pelo manganês (Mn) uma vez que nestas condições o trigo apresentou teores de Mn mais baixos (Tabela 6, Gráfico1), apesar de ter absorvido mais Mn (Tabela 11) uma vez que cresceu melhor.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 verifica-se que o trigo obteve um desenvolvimento maior da parte aérea quando o micélio foi mantido intacto e a planta precedente foi a serradela, margaça e erva vaqueira. Os baixos valores de SDW do trigo atingidos quando o centeio foi a planta precedente, poderão ser explicados pelo elevado desenvolvimento que o centeio atingiu, deixando por isso menos reservas nutricionais para o desenvolvimento do trigo.

Ao nível nutricional as vantagens de manter o micélio intacto também são claras pois nesta condição de micélio o trigo apresentou absorções mais elevadas de P e Zn, que eventualmente poderão também ter contribuído para o seu melhor crescimento. Naturalmente, em termos de absorção, os valores são mais elevados para todos os nutrientes avaliados na condição de micélio intacto, resultante do maior crescimento do trigo. Mas a causa primeira para o maior crescimento do trigo na condição de micélio intacto foi a redução do teor de Mn na parte aérea do trigo.

Na condição de micélio intacto o trigo registou um rácio Mg/Mn (Tabela 6) ligeiramente abaixo daquele que é considerado mínimo por Goss & Carvalho, (1992) para um saudável desenvolvimento do trigo sem sintomas de stress causado por Mn..

Comparando agora o efeito dos Developers, a serradela foi a planta precedente que proporcionou ao trigo melhores condições de crescimento visto que, e tendo em conta as Tabelas 7, 8, 9 e 10 o trigo apresentou níveis nutricionais mais elevados o que nos indica que a micorrização promovida pela serradela teve um impacto extremamente positivo na aquisição destes elementos. Em relação aos restantes Developers e fazendo uma análise global do ponto de vista nutricional, é perceptível que também a margaça e erva vaqueira foram bons precedentes culturais do trigo pois os valores apresentados assim o demonstram. De referir que o centeio e azevém, duas gramíneas tal como o trigo, não foram tão eficazes como as outras três plantas que pertencem a famílias botânicas diferentes da do trigo.

Tendo em conta a Tabela 5, que diz respeito à taxa de colonização registada no trigo depois de cada Developer, é possível verificar que neste caso também a serradela e margaça, duas culturas de família botânica diferente do trigo, foram as culturas que promoveram uma taxa de colonização maior. Este facto é uma forte evidencia de que a micorrização e os efeitos que dela resultam não estão dependentes da família botânica, ou seja, gramíneas, leguminosas ou compostas, mas pode ter relação com os dois grandes grupos de plantas, monocotiledóneas e dicotiledóneas pois que a serradela é uma leguminosa e a margaça uma planta composta.

A Tabela 11 apresenta os resultados dos valores em Mn que o trigo extraiu e desde logo se nota que a manutenção do micélio intacto contribuiu para a proteção do trigo contra o excesso de Mn, sendo por isso benéfico a promoção da micorrização desde os primeiros momentos de vida da cultura do trigo. No entanto os valores registados merecem uma atenção mais cuidada pois à primeira vista não ilustram o que realmente ocorreu. Ao visualizar na condição de micélio intacto a Tabela 11 observam-se valores de extração de Mn mais altos após a serradela, a margaça e a erva vaqueira, ao passo que no azevém o centeio os valores são mas baixos. Inicialmente diríamos que a micorrização promovida pelo azevém e centeio foi mais eficaz porque ofereceu uma proteção maior e o trigo assimilou menos Mn mas de facto, o trigo depois da instalação da serradela, margaça e erva vaqueira assimilou e acumulou na parte aérea mais Mn. No entanto, estes valores mais elevados de Mn, resultaram de um maior crescimento do trigo e não de uma concentração de Mn mais elevada. Este facto remete-nos para a hipótese de haver mecanismos internos na planta, promovidos pelos FMA que micorrizam a serradela, a margaça e erva vaqueira, que oferecem ao trigo uma maior capacidade de tolerar o Mn na parte aérea sem que sejam

notados sintomas de toxicidade. O Gráfico 2 é mais uma evidencia que apoia a hipótese da serradela, a margaça e a erva-vaqueira terem desenvolvido FMA que proporcionaram ao trigo uma maior capacidade de tolerar o Mn pois é visível que depois da presença destes Developers em específico o trigo obteve um crescimento relativamente maior, bem como teores em Mn também mais elevados na parte aérea.

Sabemos que não há grande especificidade na colonização micorrízica por diferentes FMA, mas que há ligações preferenciais entre determinados FMA e grupos botânicos (Smith e Read, 1997; Van der Heijden *et al.*, 1998). Assim, tendo em conta que a diversidade biológica dos FMA está associada a uma certa diversidade funcional (Bever *et al.*, 1996) e que quando o micélio permanece intacto, este funciona como fonte preferencial de inoculo para iniciar novas colonizações (Fairchild, G.L., Miller, M.H., 1988), os resultados obtidos parecem indicar que a diversidade funcional dos FMA pode ser gerida através da escolha da planta Developer, sendo que o grupo botânico que a condiciona é o do Developer e não necessariamente o da cultura a proteger contra o stress em causa. Esta estratégia pode, com alguma facilidade, ser transferida para o sistemas agrícolas, permitindo capitalizar os benefícios da micorrização como bio-protector contra um stress abiótico, sem ter que recorrer a inoculos comerciais e tirando partido da biodiversidade natural dos FMA, escolhendo o Developer adequado (como cover crop ou cultura precedente da rotação) e usando técnicas de mobilização do solo que permitam manter intacta a rede de ERM, como seja a sementeira direta.

11 - Referencias bibliográficas:

- **Abreu, C.A.; Novais, R.F.; Raij, B. van & Ribeiro, A.C. (1994)** - Comparação de métodos para avaliar a disponibilidade do manganês em solos. R. Bras. Ci. Solo, 18:81-90.
- **Adjoud D., Plenchette C., Halli-Hargas R. and Lapeyrie F., (1996)** - Response of 11 eucalyptus species to inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 6, 129–135.
- **Alho, L., Carvalho, M.J., Goss, M., Brito, I. (2012)** - Weed Management Under No-Till to Increase the Benefits of the Tripartite Symbiosis. Proceedings of the 19th ISTRO Conference. Montevideo, Uruguay, 24-28.
- **Allen, E.B.; Allen, M.E.; Egerton-Warburton, L.; Corkidi, L. & Gomez-Pompa A., (2003)** - Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. Ecol. Appl., 13:1701-1717.
- **Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., (1983)** - Mycorrhiza and their significance on nodulating nitrogen fixing plants. Adv. Agron. 36: 1-54.
- **Becard, G.; Taylor, L. P., Douds, D. D. Pfeffer, P. E., Doner, L. W., (1995)** - Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Molecular Plant Pathogen Interactions, v. 8, p. 252- 258.
- **Berbara, Ricardo L.L., Souza, Francisco A. e Fonseca, Henrique M.A.C., (2006)** - Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição SBSCS, Viçosa, 2006. Nutrição Mineral de Plantas, 432p. (ed. FERNANDES, M.S.).
- **Bethlenfalvay, G.J. & Franson, R.L., (1989)** - Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. J. Plant Nutr., 12:953-970.
- **Bever, J. D., Morton, J. B., Antonovics, J. and Schultz, P. A., (1996)** - Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. J. Ecol. 84, 71–82.
- **Bever, J. D., (2002)** - Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth, Plant and Soil 244: 281–290.
- **Bonfante-Fasolo, P., (1984)** - Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C. L.; BAGYARAJ, D. J.. (Ed.) VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Cap.2, p.5-33.
- **Brito I., Carvalho M., Alho L. and Goss M.J. (2014)** - Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. Soil Biology and Biochemistry, 68:78-84.
- **Brown, M.S. and Bethlenfalvay, G.J., (1987)** - Glycine-Glomus-Rhizobium symbiosis. VI. Photosynthesis in nodulated, mycorrhizal, or N- and P-fertilized soybean plants. Plant Physiol., 85:120-123.
- **Bryla, D.R. and Duniway, J.M., (1997)** - Effects of mycorrhizal infection on drought tolerance and recovery in safflower and wheat. Plant and Soil 197:95–103.
- **Brundrett, M.C., (2002)** - Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol., 154:275- 304.
- **Buchanan, B., Grusen, W., Jones, R. (2000)** - Biochemistry and molecular biology of plants. American Society. of Plant Physiologists Maryland. 1367 p.
- **Cairney, J.W.G., (2000)** - Evolution of mycorrhiza systems. Naturwissenschaften, 87:467-475.
- **Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P., (1992)** - Microbiologia do Solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- **Cardoso, E.J.B.N., (1996)** -Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J.M., eds. Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAS, 4., Granada, 1994. Proceedings. Luxemburg, European Commission Report, p.304- 306.
- **Cardoso, E. J. B. N., Navarro, R. B., and Nogueira, M. A., (2003)** - Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente., R. Bras. Ci. Solo, 27:415-423.
- **Cardoso, J. V., (1965)** - Solos de Portugal. Lisboa
- **Carvalho, Mário (2004)** - O uso sustentado do solo em Portugal, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora.
- **Carvalho, Mário (2009)** – Material de apoio às aulas de Agricultura de Conservação. Curso de Especialização em Tecnologia Agrária. Universidade de Évora.
- **Carvalho, M. (2012)** - O Uso Sustentado do Solo. Revista da Feira do Montado, XIII Feira do Montado, Portel: 14-17.

- **Chinnery L. E. and Harding C. P., (1980)** - The effect of ferrous ion on the uptake of manganese by *Juncus effusus*. *Ann. Bot* 46, 409-412.
- **Clapp J.P., Rodriguez A., Dodd J.C., (2001)** - Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytologist* 149: 539– 554.
- **Clarkson, D.T. (1988)**- The uptake and translocation of manganese by plant roots. In: R.D. Graham, R.J. Hannam, N.J. Uren. (eds). *Manganese in Soil and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 101- 111.
- **Confagri,(2007)** - Importância do Solo e suas Funções, In: <http://www.confagri.pt/Ambiente/AreasTematicas/Solo/TextoSintese/Antecedentes/>
- **Crovetto, C., (1992)** - Rastrojos sobre el suelo. Una introducción a la cero labranza. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- **Dehn, B. & SchÜepp, H., (1989)** - Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. *Agr., Ecosyst. Environ.*, 29:79-83.
- **De Souza, Vênia C., Da Silva, Ricardo A., Cardoso, Gleibson D. e Barreto, Artur F. (2006)** - Estudos sobre fungos micorrízicos, *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.10, n.3, p.612–618.
- **Derpsch, R., Roth, C.H., Sidiras, N. and Köpke, U. (1991)** - Controle da erosão no Paraná, Brasil: Sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. *GTZ, Eschborn, SP* 245.
- **Díaz, G.; Azcón-Aguilar, C. & Honrubia, M., (1996)** - Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil*, 180:241-249.
- **Ducic, T., Polle, A. (2005)** - Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 103-112.
- **Eom, A-H., Hartnett, D. C. and Wilson, G. W. T., (2000)** - Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122, 435–444.
- **Fairchild, G.L., Miller, M.H., (1988)** - Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induced reduction of nutrient absorption in maize. *New Phytol*, 110: 75-84.
- **FAO, (2008)**
- **Finlay, Roger D. (2008)** - Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium, department of Forest Mycology and Pathology, Sweden.
- **Fitter, A.H. and Garbaye, J., (1994)** - Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil* 159:123–132.
- **Foy, C.D.; Scott, B.J. & Fisher, J.A., (1988)** - Genetic differences in plant tolerance to manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J. & UREN, N.C., eds. *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.293-307.
- **Freixial, Ricardo J. Murteira de Carvalho; Carvalho, Mário J. (2004)** – “A Sementeira Directa de Culturas Arvenses. Porque? Uma Experiência no Alentejo”. *Vida Rural*, Nº 1700, pp 38-40.
- **Freixial, Ricardo (2009)** – Agricultura de Conservação e Sementeira Directa. Material de apoio à colaboração na Unidade Curricular de Agricultura de Conservação do Curso de Especialização em Tecnologia Agrária da Universidade de Évora.
- **Goss, M.J.; Carvalho, M.J.G.P.R. (1992)** - Manganese toxicity: The significance of magnesium for the sensitivity of wheat plants. *Plant and Soil* 139: 91-98
- **Gianinnazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E.; Gollotte, A.; Tahiri-Aloui, A.; Gianinnazzi, S., (1996)** - Cellular and molecular defense-related root response to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, v.133, n.1, p.45-57.
- **Harley, J.L. & S.E. Smith., (1983)** - Mycorrhizal symbiosis. Academic, Londres, p. 268-295.
- **Harley, J. L., Harley, E.L., (1987)** - A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. *New Phytologist*, Vol. 105, No. 2, A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora, pp. 1-102.
- **Harrison, M.J., (1999)** - Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. *J. Exper. Bot.*, 50:1013-1022.
- **Hoeksema, J. D., (1999)** - Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better-studied systems. *Oikos* 84, 327–332.
- **Hwang, S.F.; Chang, K.F. & Chakravarty, P., (1992)** - Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of *Verticillium* and *Fusarium* wilts of alfalfa. *Plant Dis.*, 76:239- 243.

- **Jastrow, J.D., Miller, R.M. and Lussenhop, J., (1998)** - Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biol. Biochem.*, 30:905- 916.
- **Joner, E.J.; Briones, R. & Leyval, C., (2000)** - Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil*, 226:227-234.
- **Johnson N. C., Pflieger F. L., Crookston R. K., Simmons S. R. and Copeland P. J., (1991)** - Vesicular arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytol.* 117, 657–663.
- **Johnson N. C., Copeland P. J., Crookston R. K. and Pflieger F. L., (1992a)** - Mycorrhizae — possible explanation for the yield decline with continuous corn and soybean. *Agron. J.* 84, 387–390.
- **Johnson, N. C., Tilman, D. and Wedin, D., (1992b)** - Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73, 2034–2042.
- **Kiers, E.T.; Lovelock, C.E.; Krueger, E.L. & Herre, E.A., (2000)** - Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecol. Letters*, 3:106-113.
- **Kjøller R. and Rosendahl S., (2000)** - Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant Soil* 226: 189–196.
- **Kliromonos, J.N.; McCune, J.; Hart M. & Neville, J., (2000)** - The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Letters*, 3:137-141.
- **Law, R., (1985)** - Evolution in a mutualistic environment. *In* The Biology of Mutualism. Ed. D H Boucher. pp. 145–170. Croom Helm, London.
- **Lei, Y., Korpelainen, H., Li, C. (2007)** - Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere* 68, 686- 694.
- **Lohnis M. P., (1960)** - Effect of magnesium and calcium supply on the uptake of manganese by various crop plants. *Plant and Soil* 12, 339-376.
- **Maas E. V., Moore D. P. and Mason B. J., (1969)** - Influence of calcium and magnesium on manganese absorption. *Plant Physiol* 44, 796-800.
- **Maia, L.C., Silveira, N.S.S. and Cavalcante, U.M.T., (2005)** - Interaction between arbuscular fungi and root pathogens. In: RAI, M.K. Handbook of Microbial Biofertilizers. New York. Haworth Press. p. 325–351.
- **Malloch, D.W., Pirozynski, K.A. & Raven, P.H., (1980)** - Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (a review). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:2113- 2118.
- **McGonigle, T., Miller, H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. & Swan, J., (1990)** - A new method which gives as objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115: 295-309
- **Nogueira, M.A. & Cardoso, E.J.B.N., (2000)** - Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. *R. Bras. Ci. Solo*, 24: 329-338.
- **Olsson, P.A.; Thingstrup, I.; Jakobsen, I. & Baath, F., (1999)** - Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1879-1887.
- **Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E., (1996)** - *Biologia vegetal*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,728p.
- **Raven, J.A. & Edwards, D., (2001)** - Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exper. Bot.*, 52:381-401.
- **Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L.E., (2000a)** - Glomalean fungi from the Ordovician. *Sci.*, 289:1920-1921.
- **Redecker, D., Morton, J.B. & Bruns, T.D., (2000b)** - Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molec. Phylog. Evol.*, 14:276-284.
- **Saggiñ-Júnior, O. J., Lovato, P. E., (1999)** - Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: Siqueira, J. O. (Org.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 818p.
- **Sanders, I. R. and Fitter, A. H., (1992)** - Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycol. Res.* 96, 415–419.
- **Schüßler, A.; Schwarzott, D. & Walker, C., (2001)** - A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 105:1413-1421.
- **Sieverding, E. (1991)** - Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems Technical Cooperation Federal Republic of Germany.371p.
- **Siqueira, J. O.; Franco, A. A., (1988)** - *Biologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 236p.
- **Smith, S. E. and Read D. J., (1997)** - *Mycorrhizal Symbiosis*. 605 pp. Academic Press, San Diego, CA.

- **Smith, S.E., Read D.J., (2008)** - Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. Academic Press.
- **Souza, V. C.; Silva, R. A.; Cardoso, G. D.; Barreto, A. F., (2066)** - Estudo sobre fungos micorrízicos. In: Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v.10, n.3, p.612-618.
- **Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A. and Sanders I. R., (1997)** - Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. J. Ecol. 85, 181–191.
- **Taylor, R. J., (1991)** - Plants, fungi and bettongs: a fire dependent co-evolutionary relationship. Australian Journal Ecology, Oxon, v.16, n.3, p.409-411.
- **Tchabi, A., Coyne, D., Hountondji, F., Lawouin, L., Wiemken, A. and Oehl, F., (2010)** - Efficacy of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi for promoting white yam (*Dioscorea rotundata*) growth in West Africa, Applied Soil Ecology 45, 92–100.
- **Vandenkoornhuysen P, and Leyval C., (1998)** - SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia* 90: 791–797.
- **van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR., (1998)** - Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72.
- **Walker, C., (1995)** - AM or VAM: What's in a word? In: VARMA, A; HOCK, B. Mycorrhiza. Springer-Verlag, Berlin, p.25-26.
- **Zambolim, L., Reis, M.A. e Costa, L.M., (1992)** - Substratos para multiplicação de inóculo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. *Fitopatologia Brasileira* 17:28–31.

