

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e
Recursos Hídricos**

Vanessa Cristina Silva Vieira

AVALIAÇÃO DO *STATUS* MICORRÍZICO DE CULTIVARES DE OLIVEIRA, NA FAZENDA EXPERIMENTAL DE MARIA DA FÉ - MG (FEMF-EPAMIG)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de Concentração: Diagnóstico, monitoramento e gestão ambiental

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Junho 2010
Itajubá-MG

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Cristiane N. C. Carpinteiro- CRB_6/1702

V658a

Vieira, Vanessa Cristina Silva

Avaliação do status micorrízico de cultivares de oliveira, na fazenda experimental de Maria da Fé-MG(FEMFEPAMIG) / por Vanessa Cristina Silva Vieira. -- Itajubá (MG) : [s.n.], 2010.

51 p.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Micorriza arbuscular. 2. Olea europea L. 3. Potencial de inóculo.
I. Melloni, Rogério, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

OFEREÇO

A Deus, presença real em minha vida.

DEDICO

Aos meus pais, Antonio e Leila, ao meu irmão, Nirton;

A minha avó, Marica, tia Lílian, afilhada Emmanuelle, e demais primas;

À amiga Luciana Botezelli,

Pelo apoio e incentivo que foram essenciais nessa etapa da minha vida.

*“Plantas não têm raízes,
plantas têm micorrizas”.*
(J.L. Harley)

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. Rogério Melloni pela orientação, pelo incentivo ao longo do curso, pelas palavras de apoio nas horas oportunas, pela confiança e pela amizade.

À empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pela parceria, em especial ao pesquisador João Vieira Neto pela contribuição no trabalho e ao estagiário Daniel pela atenção de sempre.

Ao professor Dr. Marcos Bernardes, pelo apoio, disponibilidade e atenção como coordenador do curso.

Às professoras Dra. Eliane Melloni, MSc. Karine Bicalho, Dra. Maria Inês e Dra. Luciana Botezelli pelo apoio e incentivo.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia (Paulo) e Saneamento (Cláudio). Em especial, à técnica do laboratório de Solos, Tânia Barbosa, não só pela ajuda nos experimentos, mas também pelas orações e amizade.

À professora Dra. Elke por ter me recebido no laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ para identificação de esporos e à técnica Denise Mescolloti pela ajuda no processo de identificação.

Ao professor Dr. Sidney Stürmer por realizar o processo de identificação de esporos e por conferir as fotos de FMAs e respectivas estruturas.

Aos meus pais e ao meu irmão (primeiro pesquisador da família), meus grandes incentivadores.

Aos alunos de iniciação científica Fernanda Guedes, Marielle, Neto Nunes e César, pela ajuda nos experimentos, coleta, assuntos computacionais e também pela torcida.

Aos amigos de mestrado: Amaro, Carol, Edu, Daniel, Fernanda Paes, Geovana, Luiz Flávio, Mabel e Sara, pela convivência, troca de experiências e pela amizade. Agradeço em especial ao amigo Lucas Lopes pela constante ajuda ao longo do curso, por formar comigo uma dupla, e pela amizade, carinho e cumplicidade.

Agradeço com carinho aos demais amigos de Itajubá pela convivência nesses dois anos. Em especial: Bruna (Chuchu), Carol, Ciça, Clarice, Diego, Elis, Érica, Esmeraldo, Fernanda Brito, Fernando Machado, Francielle, Fred e Gabi, Gisele, Ione, Jaime, Janice, Leandro (Rinite), Luiz Felipe, Marcelo Barison, Maitê, Mariana Belato, Natália, Samuel, Simone, Reginaldo, Rochane e Rodrigo.

RESUMO

Vieira, V. C. S. Avaliação do *status* micorrízico de cultivares de oliveira, na Fazenda Experimental de Maria da Fé - MG (FEMF-EPAMIG)

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) se associam às raízes da maioria das plantas e o crescimento de suas hifas é capaz de proporcionar um aumento da superfície radicular, resultando em maiores taxas de absorção de água e nutrientes. Devido a essa habilidade, muitos estudos relacionados aos FMAs têm sido direcionados ao uso desse grupo de microrganismos na sustentabilidade de culturas. Existem poucos estudos descritos envolvendo comunidades de FMAs na cultura da oliveira (*Olea europea* L.). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar propágulos de FMAs em diferentes cultivares da Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG (FEMF – EPAMIG) e com potencial de exploração comercial no Brasil, de modo a levantar as primeiras informações relativas à associação micorrízica entre os mesmos. Para isso, amostras de solo e de raízes de oliveira foram coletadas para determinação do comprimento de micélio extrarradicular ativo e total, avaliação da porcentagem e intensidade de colonização micorrízica, e densidade e diversidade (morfotipos) de esporos. As primeiras fotos da associação micorrízica foram registradas em oliveira no Brasil, confirmando o micotrofismo da espécie. No entanto, os resultados mostram que não houve efeito dos cultivares na distribuição dos propágulos de FMAs estudados, estando homogeneamente distribuídos nas proximidades das diferentes rizosferas. Sugerem-se estudos posteriores relacionados à certificação dos cultivares e à eficiência de populações de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas, em condições controladas e em campo.

Palavras-chave: micorriza arbuscular, *Olea europea* L., potencial de inóculo

ABSTRACT

Vieira, V. C. S. Assessment of mycorrhizal status of the cultivated olive tree, on Fazenda Experimental de Maria da Fé - MG (FEMF-EPAMIG)

Mycorrhizal fungi (AMF) are associated to the roots of most plants and growth of its hyphae are able to provide an increase in root surface, resulting in higher rates of absorption of water and nutrients. Due to this ability, many studies related to the AMF have been directed to use this microbial group in the sustainability of crops. There are few studies involving communities of AMF in the cultivation of olive trees (*Olea europea* L.). The objective of this study was to evaluate AMF propagules in different cultivars installed on Fazenda Experimental de Maria da Fé - MG (FEMF-EPAMIG) and with potential for commercial exploitation in Brazil, for providing the first information on the mycorrhizal association between them. For this, soil and root samples of cultivars were collected to determine the length of active and total extraradical mycelium, evaluation of the rate and intensity of colonization, and density and diversity (morphotypes) of spores. The first photos of mycorrhizal fungi in olive tree were recorded in Brazil, showing that the species is mycotrophic. However, the results showed no significant effect of cultivars in the distribution of AMF propagules, being evenly distributed in the vicinity of different rhizospheres. The author suggests further studies related to certification of cultivars and to efficiency of populations of mycorrhizal fungi in the development of seedlings under controlled and field conditions.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, *Olea europea* L., inoculum potential

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Vista geral da área de estudo (esquerda) e detalhe de um cultivar de oliveira (direita), na Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG.....22
- Figura 2:** Croqui do experimento em campo mostrando a distribuição dos cultivares de oliveira em estudo, nos quatro blocos23
- Figura 3:** Marcação (esquerda) e detalhe do ponto de amostragem de solo sob cultivar de oliveira (direita) na Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG.....24
- Figura 4:** Amostras de solo da rizosfera de cultivares de oliveira coletadas na área de estudo e acondicionadas sob temperatura de 4°C.....24
- Figura 5:** Fluxograma das etapas do estudo das populações de FMAs.....25
- Figura 6:** Metodologia de extração e coloração de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares (a) Lavagem da amostra de solo (rizosfera), (b) Suspensão resultante da lavagem, (c) Suspensão em agitação, (d) Suspensão após agitação (descanso de 2 min), (e) Passagem da suspensão por peneira de 0,045 mm, (f) Coleta de 11 mL de suspensão retida na peneira anterior, (g) Filtração a vácuo em membrana quadriculada e coloração com FDA, (h) Lâmina com membrana quadriculada demarcada 8x8 = 64 campos de contagem, (i) Membrana ao microscópio de epifluorescência.....26
- Figura 7:** (a) Raízes nos cassetes para coloração, (b) Raízes imersas em KOH, (c) Solução de tinta de caneta e ácido acético (d) Raízes sendo coradas em solução de tinta de caneta e ácido acético, (e) Placa para avaliação de porcentagem de colonização radicular, (f) Lâminas para avaliação da intensidade de colonização radicular.....27
- Figura 8:** (a) Amostra de solo (50 mL), (b) Lavagem da amostra de solo, (c) Passagem da suspensão pelas peneiras, (d) Material retido na peneira de 0,053 mm, (e) Centrifugação, (f) Tubo de centrífuga com suspensão de solo sobrenadante e solução de sacarose, (g) placa concêntrica para contagem dos esporos em lupa.....28
- Figura 9:** Micélio extrarradicular ativo (a) e total (b) de fungos micorrízicos arbusculares, em amostras de solo sob oliveira, no aumento de 100X. Legenda: MEA: Micélio Extrarradicular Ativo e MET: Micélio Extrarradicular Total.....31

Figura 10: Comprimento de micélio extrarradicular ativo, em $m\ g^{-1}$ de solo seco, em amostras de solo da rizosfera de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	32
Figura 11: Comprimento de micélio extrarradicular total, em $m\ g^{-1}$ de solo seco, em amostras de solo da rizosfera de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	32
Figura 12: Relação entre comprimento de micélio extrarradicular ativo e total em diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	33
Figura 13: Colonização micorrízica em oliveira (a e b). Legenda: E – Esporos; H – Hifas inter e intracelulares; V – Vesículas.....	34
Figura 14: Intensidade de colonização radicular (%) em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	35
Figura 15: Intensidade de colonização radicular (em porcentagem), no aumento de 100X, em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	35
Figura 16: Porcentagem de colonização radicular em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo.....	36
Figura 17: Número médio de esporos por 50 g de solo, por cultivar, nos blocos estudados.....	38
Figura 18: Exemplares de esporos de FMAs coletados das amostras de solo sob cultivo de oliveiras. (a) <i>Glomus</i> sp. ; (b) <i>Scutellospora</i> sp.; (c) <i>Acaulospora</i> sp1. e (d) <i>Acaulospora</i> sp2.....	41
Figura 19: Morfotipos de fungos micorrízicos arbusculares nos cultivares de oliveira	42
Figura 20: Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') calculado pelos morfotipos de FMAs por cultivar de oliveira.....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Cultivares de oliveira definidos para o presente estudo.....23
- Tabela 2:** Atributos físicos e químicos das amostras de solo para os quatro blocos em estudo.....29
- Tabela 3:** Tabela 3. Gêneros e espécies de FMAs por cultivar, recuperados do solo rizosférico de oliveira.....40
- Tabela 4:** Correlação entre os atributos microbiológicos em estudo: micélio extrarradicular ativo (MEA), micélio extrarradicular total (MET), porcentagem de colonização (% Col.), intensidade de colonização (Int. Col.), densidade de esporos (Dens. Esp.) e diversidade de esporos (Div. Esp.).....44

LISTA DE ABREVIATURAS

EPAMIG: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

FEMF: Fazenda Experimental de Maria da Fé

FMA: Fungos micorrízicos arbusculares

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEA: Micélio extrarradicular ativo

MET: Micélio extrarradicular total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Aspectos gerais sobre oliveira (<i>Olea europea</i> L.).....	14
2.2 Aspectos gerais sobre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....	16
2.3 FMAs e a sustentabilidade de culturas.....	18
2.4 Estudos aplicados de FMAs para cultura da oliveira, em condições de campo e controladas.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Área de estudo	22
3.2 Amostragens de solo.....	23
3.3. Análises microbiológicas	24
3.3.1 Micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET)	25
3.3.2 Intensidade e porcentagem de colonização radicular	27
3.3.3 Densidade e diversidade de esporos	28
3.4 Análise textural e atributos químicos da rizosfera	29
3.5 Análise estatística dos resultados	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET)	31
4.2 Intensidade e porcentagem de colonização radicular	34
4.3 Densidade e diversidade de esporos	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos do solo que se associam às raízes da maioria das plantas numa relação de mutualismo, onde ambos os organismos normalmente são beneficiados. A associação micorrízica geralmente proporciona à planta um incremento na absorção de água e nutrientes, principalmente aqueles que estão pouco disponíveis no solo. As maiores taxas de absorção se relacionam ao aumento da superfície de contato, que é dado pelo crescimento das hifas fúngicas. Em troca, o fungo recebe fotoassimilados que são necessários para o seu desenvolvimento. Os FMAs se destacam, entre os diversos grupos de microrganismos do solo, como capazes de desempenhar múltiplos papéis como estruturação do solo, nutrição das plantas e controle de patógenos.

Entre as plantas que formam micorriza arbuscular encontra-se a oliveira, cultura cujo interesse econômico em Minas Gerais e no Brasil está em expansão devido, principalmente, aos esforços para a produção do primeiro azeite de oliva nacional e pelo potencial que a cultura apresenta de agregação de valor. A oliveira, planta da família Oleaceae, é uma espécie exótica, de clima temperado e uma das mais antigas, cuja origem e desenvolvimento da cultura confundem-se com a história da humanidade. Quando cultivada, constitui-se em uma árvore de forma arredondada e tamanho médio, apresentando folhas com a superfície adaxial de cor verde-escura e prateado na superfície abaxial, apresenta inflorescência em racimo e o seu fruto com coloração que vai do verde ao preto é conhecido como azeitona.

Os principais países produtores de oliveira estão na Europa, onde se destacam a Espanha, Itália e Grécia. Na América do Sul, destacam-se o Chile e a Argentina como principais produtores e exportadores de azeitona e de azeite. A oliveira foi introduzida no Brasil no início do século XIX, nas Regiões Sul e Sudeste e é ainda hoje uma espécie pouco cultivada.

A produtividade das culturas e, entre essas, a da oliveira, é sustentada por uma diversidade de fatores, principalmente de ordem biológica, que podem ocorrer na sua parte aérea ou no solo sob cultivo. Nesse sentido, destacam-se os fungos formadores de micorriza. Apesar da importância à sustentabilidade, são inexistentes os estudos com FMAs em oliveiras no Brasil. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar propágulos de FMAs (comprimento de micélio extrarradicular ativo e total, avaliação da porcentagem e intensidade de

colonização micorrízica e densidade e diversidade de esporos) em diferentes cultivares de oliveira instalados na Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG (FEMF – EPAMIG) e com potencial de exploração comercial no Brasil, de modo a registrar a interação entre os mesmos e levantar as primeiras informações relativas ao estado micorrízico da oliveira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos Gerais sobre Oliveira (*Olea europaea* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família Oleaceae, na qual estão incluídos cerca de 30 gêneros. A planta cultivada é uma espécie arbórea de tamanho médio e formato arredondado, cujo porte, densidade da copa, comprimento de entrenós e cor da madeira variam em função do cultivar e de condições de cultivo (RAPOPORT, 1998). É uma das plantas cultivadas mais antigas cuja origem e desenvolvimento da cultura confundem-se com a história da humanidade. É aceito que a oliveira seja proveniente da Síria, do Líbano ou mesmo de Israel, mas há relatos que esta espécie tenha-se originado na Ásia Menor. A domesticação da espécie iniciou-se no período Paleolítico e Neolítico, entre 10.000 a 3.000a.C., possivelmente na Mesopotâmia, de onde se difundiu para o Egito (2.000a.C.), ilhas da Ásia Menor e Grécia Continental (1.800a.C.). Posteriormente, a espécie disseminou-se pela Bacia do Mediterrâneo, chegando a vários países da Europa e do Oriente Médio. Atualmente, os principais países produtores de oliveira estão na Europa, (destaque para a Espanha, Itália e Grécia). Na América do Sul, destacam-se o Chile e a Argentina como principais produtores e exportadores de azeitona e de azeite. No Brasil, a oliveira foi introduzida no início do século XIX, nas Regiões Sul e Sudeste. Ainda hoje, é uma espécie pouco cultivada, sendo que a maioria dos pomares existentes não é destinada à produção comercial ou industrial (VIEIRA NETO *et al.*, 2008).

A oliveira é uma planta de clima temperado, necessitando de baixas temperaturas no período que antecede a floração para ocorrência de produções satisfatórias. Temperaturas de inverno (médias) entre 8 e 10°C, não ultrapassando 21°C, altitudes variáveis (200-1.300m) e regime de chuvas superior a 800 mm anuais são suficientes para produções econômicas (OLIVEIRA & PÁDUA, 2002). Embora as condições de temperatura e de incidência de chuvas observadas em micro regiões de Minas Gerais não apresentem características de clima mediterrâneo (considerado o mais apropriado ao cultivo dessa planta), no Sul do Estado, a ocorrência de baixas temperaturas é suficiente para quebra de dormência das plantas, com produção de azeitonas.

De acordo com Vieira Neto *et al.* (2008), a estimativa de área plantada de oliveira no mundo é de 8,3 milhões de hectares e a importância dessa atividade agrícola se relaciona principalmente com a produção de azeite de oliva, cujo uso moderado e habitual é considerado benéfico à saúde humana pela sua comprovada eficácia na proteção de doenças cardiovasculares.

De acordo com os mesmos autores, o Brasil ocupa o terceiro lugar como maior importador de azeitonas e o quinto em azeite de oliva, entre os países importadores do mundo. O cultivo de oliveiras em áreas agrícolas do Brasil, especialmente Minas Gerais, é uma atividade econômica em expansão, devido à inexistência de plantios comerciais (em produção) em território nacional, e pelo fato de que o Brasil importa cem por cento do azeite e da azeitona que consome. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2008, foram gastos 463 milhões de reais com importações desses produtos.

A planta apresenta duas fases: a fase juvenil e a adulta. Na fase juvenil, apresenta folhas mais curtas e grossas. Na fase adulta, alcança a sua capacidade reprodutiva apresentando folhas maiores e mais delgadas, a superfície adaxial da folha é de coloração verde-escura, enquanto que a superfície abaxial é de coloração prateada (VIEIRA NETO *et al.*, 2008).

A oliveira apresenta sistema radicular constituído por raiz pivotante central quando a planta se origina de semente e inicialmente por raiz fasciculada quando a planta tem origem por propagação vegetativa ou estaquia. Essa densidade e configuração das raízes têm papel importante no estabelecimento e atividade de microrganismos, com forte influência na rizosfera dos cultivares. A inflorescência é em racimo, com a flor constituída por quatro sépalas verdes soldadas, que formam um cálice com quatro pétalas brancas, que também se soldam pela base para formar a corola. O fruto conhecido como azeitona é uma drupa de tamanho pequeno e forma elipsoidal, cujas dimensões podem variar de acordo com a variedade, podendo apresentar entre 1 e 4 cm de comprimento e diâmetro de 0,6 a 2 cm. A coloração varia de verde a preta (OLIVEIRA & ABRAHÃO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.2. Aspectos gerais sobre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

A simbiose conhecida como micorriza surgiu há cerca de 400 milhões de anos, período que coincide com a conquista do ambiente terrestre pelas plantas e fato que é evidenciado por estudos em raízes fossilizadas (AZEVEDO, 2008; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As micorrizas são associações normalmente mutualísticas entre certos fungos e raízes de plantas e, juntamente com os líquens, representam formas antigas de relação simbiótica, com formação de estruturas fisiológicas especializadas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos do solo, pertencentes ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes, que possui 4 ordens, 10 famílias, 13 gêneros e cerca de 180 espécies (AZEVEDO, 2008). Colonizam as raízes de plantas de quase todos os gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, além de alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas (BERBARA *et al.* 2006; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Estima-se que aproximadamente 80% das espécies vegetais formam esse tipo de micorriza, que de acordo com Gomide (2009), representam, dentre os grupos funcionais de organismos do solo, os mais intimamente e obrigatoriamente associados ao sistema radicular.

Moreira & Siqueira (2006) consideram que essa associação está presente na maioria das taxas vegetais em nível de ordem, e em todas os gêneros e espécies de plantas vasculares, representando uma regra e não uma exceção na natureza. É provável que os FMAs representem os fungos mais abundantes nos solos da maioria dos ecossistemas tropicais, principalmente nos sistemas agrícolas, onde podem representar até 50% da biomassa microbiana. Tal simbiose tem sido considerada a mais importante de todas as que envolvem plantas (BERBARA *et al.*, 2006).

Essa simbiose mutualística entre fungos e raízes de plantas se caracteriza pela formação de estruturas fúngicas (hifas, vesículas e arbúsculos) na região do córtex e grande quantidade de hifas extrarradiculares, que funcionam como extensões do sistema radicular, o que proporciona maior desenvolvimento da planta, em virtude, principalmente, da maior absorção de nutrientes e água (STÜRMER *et al.*, 2009; MACHINESKI *et al.*, 2008).

O processo de colonização das raízes pelo fungo é controlado, não ocorrendo colonização em regiões meristemáticas e nem em vasos condutores. Não há

colonização de todas as células do córtex, nem formação de arbúsculos em todas as extremidades das hifas intrarradiculares (AZEVEDO, 2008). Pode-se dizer que os aspectos anatômicos e fisiológicos da colonização das raízes por FMAs são conhecidos enquanto os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento e a eficiência da simbiose não são bem compreendidos (KIRIACHEK, 2008; ALMEIDA, 2007).

Os FMAs são simbiotróficos obrigatórios e só completam seu ciclo de vida na presença do hospedeiro, que lhe fornece carboidrato e outros fatores necessários ao desenvolvimento e esporulação (AZEVEDO, 2008).

É amplamente aceita e documentada na literatura a capacidade dos FMAs em aumentar a absorção de nutrientes e água da planta a qual estejam associados. As hifas fúngicas aumentam a absorção de nutrientes minerais, como o fósforo e o nitrogênio, importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas (STÜRMER *et al.*, 2009; AZEVEDO, 2008; SILVEIRA & FREITAS, 2007; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ZSÖGÖN, 2006; COLOZZI FILHO & CARDOSO, 2000). A colonização das raízes de plantas por FMAs facilita a utilização de nutrientes que ocorrem em quantidades limitantes no solo, fazendo com que a planta sofra menos com deficiências, além de promover aumentos na absorção de água e maior resistência a períodos de estiagem e, principalmente, aumentos na resistência a patógenos do sistema radicular, principalmente outros fungos (RUSSOMANNO *et al.*, 2008).

Essa associação é capaz de exercer efeito sobre o desenvolvimento e fisiologia da planta, aumentando seu crescimento e produção, em função do incremento na absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (ZSÖGÖN, 2006). A troca de nutrientes entre os simbiontes micorrízicos ocorre em estruturas fúngicas intracelulares chamadas de arbúsculos, que são formados pela ramificação dicotômica e invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (SOUZA, 2006). Em estágios mais avançados de colonização ocorre a formação de vesículas, que são estruturas intracelulares, cuja função possivelmente esteja relacionada à reserva de lipídeos e formação de esporos no solo ou no interior das raízes (AZEVEDO, 2008).

Em suma, pode-se dizer que os FMAs fornecem nutrientes às plantas e favorecem além da absorção de água, a agregação e estabilidade dos solos devido

à produção de glomalinas, glicoproteínas hidrofóbicas encontradas somente na presença de FMAs (GOMES *et al.*, 2007; BERBARA *et al.*, 2006).

2.3. FMAs e a sustentabilidade de culturas

De acordo com França (2004), atualmente existe um grande interesse em promover sistemas de produção compatíveis com as tendências do desenvolvimento sustentável. Entre os diversos grupos de microrganismos do solo, os FMAs se destacam pelos múltiplos papéis que desempenham: estruturação do solo, nutrição das plantas e controle de patógenos habitantes do solo. Moreira & Siqueira (2006) corroboram com a idéia ao afirmarem que “uma das estratégias para alcançar a sustentabilidade de qualquer ecossistema é maximizar o uso dos microrganismos e processos biológicos do solo, entre os quais se destacam os FMAs”.

A sustentabilidade da produção agrícola se relaciona com os efeitos benéficos das micorrizas sobre a nutrição de plantas, principalmente no que diz respeito à absorção de fósforo (AZEVEDO, 2008; ZSÖGÖN, 2006; Carneiro *et al.*, 2004).

De acordo com Bonfim *et al.* (2007), para que ocorra uma diminuição no uso de insumos químicos, sobretudo fertilizantes, os estudos sobre FMAs tornam-se importantes para contribuir na maximização do equilíbrio ecológico do solo, na perspectiva de preservação ambiental e aumento da produção.

O efeito mais importante do ponto de vista agrônômico, conforme já salientado no item anterior, é o maior desenvolvimento e produtividade das plantas micorrizadas. Conhecer como manejar os FMAs, visando aumentos da eficiência simbiótica, pode ser importante na obtenção de cultivos produtivos, em áreas de solos férteis e em áreas de baixa aptidão aos cultivos comerciais (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

Os efeitos benéficos dos FMAs têm sido demonstrados nas mais variadas condições e espécies vegetais, ocorrendo sempre estímulo do crescimento vegetal como conseqüência do aumento na nutrição mineral da planta (RUSSOMANNO *et al.*, 2008). Segundo Berbara *et al.* (2006) as micorrizas arbusculares possuem caráter ubíquo, apresentando papel vital para a sustentabilidade da agricultura em regiões tropicais, além de potencial biotecnológico, com impacto na estrutura de comunidades vegetais e no dreno de C atmosférico. Para Azevedo (2008), os FMAs são especialmente importantes em ecossistemas de regiões tropicais, pois nos solos

dessas regiões, grande parte do fósforo está fortemente associada a óxidos de ferro e alumínio, o que acarreta uma baixa disponibilidade para as plantas.

Stürmer *et al.* (2009) consideram que o potencial biotecnológico dos FMAs é grande em decorrência do papel desses fungos no aumento da absorção de nutrientes imóveis no solo como o fósforo. Estudos do tema são importantes, uma vez que são gastos em solos brasileiros altos valores com a utilização de fertilizantes à base de fósforo, que nem sempre são eficientes no desenvolvimento das culturas.

2.4. Estudos aplicados de FMAs para cultura da oliveira, em condições de campo e controladas

A produtividade de culturas, como é o caso da oliveira, é sustentada por uma diversidade de fatores, principalmente de ordem biológica, que podem ocorrer na parte aérea ou no solo. Dentre esses, estão os fungos formadores de micorriza (BONFIM *et al.*, 2008).

Para verificar a ocorrência e quantificar os FMAs, se faz necessária a adoção de procedimentos específicos como: observação e avaliação microscópicas das raízes quanto à presença do fungo e estruturas típicas como arbúsculos, vesículas e esporos; extração, separação e contagem de esporos do solo, no caso a presença indica a ocorrência da associação no ecossistema; bioensaio para determinação da infectividade do solo e do número mais provável de propágulos, que indicam o potencial de colonização micorrízica do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Estudos de quantificação da diversidade de FMAs costumam usar como medida a contagem e a identificação de esporos recuperados do solo. A taxonomia dos FMAs é baseada na morfologia dos esporos. Porém, uma identificação precisa de esporos coletados em campo é dificultada devido ao fato de que tais esporos encontram-se deteriorados por parasitas ou em fases de desenvolvimento inadequadas para a identificação das estruturas diferenciadoras (CÓRDOBA *et al.*, 2002).

Brundrett (1991), citado por Gomide (2009), discorre que embora os esporos constituam o principal tipo de inóculo de FMAs, a sua densidade, muitas vezes, não se relaciona com a formação micorrízica nos solos devido à influência de vários outros fatores, inclusive da planta hospedeira e de fatores climáticos e edáficos. O

estudo da ecologia dos FMAs nos solos apresenta ainda outras limitações, impostas, principalmente, pela impossibilidade de cultivo *in vitro* (AZEVEDO, 2008).

O estudo da ocorrência e dinâmica das populações de FMAs no solo é considerado um desafio, de acordo com Colozzi Filho & Cardoso (2000), devido à dificuldade de identificação destes fungos, tanto livres no solo como no interior das raízes.

Avaliando a influência de micorriza no crescimento de oliveira, Porras - Piedra *et al.* (2005) mostraram que os FMAs reduzem o esforço sofrido pelas plantas no transplântio para o campo, o que aumenta a resistência da planta à doença, melhora a absorção de água e nutrientes, aumenta sua taxa de fotossíntese e melhora o seu vigor. Da mesma forma, Santos-Antunes (2002), ao avaliar se a inoculação de plantas jovens de oliveira com FMAs exercia influência no seu crescimento, constatou que a mesma pode melhorar o desenvolvimento da planta sob a hipótese das mesmas suportarem eventuais causas de estresse como a falta de água ou mesmo ataques de agentes patogênicos.

Com o objetivo de auxiliar o processo de recuperação de áreas mediterrâneas semiáridas degradadas pela agricultura, Caravaca *et al.* (2003) realizaram estudos com inóculos de FMAs. Tais estudos mostraram que a inoculação foi importante no restabelecimento de espécies vegetais naquelas áreas, incluindo a oliveira. A biomassa das plantas inoculadas mostrou-se maior que a das plantas não inoculadas um ano após a plantação.

Para Binet *et al.* (2007), a inoculação de determinados cultivares de oliveira com FMAs pode melhorar significativamente a sobrevivência, desenvolvimento e crescimento da planta, confirmando o papel fundamental desse grupo de microrganismos na sustentabilidade da cultura.

Em estudos de reflorestamento com oliveiras, Caravaca *et al.* (2002) evidenciaram que a inoculação com fungos micorrízicos foi capaz de promover melhorias na estrutura do solo e aumentar o crescimento das plantas.

Para Porras Piedra *et al.* (2005), a inoculação de FMAs em plantas de oliveira (“azeitona selvagem”) aumentou a atividade de enzimas, as taxas de fotossíntese e transpiração, condutibilidade de estômatos e níveis do fósforo da folha, além de melhorar a aquisição de nutriente após o transplântio para o campo, a estabilidade de agregados da rizosfera, a eficiência no uso da água e a biomassa do componente aéreo da planta.

Melhorias no vigor da variedade de oliveira Arbequina em virtude da inoculação com FMAs foram verificadas por Castilho *et al.* (2006). Estudos de inoculação com plantas do mesmo cultivar foram realizados por Porras-Piedra *et al.* (2005), onde observaram que a inoculação com uma espécie do gênero *Glomus* parece estimular mais o desenvolvimento da planta em relação à outra espécie de fungo do mesmo gênero. A inoculação de raízes de oliveira com FMAs estimula seu crescimento durante a fase de viveiro e em estágios iniciais do desenvolvimento. Os resultados confirmam a possibilidade de utilização de FMAs na produção de mudas de oliveira. O desenvolvimento obtido por tais inoculações difere em função do fungo, mas do ponto de vista agrônomo, todos aqueles usados no trabalho se mostraram úteis.

Santos-Antunes (2002), em trabalho com inoculação de plantas jovens de oliveira com FMAs pertencentes à espécie *Glomus intraradices*, verificou que plantas micorrizadas apresentaram maiores taxas de crescimento. O pesquisador presume que a inoculação de plantas de oliveira em viveiro pode levar a maiores taxas de desenvolvimento em campo, considerando ainda a hipótese de que as plantas micorrizadas suportam melhor eventuais causas de estresse como a seca ou ataque de agentes patogênicos.

Pesquisas recentes de Meddad-Hamza *et al.* (2010) com a inoculação de duas espécies de FMAs (*Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*) em plantas de oliveira, empregando técnicas moleculares na identificação, também evidenciaram resultados positivos no desenvolvimento das plantas inoculadas. Quando comparadas às não inoculadas, as plantas suportaram melhor a transplantação e ao estresse hídrico.

Aumentos na concentração de glomalina e na porcentagem de agregados estáveis na rizosfera foram observados por Caravaca *et al.* (2005), o que enfatiza a importância da simbiose micorrízica para a sustentabilidade e estabilidade do ecossistema originado pelo plantio da oliveira.

No Brasil, não há registros de pesquisa e divulgação de trabalhos que relacionam a ocorrência ou levantamento de FMAs na cultura da oliveira, possivelmente pela cultura estar em processo de aclimatização e implantação. Portanto, a carência desses dados limita os estudos relacionados à sustentabilidade da cultura, já que os mesmos se concentram em aspectos relacionados ao manejo do solo, à fertilidade e ao controle fitossanitário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A área de estudo localiza-se na Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF), pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), compreendendo um experimento em andamento, intitulado “Rendimento agrônômico de variedades de oliveira (*Olea europaea* L.) em Minas Gerais”. A utilização da área desse experimento se justificou pelo fato do mesmo já estar devidamente instalado, em fase de avaliação das respostas dos cultivares, e pelo fato do estudo não contemplar a qualidade microbiológica do solo sob cultivo, e as relações dessas com os atributos físicos e químicos do solo. Detalhes do experimento podem ser vistos na Figura 1.



FIGURA 1 - Vista geral da área de estudo (esquerda) e detalhe de um cultivar de oliveira (direita), na Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG

Os cultivares de oliveira definidos para estudo estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Cultivares de oliveira definidos para o presente estudo

CULTIVAR	ORIGEM	PORTE	VIGOR	FINALIDADE	TAMANHO DO FRUTO (PESO)
Ascolano 315	Italiana	Aberto	Alto	Mesa	Alto
Arbequina	Espanha	Ereto	Baixo	Azeite	Baixo
Grappolo 541	Italiana	Aberto	Médio	Mesa e azeite	Médio
Grappolo 561	Italiana	Aberto	Médio	Mesa e azeite	Médio
Grappolo 575	Italiana	Ereto	Baixo	Mesa e azeite	Médio
Leccino	Italiana	Aberto	Alto	Azeite	Médio
Maria da Fé	Portugal	Aberto	Ato	Azeite	Baixo

Fonte: Adaptado de VIEIRA NETO *et al.* (2008).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições. Foram coletadas 84 (oitenta e quatro) amostras de solo referentes a três plantas (das cinco existentes por cultivar, por bloco), cultivadas no espaçamento de 4 x 6m, conforme o croqui do experimento, representado na figura 2.

Bloco I	Maria da Fé	Ascolano 315	Leccino	Arbequina	Grappolo 575	Grappolo 561	Grappolo 541
Bloco II	Grappolo 561	Arbequina	Grappolo 541	Grappolo 575	Leccino	Maria da Fé	Ascolano 315
Bloco III	Ascolano 315	Grappolo 541	Arbequina	Grappolo 561	Grappolo 575	Maria da Fé	Leccino
Bloco IV	Leccino	Grappolo 561	Grappolo 575	Maria da Fé	Ascolano 315	Grappolo 541	Arbequina

Figura 2 - Croqui do experimento em campo mostrando a distribuição dos cultivares de oliveira em estudo, nos quatro blocos

3.2. Amostragens do solo

As amostragens do solo (Figura 3) foram realizadas no final do verão (março) de 2009, totalizando 84 (oitenta e quatro) amostras, na profundidade de 0-10 cm.



Figura 3 - Marcação (esquerda) e detalhe do ponto de amostragem de solo sob cultivar de oliveira (direita), na Fazenda Experimental de Maria da Fé – MG

As amostras foram retiradas por meio de enxada, devidamente desinfestada com álcool etílico a 70%. As amostras da rizosfera (Figura 4) foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas aos laboratórios. Todos os atributos microbiológicos foram determinados no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), após peneiramento das amostras de solo em malha de 2 mm.



FIGURA 4 - Amostras de solo da rizosfera de cultivares de oliveira coletadas na área de estudo (esquerda) e acondicionadas sob temperatura de 4°C (direita)

3.3. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas correspondem à avaliação do potencial de inóculo (propágulos) de FMAs. Foram determinados: o comprimento de micélio extrarradicular ativo e total, a porcentagem e intensidade de colonização micorrízica

e a densidade e diversidade (morfortipos) de esporos de FMAs nas respectivas amostras. As etapas do estudo com FMAs podem ser vistas na figura 5.

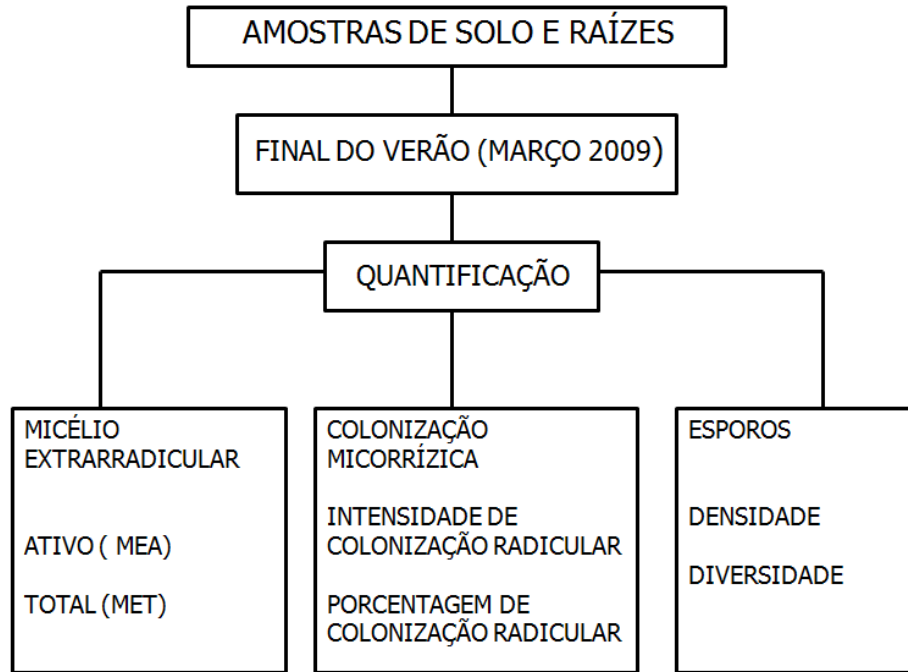


FIGURA 5 - Fluxograma das etapas do estudo das populações de FMAs

3.3.1. Micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET)

Para determinação do comprimento de micélio ativo e total seguiu-se metodologia descrita por Melloni & Cardoso (1999), representada pela figura 6. Primeiramente, peneirou-se uma amostra de 10 g de solo rizosférico (da qual foi determinada a umidade) em peneiras de 0,71 mm e 0,25 mm, com água de torneira, formando-se uma suspensão de 1500 mL. Em seguida, agitou-se a suspensão em liquidificador por 30s na menor rotação, deixando-a posteriormente em repouso por 2 minutos, antes do novo peneiramento de uma alíquota de 500 mL em malha 0,045 mm. As partículas retidas nessa malha foram transferidas, por meio de água destilada, a frasco de penicilina, em volume final de 11 mL. Desse volume, 5 mL foram retirados e adicionados a outros 5 mL de uma solução com diacetato de fluoresceína – FDA (5 mg de FDA em 1 mL de acetona, solução completa com 100 mL de solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4). Incubou-se a suspensão por 5 minutos, à temperatura ambiente, e seguiu-se filtração a vácuo em membrana quadriculada de triacetato de celulose. Uma ocular reticulada (10 x 10 mm) foi

acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon – Eclipse E200) e, pelo método de intersecção das hifas com as linhas horizontais da membrana, foram avaliados o MEA sob luz ultravioleta e MET sob luz comum.

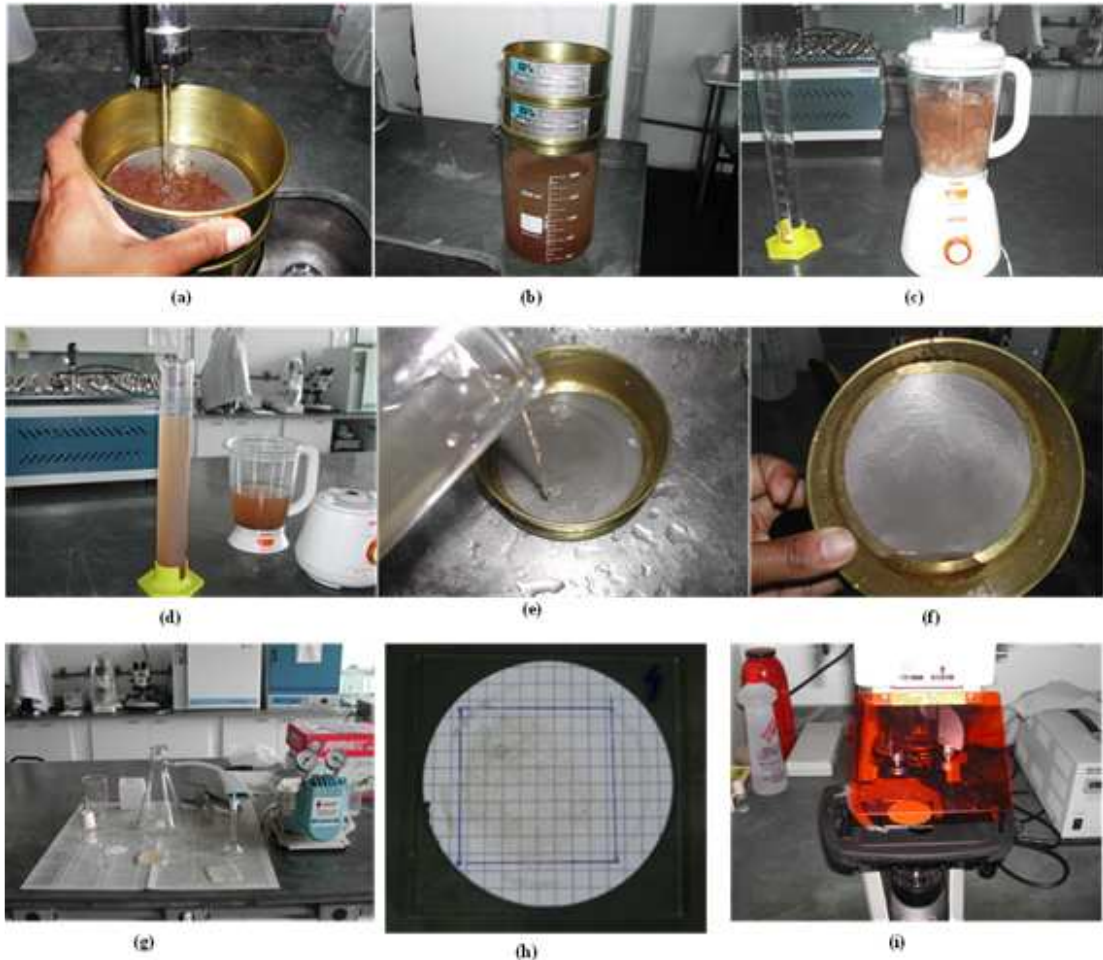


FIGURA 6 - Metodologia de extração e coloração de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares. (a) Lavagem da amostra de solo (rizosfera), (b) Suspensão resultante da lavagem, (c) Suspensão em agitação, (d) Suspensão após agitação (descanso de 2 min), (e) Passagem da suspensão por peneira de 0,045 mm, (f) Coleta de 11 mL de suspensão retida na peneira anterior, (g) Filtração a vácuo em membrana quadriculada e coloração com FDA, (h) Lâmina com membrana quadriculada demarcada 8x8 = 64 campos de contagem, (i) Membrana ao microscópio de epifluorescência

Empregou-se a equação MET ou MEA = $0,21387 * n / (10 - U)$, onde n representa o número de intersecções avaliado e U a quantidade de água na amostra em gramas. O resultado é dado em metros de hifa por grama de solo seco (MELLONI & CARDOSO, 1999).

3.3.2. Intensidade e porcentagem de colonização radicular

Para avaliação da colonização radicular pelos FMAs, as raízes de oliveira foram lavadas em água corrente e imersas em KOH 10% por uma noite. Posteriormente, foram aquecidas e clarificadas (ainda em KOH) em banho-maria a 90°C por um período de 2h. Após clarificação, as raízes foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio (10 volumes), e lavadas em água de torneira. As estruturas fúngicas foram coradas por 1 minuto em solução de tinta de caneta Shiffer (5%) e ácido acético (5%), segundo Vierheilig *et al.* (1998). As raízes coradas foram preservadas em solução de glicerina, ácido láctico e água destilada (1:1:1). A porcentagem de colonização das raízes foi analisada sob microscópio estereoscópico (Nikon – YF100) pelo método da placa quadriculada, segundo Giovannetti & Mosse (1980). Para avaliação da intensidade de colonização radicular, lâminas de microscópio foram montadas contendo 10 segmentos de raiz de aproximadamente 1 cm e analisadas em microscópio óptico (Nikon – Eclipse E200). Foram atribuídas notas de 0 a 100, conforme a ocupação da área radicular pelas estruturas fúngicas (BETHLENFALVAY *et al.*, 1981). A metodologia ilustrada encontra-se na figura 7.



FIGURA 7 - (a) Raízes nos cassetes para coloração, (b) Raízes imersas em KOH, (c) Solução de tinta de caneta e ácido acético (d) Raízes sendo coradas em solução de tinta de caneta e ácido acético, (e) Placa para avaliação de porcentagem de colonização radicular, (f) Lâminas para avaliação da intensidade de colonização radicular

3.3.3. Densidade e diversidade de esporos de FMAs

A extração de esporos seguiu metodologia descrita por Gerdemann & Nicolson (1963) e encontra-se ilustrada na figura 8. Uma porção de 50 g proveniente do solo rizosférico dos cultivares de oliveira em estudo foi lavada por cinco vezes com água de torneira e peneirada em malhas de 0,71 e 0,053 mm. O material retido na última peneira foi transferido com água destilada para tubo de centrifuga e centrifugado a 3000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado e uma solução de sacarose a 70% foi acrescentada, agitando-se a 2000 rpm por dois minutos. Passou-se o sobrenadante por peneira de 0,045 mm e o material retido foi transferido para placa concêntrica para contagem da densidade de esporos (em Lupa, Nikon – YF100) e cálculo da diversidade.



FIGURA 8 - (a) Amostra de solo (50 mL), (b) Lavagem da amostra de solo, (c) Passagem da suspensão pelas peneiras, (d) Material retido na peneira de 0,053 mm, (e) Centrifugação, (f) Tubo de centrifuga com suspensão de solo sobrenadante e solução de sacarose, (g) placa concêntrica para contagem dos esporos em lupa

Para fins de identificação das espécies, os esporos foram primeiramente separados em morfotipos, usando como critérios principais o formato e a cor. Foram montadas lâminas de microscopia em PVLG (polivinil álcool-lactoglicerol) e PVLG/reagente de Melzer (4:1, v:v) que foram vistas em microscópio óptico comum

Nikon. Em seguida foi feita a identificação das espécies, realizada por taxonomistas de FMAs dos laboratórios de Microbiologia do solo da **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ – USP)** e da **Universidade Regional de Blumenau (FURB)**.

Calculou-se a riqueza de espécies por cultivar em cada bloco estudado e o respectivo índice de diversidade de Shannon & Weaver (1949), pela equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

K= igual ao número de esporos de FMAs por espécie e

p_i = abundância relativa dos esporos em cada espécie.

3.4. Análise textural e atributos químicos da rizosfera

Parte das amostras do solo coletadas foi seca em estufa (temperatura de 105°C, por um período de 24 horas) para análise da textura. Para caracterização química, as amostras de solo coletadas foram secas ao ar (por um período de 2 dias), para análise de pH, P, K, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , H+Al, soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica efetiva (t), capacidade de troca catiônica total (T), saturação por bases (V%), saturação por alumínio (m%), teor de matéria orgânica do solo (MO) e teor de fósforo remanescente no solo (P-rem). Todas essas análises foram feitas segundo metodologias descritas em EMBRAPA (1997). Deve-se ressaltar que a textura e os atributos químicos do solo foram determinados com finalidade complementar, de modo a fornecer subsídios para entendimento e esclarecimento àqueles relacionados aos aspectos microbiológicos, tema central dessa dissertação. Os resultados das análises físicas e químicas para as amostras do solo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Atributos físicos e químicos das amostras de solo para os quatro blocos em estudo

	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem	Argila	Silte	Areia
Blocos	H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻¹						%	dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹	g kg ⁻¹			
Bloco I	5,7	211,1	137	3,7	0,9	0,0	4,0	5,0	5,0	8,9	55,3	0	2,7	34,1	90	470	440
Bloco II	5,9	211,1	139	4,1	0,7	0,0	2,9	5,2	5,2	8,1	64,0	0	2,5	36,3	160	470	370
Bloco III	5,5	197,7	117	3,4	0,5	0,1	4,0	4,2	4,3	8,2	51,2	2	2,7	32,0	160	510	330
Bloco IV	5,8	311,1	111	3,9	0,5	0,1	3,2	4,7	4,8	7,9	59,4	2	2,4	33,1	200	450	350

3.5. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos, com exceção de micélio extrarradicular ativo e total, foram transformados para $\arcsen (x+1)^{0,5}$ e submetidos à análise de variância, empregando-se o teste de Duncan a 5 % para comparação das médias entre os cultivares de oliveira. O programa estatístico utilizado foi o Sanest (ZONTA *et al.*, 1984). Os atributos microbiológicos (micélio extrarradicular ativo, micélio extrarradicular total, intensidade de colonização radicular, porcentagem de colonização radicular, densidade de esporos e diversidade de esporos) foram submetidos à análise de correlação por meio do *Excel®* e as significâncias entre as correlações foram testadas a partir da ferramenta de regressão do mesmo *software*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET)

Imagens de micélio extrarradicular ativo e total de FMAs em amostras de solo sob cultivares de oliveira estão apresentadas na Figura 9.

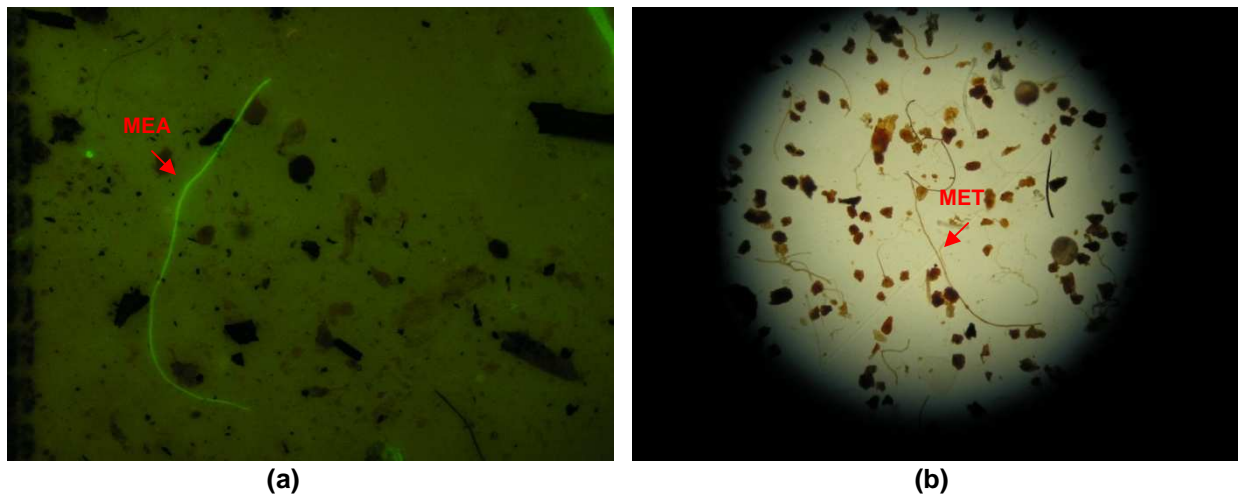


FIGURA 9. Micélio extrarradicular ativo (a) e total (b) de fungos micorrízicos arbusculares, em amostras de solo sob oliveira, no aumento de 100X. Legenda: MEA: Micélio Extrarradicular Ativo e MET: Micélio Extrarradicular Total

O comprimento do micélio extrarradicular ativo (MEA) obtido em amostras de solo rizosférico dos cultivares de oliveira em estudo encontra-se na figura 10. Os valores de MEA variaram de 0,11 a 0,44 m g⁻¹ de solo seco entre os cultivares, sendo que aquele obtido na rizosfera do cultivar Arbequina foi estatisticamente diferente e superior aos dos cultivares: Grappolo 561, Grappolo 575, Leccino e Maria da Fé. Os demais cultivares (Ascolano 315 e Grappolo 541) não diferiram entre si e dos demais quanto ao comprimento de MEA.

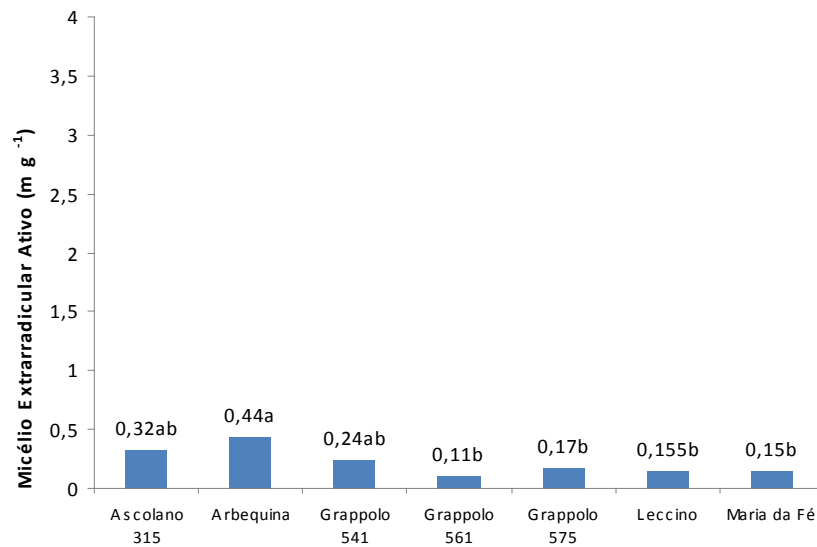


FIGURA 10 - Comprimento de micélio extrarradicular ativo, em m g⁻¹ de solo seco, em amostras de solo da rizosfera de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Duncan 5% de significância

Os valores do comprimento do micélio extrarradicular total (MET) obtido em amostras de solo rizosférico dos cultivares de oliveira em estudo encontra-se na figura 11. Não houve diferença estatística entre os cultivares para o comprimento de MET, com variação de 2,4 a 3,7 m g⁻¹ de solo seco.

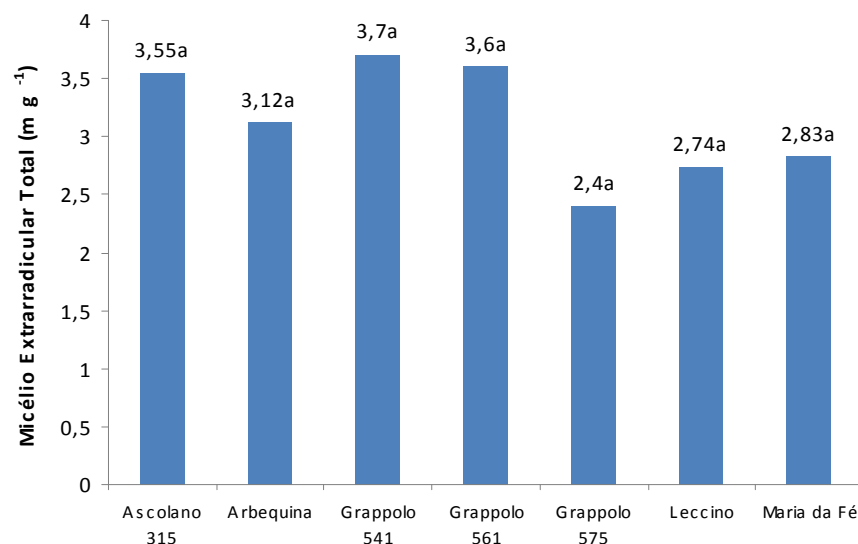


FIGURA 11 - Comprimento de micélio extrarradicular total, em m g⁻¹ de solo seco, em amostras de solo da rizosfera de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Duncan 5% de significância

Verificou-se uma grande diferença entre os valores de MEA (Figura 10) e MET (Figura 11), sendo o comprimento do micélio ativo inferior ao total. A relação entre MEA e MET pode ser vista na figura 12. Os valores variaram de 3,0% no cultivar Grappolo 561 a 14,0% no cultivar Arbequina, o que mostra que além de valores menores observados para MEA, houve também uma variação na proporção entre as estruturas. Os valores inferiores encontrados para MEA quando comparados ao MET concordam com aqueles observados por Melloni *et al.* (2000), em estudos de avaliação da influência do fósforo e de FMAs em limoeiro-cravo, onde o comprimento de MEA variou de 0,5 a 1,0 m e de MET de 6 a 12 m g⁻¹ de solo. No entanto, no presente trabalho com oliveira, os valores observados para MEA (0,11 a 0,44 m g⁻¹ de solo) e MET (2,40 a 3,70 m g⁻¹ de solo) foram muito inferiores.

Valores maiores para MET em comparação com MEA são esperados já que do total de micélios extrarradiculares produzidos pelo fungo, somente parte está ativa, absorvendo e translocando nutrientes para à planta.

Esses foram os primeiros dados de MEA e MET de FMAs para oliveira, não havendo outros dados na literatura para comparação dos resultados obtidos.

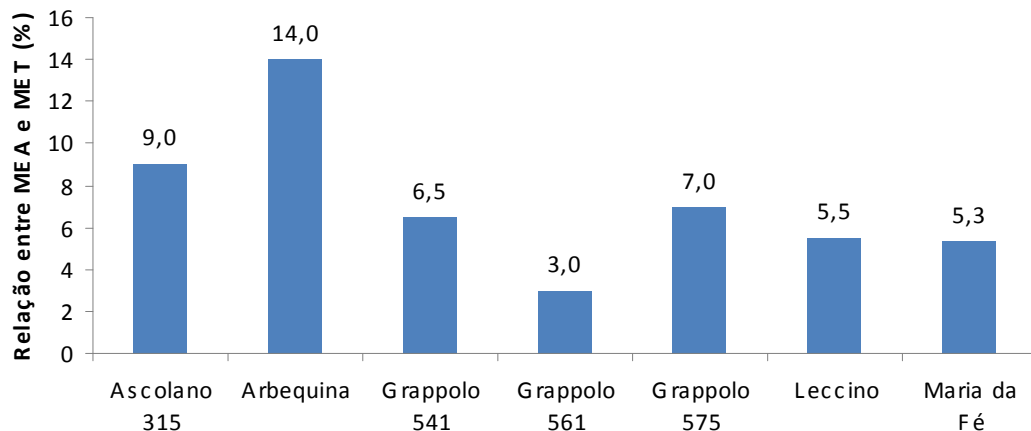


FIGURA 12 - Relação entre comprimento de micélio extrarradicular ativo e total em diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo

Em estudos com outras espécies vegetais, como o de Metzner (2009), que avaliou o emprego de substratos orgânicos adubados com diferentes doses de Cu para obtenção de mudas micorrizadas de limoeiro Cravo, foram observados valores para o comprimento do MET do fungo *Glomus intraradices*, de 1,32 a 2,95 em substrato com pinus, 1,61 a 6,23 em fibra de coco, e 4,12 a 10,38 m g⁻¹ de solo em turfa. Portanto, os valores de MET obtidos para o substrato pinus foram menores

aos de oliveira, enquanto aqueles dos outros substratos foram superiores aos encontrados no presente estudo.

4.2. Intensidade e porcentagem de colonização radicular

Não havia registros fotográficos de colonização micorrízica em oliveiras, no Brasil. Todas as amostras de raízes de oliveira que foram analisadas apresentaram colonização intrarradicular por FMAS. Dentre as estruturas visualizadas, as hifas intercelulares e intracelulares, esporos e vesículas foram as mais comuns (figura 13).

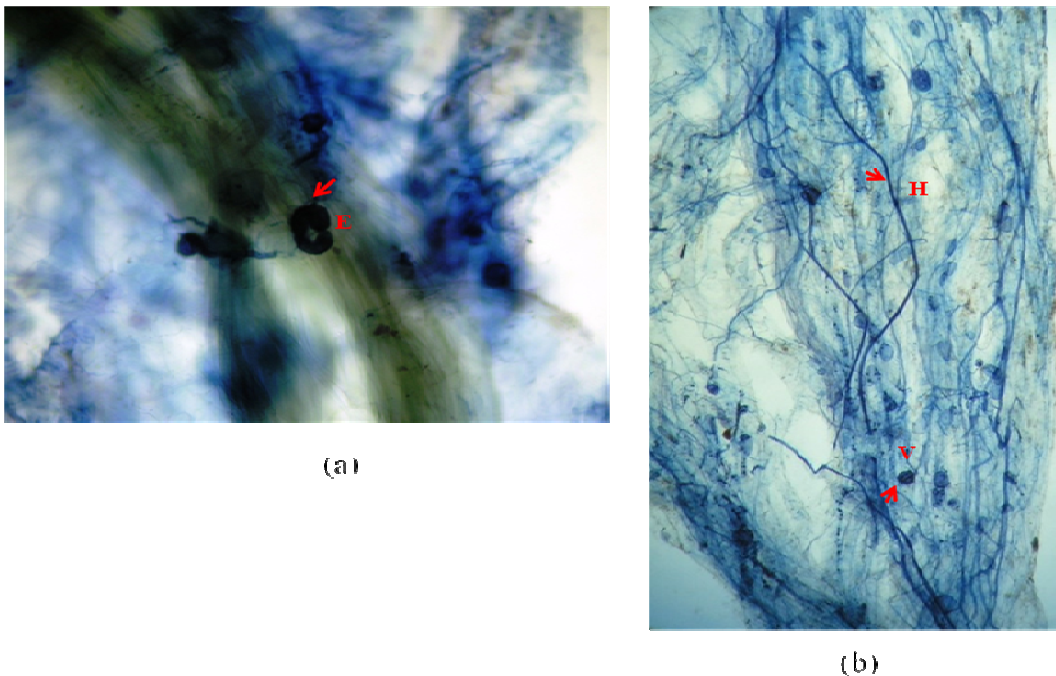


FIGURA 13 - Colonização micorrízica em oliveira (a e b). Legenda: E – Esporos; H – Hifas inter e intracelulares; V – Vesículas

A taxa de intensidade de colonização radicular variou de 23,6% a 32,2% e não foi significativamente diferente entre os cultivares, como pode ser visto na figura 14.

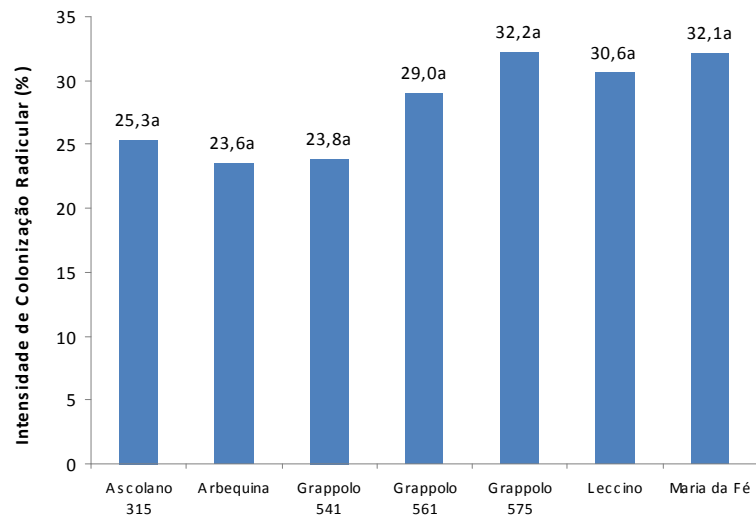


FIGURA 14 - Intensidade de colonização radicular (%) em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Duncan 5% de significância

Resultados para intensidade de colonização radicular, em escala de porcentagem, também podem ser vistos na figura 15.

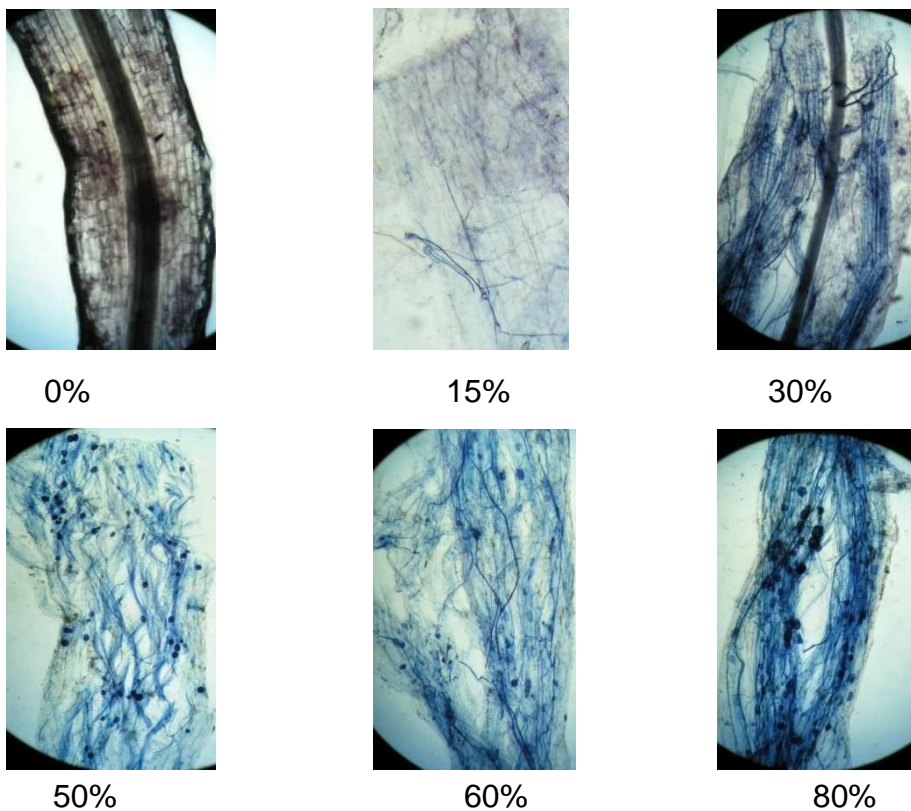


FIGURA 15 - Intensidade de colonização radicular (em porcentagem), no aumento de 100X, em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo

Também não houve diferença significativa entre os cultivares para porcentagem de colonização radicular, como observado na Figura 16, com variação entre 1,21% a 5,83%, valores considerados baixos.

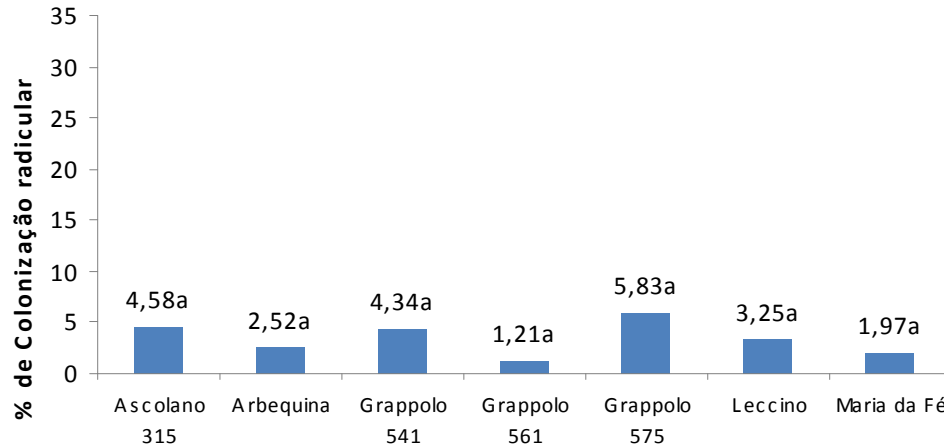


FIGURA 16 - Porcentagem de colonização radicular em amostras de raízes de diferentes cultivares de oliveira, na área de estudo. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Duncan 5% de significância

Apesar da ausência de diferenças significativas para ambos os métodos de quantificação da colonização micorrízica, quando comparado com a intensidade de colonização radicular (Figura 15), a porcentagem de colonização (Figura 16) apresentou valores inferiores. Esse resultado pode estar relacionado às diferenças metodológicas de observação e quantificação da colonização, onde a intensidade de segmentos radiculares é observada sob microscópio e a colonização por lupa em placa quadriculada. A maioria das raízes da oliveira depois de coradas apresentou-se muito escuras, o que dificultou a observação da colonização em microscópio estereoscópico, em lupa. Para contornar essa dificuldade, sugere-se que se aumente o tempo de clarificação em KOH, que no presente trabalho foi de 12 horas em temperatura ambiente (pernoite) e 2 horas em banho-maria a 90°C. Em vista disso, a porcentagem de colonização radicular pode ter sido subestimada em relação à intensidade de colonização, cuja metodologia permite uma melhor visualização e avaliação sob microscópio óptico (maior aumento e melhor observação). Portanto, recomenda-se que, para avaliação da colonização radicular

de oliveira, adaptações sejam feitas na metodologia de Giovanetti & Mosse (1980) ou se dê preferência para a determinação da intensidade de colonização radicular.

Em oliveiras, Porrás-Piedra *et al.* (2005), ao estudarem a influência de FMAs no crescimento de plantas jovens, obtiveram resposta positiva da inoculação ao testar três espécies de fungos do gênero *Glomus*. Utilizando as mesmas metodologias vistas no presente trabalho para coloração das raízes e avaliação da colonização micorrízica, os pesquisadores encontraram 100% de colonização nas plantas inoculadas. Castilho *et al.* (2006), em estudos da influência de FMAs no controle de nematóides, encontraram colonização para o cultivar Arbequina, inoculado com diferentes espécies de FMAs, variando de 78% a 94,6%. Ressalta-se que os trabalhos supracitados para oliveira foram realizados em condições controladas, ao contrário do presente trabalho, que foi desenvolvido em condições de campo, os quais, normalmente, apresentam resultados inferiores (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; CÓRDOBA *et al.*, 2002).

Não há estudos publicados na literatura nacional que relacionam colonização micorrízica em oliveira. Pela ausência de dados relativos à micorrização em oliveira, uma breve comparação com algumas culturas perenes será apresentada, mesmo sabendo-se que há variação de micorrização entre diferentes hospedeiros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Comparativamente a outras culturas perenes, Silva Júnior & Cardoso (2006) avaliaram a colonização micorrízica arbuscular em pupunha e cupuaçu cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo (com adubação e em condições de campo) e obtiveram valores de 13,41% a 32,95%, próximos aos observados para intensidade de colonização e acima dos valores de porcentagem de colonização para oliveira, nesse trabalho.

Em trabalho que objetivou avaliar os efeitos da inoculação de FMAs no crescimento e absorção de nutrientes de mudas de cafeeiro Catuaí, em substrato com e sem adição de esterco de curral e adubado com doses crescentes de superfosfato simples, Souza *et al.* (1991) encontraram valores de colonização micorrízica em substrato sem matéria orgânica variando de 36,55% a 53,49% e em substrato com matéria orgânica variando de 38,94% a 51,57%. Da mesma forma, Balota & Lopes (1996), verificando a flutuação sazonal de espécies de FMAs associados a cafeeiros, encontraram valores para colonização micorrízica variando de 32% a 39%, superiores aos obtidos para colonização micorrízica (porcentagem e intensidade) em oliveiras no presente estudo. No entanto, Bonfim *et al.* (2007), em

estudos que avaliaram a colonização de FMAs em raízes de cafeeiro cultivado em sistema agroflorestal e a pleno sol, em duas épocas do ano, encontraram valores para porcentagem de colonização radicular de 14,50% a 28,66%, valores menores que a faixa encontrada em oliveiras para intensidade de colonização radicular que foi de 23,6% a 32,2%.

De acordo com Silveira & Freitas (2007), em cafeeiros adultos sob condições de campo, a colonização micorrízica apresenta valores bastante variados, de 4% a 80%. Uma das causas de variações tão grandes está nas diferentes condições de obtenção dos dados e pelo fato de que em situações de campo é difícil estudar as correlações entre fatores edáficos e a colonização radicular, em virtude do grande número de complexas interações envolvidas.

4.3. Densidade e diversidade de esporos

A densidade de esporos de FMAs no solo rizosférico dos cultivares de oliveira é apresentada na figura 17. Não houve diferença significativa (Duncan $p > 0,05$) na densidade de esporos para os sete cultivares estudados, sendo que o número médio de esporos por 50 g de solo variou de 12,01 no cultivar Arbequina a 32,5 no cultivar Ascolano 315.

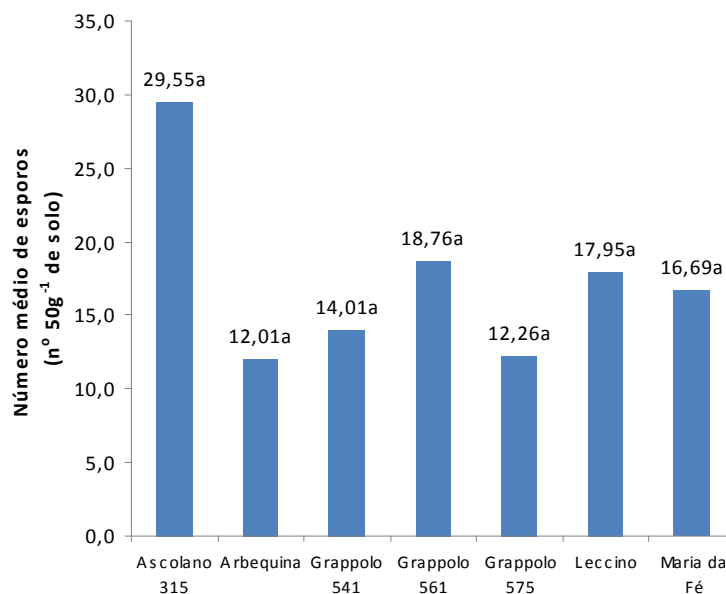


FIGURA 17 - Número médio de esporos por 50 g de solo, por cultivar, nos blocos estudados. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Duncan 5% de significância

Como já comentado para colonização micorrízica, são poucos os estudos publicados na literatura que relacionam densidade e diversidade de esporos de FMAs em solo rizosférico de oliveiras. Pela ausência de dados relativos à esporulação em oliveira, a comparação dos resultados obtidos será feita com algumas culturas perenes. No entanto, deve-se enfatizar que as condições edáficas e climáticas interferem na formação desses propágulos e, como os experimentos são diferentes, as comparações devem sempre ser feitas com ressalvas.

Avaliando o efeito de duas formas de manejo, convencional e orgânico em pomares e viveiros de citros, Fochhi *et al.* (2004) observaram número médio de esporos variando de 12,2 a 15,3 (50 g^{-1} de amostra de solo), número inferior à faixa observada para o presente trabalho com oliveiras. Já Colozzi Filho & Cardoso (2000) obtiveram valores mais altos para densidade de esporos de FMAs, em raízes de cafeeiro com crotalaria na entrelinha (62 a 135 esporos 50 g^{-1} de amostra de solo). Número médio de esporos superior ao observado para oliveiras também foi obtido por Silva Júnior & Cardoso (2006), ao avaliarem FMAs em pupunha e cupuaçu cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo (média de 42 a 120 esporos 50 g^{-1} de amostra de solo).

Verificando a influência da arborização do cafezal (*C. canephora*) sobre a população de FMAs, Costa *et al.* (2007) encontraram número de esporos para os diferentes tratamentos (com pinho cuiabano, com teca, com bandarara, cafeeiro solteiro) variando de 120 a 250 esporos por 100 g de amostra de solo, valores mais altos que os observados para o presente trabalho em 50 g de amostra de solo rizosférico de oliveira.

Dentre os esporos, foram recuperados os gêneros e espécies de FMAs relacionados na Tabela 3, nos diferentes cultivares de oliveira.

De acordo com Costa *et al.* (2007), o conhecimento da diversidade das populações de FMAs, bem como seu papel e interações com o meio abiótico, são requisitos básicos para o estabelecimento capaz de permitir o aumento no crescimento de plantas. A sobrevivência e persistência de espécies fúngicas importantes ou comprovadamente eficientes em um determinado ambiente ou rizosfera são de extrema importância e mostram que os efeitos benéficos da simbiose devem ser considerados e incentivados quando do manejo agrícola e ambiental de culturas de interesse.

Tabela 3. Tabela 3. Gêneros e espécies de FMAs por cultivar, recuperados do solo rizosférico de oliveira

CULTIVAR	GÊNEROS/ESPÉCIES DE FMAs
Ascolano 315	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Gigaspora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Arbequina	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Grappolo 541	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Grappolo 561	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Gigaspora</i> sp1, <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Grappolo 575	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Leccino	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Gigaspora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1
Maria da Fé	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Acaulospora</i> sp1, <i>Acaulospora</i> sp2, <i>Entrophospora</i> sp1, <i>Gigaspora</i> sp1, <i>Glomus mosseae</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> e <i>Scutellospora</i> sp1

Alguns exemplares dos esporos obtidos no solo rizosférico de oliveira são mostrados na figura 18, enquanto o percentual de distribuição dos oito morfotipos está representado na figura 19.

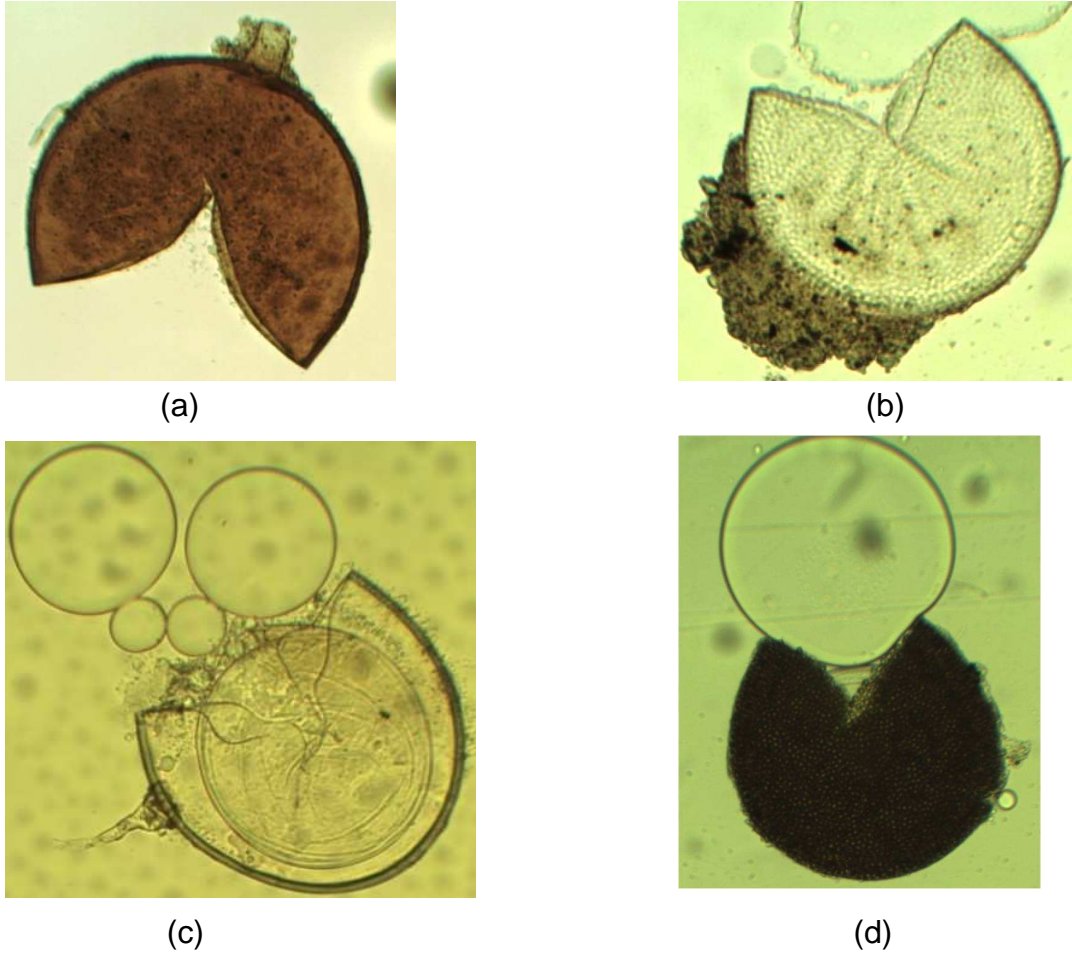


FIGURA 18 – Exemplos de esporos de FMAs coletados das amostras de solo sob cultivo de oliveiras. (a) *Glomus* sp.; (b) *Scutellospora* sp.; (c) *Acaulospora* sp.1 e (d) *Acaulospora* sp. 2

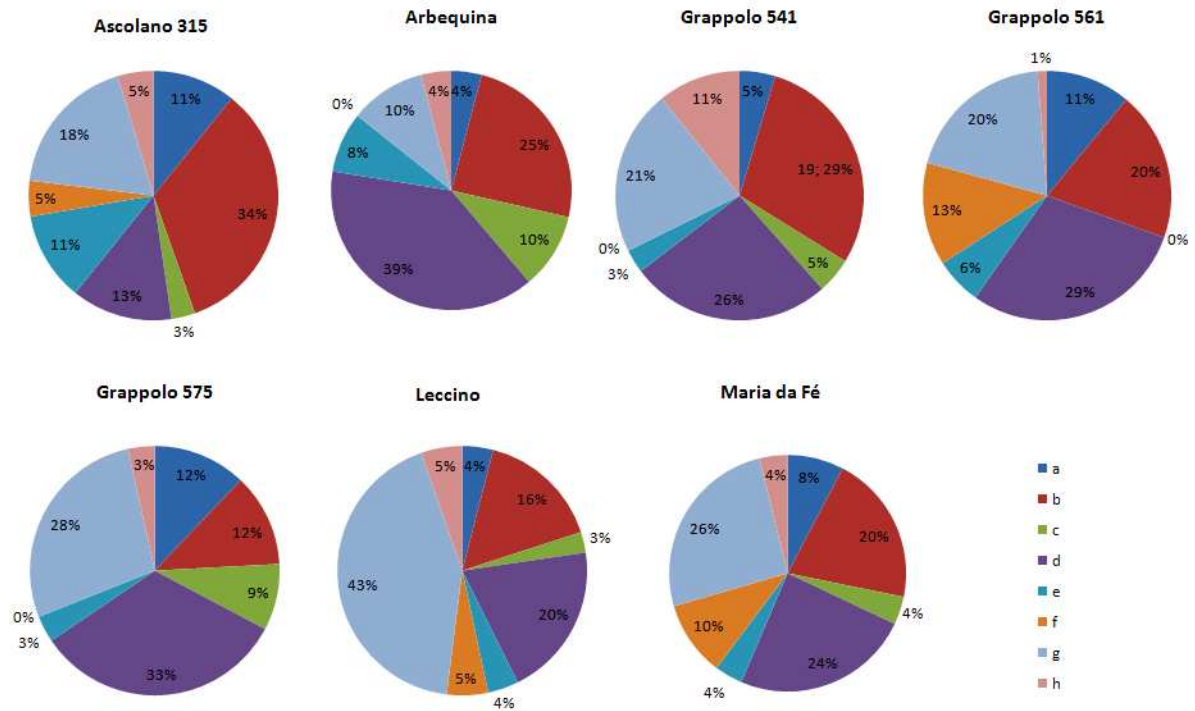


FIGURA 19 – Morfotipos de fungos micorrízicos arbusculares nos cultivares de oliveira

O morfotipo f não esteve presente nos cultivares: Arbequina, Grappolo 541 e Grappolo 575 e o morfotipo c ausente no cultivar Grappolo 561. Observa-se que no cultivar Ascolano 315 o morfotipo de maior ocorrência foi o b, seguido pelo morfotipo g. Nos cultivares: Arbequina e Grappolo 541, a maior densidade de esporos foi vista para o morfotipo d, seguido pelo morfotipo b. No cultivar Grappolo 561 o morfotipo d apresentou maior ocorrência, seguido dos morfotipos b e g. O cultivar Grappolo 575 também apresentou maior número de esporos do morfotipo d, seguido do morfotipo g. O morfotipo g predominou no cultivar Leccino que também apresentou grande ocorrência de esporos do morfotipo d. Da mesma forma, no cultivar Maria da Fé houve também domínio do morfotipo g, seguido pelo morfotipo b.

De maneira geral, houve domínio de três morfotipos principais, os morfotipos b, d e g. Conforme Melloni *et al.* (2003), os esporos cujos morfotipos foram predominantes podem indicar que essas espécies de FMAs possuem mecanismos especiais de adaptação para suportarem às variações dos fatores bióticos e abióticos, com baixa especificidade quanto ao hábitat e por isso predominam nos solos avaliados. Já os morfotipos que ocorreram com pouca frequência podem indicar espécies de FMAs com exigências mais específicas de hospedeiro-ambiente, sendo menos frequentes nos solos estudados. Pela distribuição do número de esporos por morfotipo, calculou-se o índice de diversidade de Shannon-Weaver na rizosfera de cada cultivar (Shannon & Weaver, 1949), cujos resultados estão na figura 20.

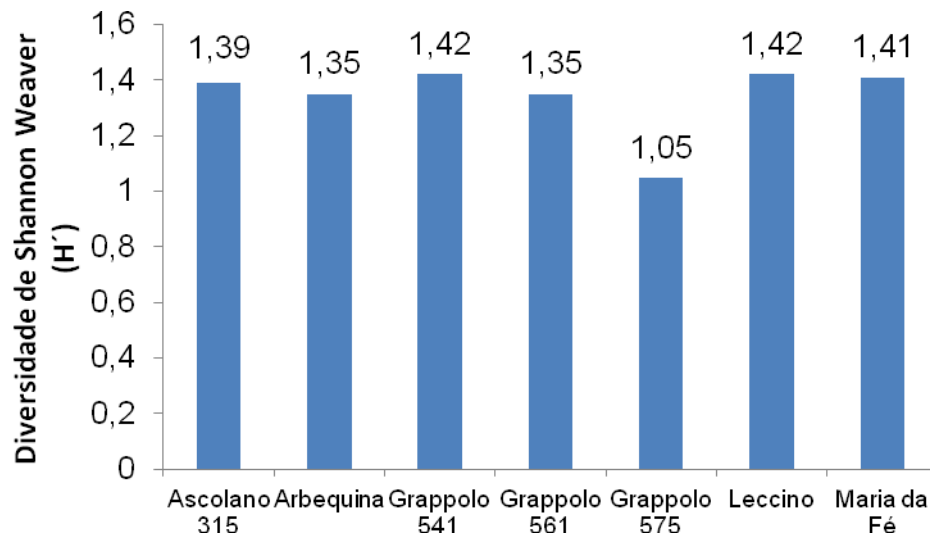


FIGURA 20 - Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') calculado pelos morfotipos de FMAs por cultivar de oliveira

Os resultados do Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') mostram que, exceto para o cultivar Grappolo 575, que apresentou menor diversidade de FMAs, os valores de H' para os demais cultivares foram semelhantes, com valor médio de 1,39. A baixa diversidade de FMAs na cultivar Grappolo 575 está relacionada ao menor número de morfotipos (ausência do morfotipo f) e dominância de outros (morfotipos d e g). No entanto, essa menor diversidade não comprometeu a micorrização do cultivar e nem o potencial de inóculo avaliado.

Das 15 correlações feitas com os atributos microbiológicos em estudo (micélio extrarradicular ativo, micélio extrarradicular total, porcentagem de colonização,

intensidade de colonização, densidade de esporos e diversidade de esporos), sete foram significativas a 5% (*) e serão apresentadas. O micélio extrarradicular ativo (MEA) apresentou a maior correlação negativa com intensidade de colonização radicular ($r = -0,79^*$), seguido de micélio extrarradicular total (MET) e intensidade de colonização radicular ($r = -0,73^*$). A maior correlação positiva foi obtida entre micélio extrarradicular total (MET) e diversidade de esporos ($r = 0,58^*$), como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Correlação entre os atributos microbiológicos em estudo: micélio extrarradicular ativo (MEA), micélio extrarradicular total (MET), porcentagem de colonização (% Col.), intensidade de colonização (Int. Col.), densidade de esporos (Dens. Esp.) e diversidade de esporos (Div. Esp.)

	MEA	MET	% Col.	Int. Col.	Dens. Esp.	Div. Esp.
MEA	-	0,23	0,15	-0,79*	0,02	0,13
MET	0,23	-	-0,26	-0,73*	0,42*	0,58*
% Col.	0,15	-0,26	-	-0,04	0,02	-0,55*
Int. Col.	-0,79*	-0,73*	-0,04	-	-0,12	-0,41*
Dens. Esp.	0,02	-0,42*	-0,02	-0,12	-	0,37*
Div. Esp.	0,13	0,58*	-0,55*	-0,41*	0,37*	-

(*) Significância a 5%.

O comprimento de micélio extrarradicular total (MET) foi o atributo que apresentou maior número de correlações significativas com os demais atributos microbiológicos estudados. O MET apresentou correlação significativa negativa com a intensidade de colonização radicular, e positiva com densidade e diversidade de esporos.

A correlação negativa entre MET e intensidade de colonização indica que quanto maior a quantidade de hifas de FMAs no solo (dado pelo comprimento de micélio extrarradicular total) menor a quantidade de hifas de FMAs no interior das raízes (medida pela intensidade de colonização radicular), o que sugere que o crescimento de micélio extrarradicular total, para esse caso, independe da colonização interna da raiz pelos FMAs. A correlação positiva entre MET e densidade e diversidade de esporos indica que, para o presente estudo, o

comprimento de micélio externo apresenta relação de proporcionalidade com a quantidade e diversidade de esporos no solo rizosférico.

O comprimento de MEA, assim como ocorreu com o MET, apresentou correlação negativa significativa com intensidade de colonização radicular, o que indica que o número de hifas ativas do solo, capazes de absorver e translocar nutrientes, está inversamente relacionado à colonização interna, crescendo independentemente da mesma.

Entre as estruturas de FMAs, o micélio extrarradicular é o que apresenta maior extensão e biomassa (MELLONI & CARDOSO, 1999) e a correlação significativa com esses propágulos demonstra a complexidade da formação dos propágulos, regulada por influências biológicas, edáficas e ambientais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A diversidade de espécies de FMAs tem correlação positiva e significativa com o número de esporos encontrados (densidade), e quanto maior o número de esporos maior a riqueza. A diversidade de esporos também apresentou correlação significativa positiva com a presença de hifas de FMAs (MET) e negativa com a quantidade de hifas do fungo dentro da planta (intensidade de colonização radicular), e quanto maior a diversidade de esporos no solo rizosférico menor a porcentagem e intensidade de colonização radicular. Nesse contexto, Azevedo (2008) considera que não se sabe se as espécies mais abundantes detectadas no solo, por meio da identificação com base na morfologia dos esporos assexuais, são também as mais abundantes no interior das raízes, devido às dificuldades para identificação dos FMAs nessa região.

Pela homogeneidade de distribuição dos propágulos de FMAs na rizosfera e raízes dos diferentes cultivares de oliveira, na Fazenda Experimental de Maria da Fé, pode-se inferir que isso se deve, provavelmente, à homogeneidade do manejo do solo aplicado (fertilidade) e à baixa diversidade genética dos cultivares, apesar das diferentes origens (Tabela 1), reduzindo a interferência do hospedeiro na formação e funcionalidade desses propágulos. Nesse sentido, há vários estudos realizados no exterior sobre a diversidade genética de cultivares de oliveira e alguns revelam a importância da origem e do efeito da região agroecológica de cultivo (GEMAS *et al.*, 2004), e outros confirmam a semelhança genética entre os cultivares (MARTINS-LOPES *et al.*, 2006; CORDEIRO *et al.*, 2008), a existência de clones entre os

cultivares (RONY *et al.*, 2009) e a necessidade de garantir a diferença entre os cultivares para fins de certificação (GOMES *et al.*, 2009).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cultivares: Ascolano 315, Arbequina, Grappolo 541, Grappolo 561, Grappolo 575, Leccino e Maria da Fé, da espécie exótica *Olea europaea* L. (oliveira) formam associação com fungos micorrízicos arbusculares nativos nas condições ambientais estudadas no Brasil, sendo obtidos 5 gêneros e 9 espécies.

Os propágulos de fungos micorrízicos arbusculares estão homoganeamente distribuídos nas proximidades da rizosfera dos cultivares estudados, sem diferença significativa entre micélio extrarradicular total, densidade e diversidade de esporos e colonização radicular.

Recomenda-se, após a presente avaliação do *status* micorrízico dos cultivares de oliveira da Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF–EPAMIG), estudos com os mesmos cultivares instalados em outros locais e outros relacionados à certificação dos cultivares e à eficiência de populações de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas, em condições controladas e em campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. S. **Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose.** ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2007. 187 p. Dissertação (Doutorado).

AZEVEDO, L. C. B. **Comunidades de Fungos Micorrízicos Arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar.** ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2008. 110f. Dissertação (Doutorado).

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S. Introdução de Fungos MA no cafeeiro em condições de campo. II – Flutuação Sazonal dos fungos associados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** Campinas, v. 20, n. 2, p. 225-232, 1996.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F.A. de; FONSECA, H. M. A. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição.** Nutrição Mineral de Plantas. 1 ed. Viçosa: SBCS, v. 3, p. 53-88. 2006.

BETHLENFALVAY, G.J; PACOVSKY, R.S.,BROWN, M.S. Measurement of mycorrhizal infection in soybeans. **Soil Science of Society American Journal,** Madison, v.45, p.871-875, 1981.

BINET, M. N.; LEMOINE, M.C.; MARTIN, C.; CHAMBON, C.;GIANINAZZI, S. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. **Plant,** 2007.

BONFIM, J. A.; MATSUMOTO, S. N.; FREITAS, G. B. de SANTOS, R. H. S.; CÉSAR, F. R. C. F.; RESENDE, L. de A.; SANTOS, M. A. F.; SOUZA, A. J de J. Fungos Micorrízicos Arbusculares em cultivo de figo com adição de composto orgânico (BOKASHI) em Viçosa – MG. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura/54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008, VITÓRIA. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008.**

BONFIM, J. A.; MATSUMOTO, S.N.; MIGUEL, D. L.; SANTOS, M A.F.; CÉSAR, F. R.C.F.; ARAÚJO, G. S.; GUIMARÃES, M. M. C.; COELHO, R.A.; LIMA, J. M.; LEMOS, C.L.; SOUZA, A.J. de J. Determinação da densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiros cultivados em sistema agroflorestal e a pleno sol, no município de Vitória da Conquista, Bahia. **Revista Brasileira de Agroecologia,** v. 2, n.2, p. 727-730, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 01 maio 2010.

CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; BAREAB, J.M.; ROLDÁN, A. Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 227–233. 2005.

CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; PALENZUELA, J.; FIGUEROA, D.; ALGUACIL, M.M.; ROLDÁN, A. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 103–111. 2003.

CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; FIGUEROA, D.; ROLDÁN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, v. 20, p.107–118. 2002.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A.C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). **Pesquisa Agropecuária Tropical (UFG)**, Goiânia - GO, v. 34, n. 3, p. 119-126, 2004.

CASTILHO, P.; NICO, A. L.; AZCÓN-AGUILAR, C.; CALVET, C.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Pathology**, v.55, p. 705–713, 2006.

COLOZZI FILHO, A. & CARDOSO, E. J. B. N..Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.2033-2042, out. 2000.

CORDEIRO, A.I.; SANCHEZ-SEVILLA, J.F.; ALVAREZ-TINAUT, M.C.; GOMEZ-JIMENEZ, M.C. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. **Biologia Plantarum**, v.52, n.4, p.642-647, 2008.

CORDOBA, A. S. ; MENDONÇA, M. ; ARAÚJO, E. F. Avaliação da Diversidade Genética de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Três Estádios de Estabilização de Dunas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, n.4, p.931-937, 2002.

COSTA, R. S. C. da; CARMO, L. A.; CAMPELO, K. O. **Ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2007. Disponível em: <<http://www.iamazonica.org.br/conteudo/eventos/biodiversidadeSolo/pdf/RogérioLucianaKeyla.pdf>>. Acesso em: 22 março, 2010.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212p.

FOCCHI, S.S. ; DAL SOGLIO, F.K. ; CARRENHO, R.; SOUZA, P.V.D. ; LOVATO, P.E.Fungos Micorrízicos Arbusculares em Cultivos de Citros sob Manejo Convencional e Orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.5, p.469-476, 2004.

FRANÇA, S. C. **Comunidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares nos manejos convencional e orgânico de citros e suas interações com *Phytophthora parasítica***. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2004. 106 p. Dissertação (Doutorado).

GEMAS, V.J.V.; ALMADANIM, M.C.; TENREIRO, R.; MARTINS, A.; FEVEREIRO, P. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, n.5, p.501-511, 2004.

GERNDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n.2, p. 235-244, 1963.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500. 1980.

GOMES, F. W. F.; DIAS, F.C.; ZATORRE, N. P.; OLIVEIRA, C.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; BERBARA, R.L.L. Efeitos da aplicação de um resíduo industrial orgânico nos Fungos Micorrízicos Arbusculares. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 09, 2007, Caxambu – MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, setembro, 2007, Caxambu – MG**

GOMES, S.; P. MARTINS-LOPES, P.; LOPES, J.; GUEDES-PINTO, H. Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.27, n.3, p.365-373, 2009.

GOMIDE, P. H. O. ; SANTOS, J.G.D ; Siqueira, J.O. ; [SOARES, C. R. F. S.](#) Diversidade e Função de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Sucessão de Espécies Hospedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online)**, v. 44, p. 1483-1490, 2009.

KIRIACHEK, S. G. **Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar**. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2008. 94 p. Dissertação (Doutorado).

MACHINESKI, O. ; LEONEL, L. V.; SILLA J M; MARUR, C. J. ; SOUZA, J. R. P.; BALOTA, E. L. Resposta da mamoneira a fungos micorrízicos arbusculares e a doses de fósforo. In: III Congresso Brasileiro de Mamona, 2008, Salvador - BA. **III Congresso Brasileiro de Mamona - Energia e Ricinoquímica - ANAIS**, 2008.

MARTINS-LOPES, P.; LIMA-BRITO, J.; GOMES, S.; MEIRINHOS, J.; SANTOS, L.; GUEDES-PINTO, H. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, n.1, p.117-128, 2007.

MEDDAD-HAMZA, A. ; BEDDIAR, A.; GOLLOTTE, A.; LEMOINE, M. C.; KUSZALA, C.; GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. **African Journal of Biotechnology** . vol. 9, n.8, p.1159-1167, 2010.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N.. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 1, p. 53-58, 1999.

MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck]. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, n.4, p.767- 775, 2000.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 2, p. 267-276, 2003.

METZNER, A.F.M. **Aplicação de cobre em substratos orgânicos para a produção de mudas de limoeiro “cravo” associadas a Fungo Micorrízico Abuscular**. IAC – Instituto Agrônomo de Campinas. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado).

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.

OLIVEIRA, A. F.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da Oliveira (*Olea europaea* L). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 231, n. 27, p. 13-17, 2006.

[OLIVEIRA, A. F.](#); PÁDUA, J. G. **Cultura da Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002.

[OLIVEIRA, A. F.](#); VIEIRA NETO, J.; [OLIVEIRA, D. L. de](#). **Diferentes substratos e volumes de recipientes, na produção de mudas de oliveira (*Olea europaea* L.)**. (Apresentação de Trabalho/Congresso), 2007.

PORRAS PIEDRA, A.; SORIANO MARTÍN, M.L.; PORRAS SORIANO, A.; FERNÁNDEZ IZQUIERDO, G. Influence of arbuscular mycorrhizas on the growth rate of mistpropagated olive plantlets. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 3, n.1, p. 98-105, 2005.

RAPOPORT, H. F. Botánica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, RALLO, L (Ed.). **El cultivo del olivo**. 2.ed. rev. y amp. Servilha: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía/Madrid: Mundi-Prensa, 1998. p.35-60.

RONY, C.; BAALBAKI, R.; KALAITZIS, P.; TALHOUK, S.N. Molecular characterization of Lebanese olive germplasm. **Tree Genetics & Genomes**, v.5, n.1, p.109-115, 2009.

RUSSOMANNO, O. M. R. ; KRUPPA, P. C. ; MINHONI, M. T. A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de plantas de alecrim e manjeriço. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, p. 37-43, 2008.

SANTOS-ANTUNES, A.F. **As micorrizas e o crescimento das plantas: o caso da oliveira**. Estação Nacional de Melhoramento de Plantas - Departamento de Olivicultura. Melhoramento, Elvas, v. 38, p. 223-230, 2002.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois, 1949.

SILVA JUNIOR, J. P. CARDOSO, E. J. B.N. Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo na Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.819-825, 2006.

SILVEIRA, A. P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agrônomo. Campinas, SP, 2007.

[SOUZA, C. A. S.](#); SIQUEIRA, J. O. ; OLIVEIRA, E.; [CARVALHO, J. G.](#) Crescimento e nutrição de mudas de cafeeiro micorrizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1989-2005, 1991.

SOUZA, S. L. **Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2006. 100 p. Dissertação (Doutorado).

STÜRMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; SOUZA, F.A.; KASUYA, M.C.M. "Além das raízes": o papel dos fungos micorrízicos. **Boletim Informativo da SBCS**, janeiro – abril, p.30-32. 2009.

VIEIRA NETO, J.; [OLIVEIRA, A. F. de](#); OLIVEIRA, N. C.; DUARTE, H. S. S.; GONCALVES, E. D. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. 1.ed. Belo Horizonte: EPAMIG, v.1. p.10 -14, 2008.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A. P.; WYSS, U.; PICHÉ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, p. 5004–5007, 1998.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. & SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST)**. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1984. 151p.

ZSÖGÖN, A. **Análise do desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado).