

INOCULAÇÃO EM SOJA COM *Rhizophagus clarus* PRODUZIDO EM SISTEMAS DE CULTIVO EM VASO E *in vitro*

Aline de Liz Ronsani Malfatti¹, Sonia Purin da Cruz^{2*}

SAP 21682 Data do envio: 06/02/2019 Data do aceite: 08/04/2019
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 18, n. 3, jul./set., p. 244-250, 2019

RESUMO - A inoculação de culturas agrícolas com fungos micorrízicos arbusculares é uma prática agronômica promissora, que tem sido fortalecida pela recomendação de inoculantes recém-registrados no Brasil. A necessidade de entendimento de efeitos de diferentes formulações de inoculantes é, portanto, um aspecto fundamental para pesquisas de caráter básico e aplicado. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de inóculo do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* cultivado no sistema de cultivo em vaso em relação ao sistema *in vitro* e testar o efeito de ambos no crescimento e produtividade da soja. O potencial de inóculo foi testado em condições de casa de vegetação, utilizando-se o milho como hospedeiro. Os valores de colonização radicular revelaram que o potencial de inóculo foi 7% maior no sistema *in vitro*. Para avaliar os efeitos de ambos inoculantes, um experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, contendo 3 tratamentos e 6 repetições. O inóculo produzido *in vitro* aumentou todos os parâmetros de nodulação, porém não alterou a massa e nitrogênio da parte aérea de plantas de soja. A produtividade, por outro lado, foi 20% maior com o uso de inóculo produzido em vaso. O sistema em vaso é a técnica de produção de inoculante de FMA mais promissora para plantas de soja, considerando possíveis ganhos de produtividade.

Palavras-chave: *Glycine max* L., fungos micorrízicos arbusculares, inoculantes, produtividade.

INOCULATION OF SOYBEAN WITH *Rhizophagus clarus* PRODUCED IN POT AND *in vitro* SYSTEMS

ABSTRACT - Inoculation of agronomic crops with arbuscular mycorrhizal fungi is a promising agronomic practice, which has been solidified by recommendation of recently-registered inoculants in Brazil. The need to understand effects of different inoculant formulations is, therefore, a fundamental aspect for basic and applied research. The aim of this study was to evaluate inoculum potential of the arbuscular fungus *R. clarus* cultivated in a pot culture system compared to the *in vitro* system and test the effect of both on growth and yield of soybean. Inoculum potential was tested in greenhouse conditions using maize as host plant. Values of root colonization showed that inoculum potential was 7% higher in the *in vitro* system. In order to evaluate the effects of both inoculants, an experiment was carried out in greenhouse conditions following a completely randomized design with three treatments and six replicates. The inoculant produced *in vitro* increased all nodulation parameters, but did not affect shoot mass or nitrogen of soybean plants. Grain yield, however, was 20% higher with the use of pot-produced inoculum. Pot culture system is the most promising technique to produce soybean inoculum, considering possible yield gains.

Keywords: *Glycine max* L., arbuscular mycorrhizal fungi, inoculants, yield.

INTRODUÇÃO

Os benefícios da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) vêm sendo demonstrados por décadas para diversas culturas de interesse agronômico, como soja, milho e feijão (ILBAS e SAHIN, 2005; GRÜMBERG et al., 2015; WANG et al., 2019). Nesta prática, normalmente é utilizado um inoculante produzido em ambiente protegido, em sistema conhecido como inóculo em vaso. Esse foi o primeiro sistema de produção de inoculante de FMAs, sendo um tradicional método de cultivo destes fungos, inclusive em coleções biológicas (STUTZ; MORTON, 1996).

Nesse sistema, um hospedeiro altamente dependente da associação micorrízica é inoculado com

esporos de FMAs e transplantado para um vaso contendo como substrato uma mistura de solo, areia e argila. Após 3 a 4 meses de crescimento em ambiente controlado, o substrato é coletado e utilizado como inoculante. Este sistema apresenta bons níveis de esporulação, onde, a maioria das espécies fúngicas podem ser cultivadas, pois problemas de compatibilidade entre fungo e hospedeiro ou substrato são raros (MORTON, 1993).

Por outro lado, a garantia de pureza do inoculante é um entrave, visto que o substrato utilizado é de origem edáfica, o que facilita a multiplicação de outros microrganismos durante o cultivo em ambiente protegido (WALKER; VESTBERG, 1994). Além deste problema, existe a dificuldade na manutenção e estocagem dos vasos,

¹Mestranda em Ciência do Solo, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Avenida Luiz de Camões, 2090, Conta Dinheiro, Lages, Santa Catarina, Brasil, CEP 88520-000.

²Docente, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Ulisses Gaboardi, Km 3, Fazenda Pessegueirinho, Curitibaanos, Santa Catarina, Brasil, CEP 89520-000. E-mail: s.purin@ufsc.br. *Autora para correspondência.

pois exigem irrigação controlada, temperatura e espaço adequado.

Outra alternativa de formulação do inoculante de FMAs foi desenvolvida em 1988 por Bécard e Fortin (BÉCARD e FORTIN, 1988), em cultivo *in vitro*. Nesse sistema o fungo é cultivado em associação com raízes de plantas de cenoura ou chicória geneticamente modificadas, em placas de Petri contendo meio de cultura com baixos níveis de nutrientes (DECLERCK et al., 1998). Mediante esporulação, as placas são subcultivadas entre 3 e 4 meses, em ciclos sucessivos. Com o estabelecimento desta cultura, os problemas de contaminação com outras espécies de FMAs ou outros fungos e bactérias são eliminados, garantindo a pureza do material. A manutenção é mínima e a estocagem é facilitada por necessitar de menos espaço. Em contrapartida, poucas espécies se desenvolvem satisfatoriamente nesse sistema, pois este possui grande limitação (CRANENBROUK et al., 2005).

Existem evidências de que o mesmo isolado de fungo, quando produzido como inoculante nesses dois sistemas, possa desenvolver características morfológicas distintas. Pawlowska et al. (1999), observaram que o desenvolvimento de esporos de *Glomus etunicatum in vitro* é semelhante aquele que ocorre em solo. Entretanto, foram 60% menores e tinham paredes internas mais espessas do que os esporos produzidos no sistema em vaso. É possível que, da mesma maneira que características morfológicas são alteradas com o ambiente de cultivo, aquelas simbióticas também sejam, havendo diferentes respostas de crescimento e/ou nutrição na planta hospedeira.

Um estudo pioneiro nessa área do conhecimento foi desenvolvido por Cely et al. (2016), avaliando-se o efeito dessas duas formulações de inóculo de *Rhizophagus clarus* sobre o crescimento vegetativo de plantas de soja e algodão. Os dois sistemas promoveram os mesmos valores de colonização radicular, massa da parte aérea e absorção de fósforo. Porém, uma comparação entre aspectos de produtividade em função do sistema de produção não foi abordada neste trabalho.

Em 2018, um inoculante à base de FMAs produzido em vaso (Rootella BR) foi registrado perante o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com a entrada dos inoculantes de FMAs no mercado nacional, é inevitável que questões relativas a métodos de produção de inóculo e sua eficiência agrônoma venham à tona e precisem ser elucidados.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o potencial de inóculo de *Rhizophagus clarus* no sistema de cultivo tradicional em relação ao sistema *in vitro* e testar o efeito destes dois sistemas sobre o crescimento e a produtividade de plantas de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, ambos em condições de casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no município de Curitiba, Santa Catarina (coordenadas geográficas de latitude:

27°16'60" Sul e longitude: 50°35'7" Oeste). A espécie utilizada foi *Rhizophagus clarus* (isolado RJN720A), mantida pela Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG), localizada na Universidade Regional de Blumenau (FURB), em Blumenau (SC). O material biológico utilizado consistiu de inoculantes de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) de dois sistemas de cultivo: em vaso e *in vitro*.

Todo o processo de produção de inóculo em vaso foi realizado na CICG. Uma amostra de solo contendo propágulos foi utilizada para a multiplicação de esporos (produção de inóculo). O substrato utilizado foi uma mistura de solo com areia esterilizada (proporção 1:1, v:v), sendo acondicionado em vasos plásticos de 1,5 kg, com furos no fundo, para escoamento da água. Em seguida, 80 sementes de braquiária (*Brachiaria brizantha*) foram colocadas sobre esta mistura de substrato e cobertas com uma camada de areia + argila expandida esterilizada (1:1). Os vasos permaneceram em casa de vegetação sobre bancada metálica por quatro meses após a semeadura, recebendo irrigação manual diária, usando-se regador. Depois deste período, a rega foi suspensa e os vasos foram mantidos até a secagem das plantas *in situ*, em ambiente com baixa luminosidade natural. O inóculo foi estocado em sacos plásticos tipo "zip-lock" e mantidas sob refrigeração a 4°C, sem luz, até o uso.

A produção do inóculo *in vitro* foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Curitiba, SC. Inicialmente, fez-se a extração dos esporos por meio do protocolo de centrifugação por gradiente de sacarose proposto por Gerdemann e Nicholson (1963). Posteriormente ocorreu a desinfecção a base de cloramina T 2% e antibióticos (50 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 25 mg L⁻¹ de sulfato de gentamicina). O procedimento descrito acima foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Na sequência, foram realizadas lavagens dos esporos com Tween 20, até completa sedimentação. Retirou-se a solução detergente e adicionou-se cloramina, deixando os esporos em imersão por 10 min. O mesmo foi feito com a solução de antibióticos, sendo este procedimento repetido 2 x, por 10 min. Logo após, foi realizada a lavagem dos esporos por duas vezes com água destilada autoclavada.

Depois de desinfetados, os esporos foram pipetados em placas de Petri contendo meio de cultura M, e acondicionados em câmara BOD na temperatura de 28°C até a sua germinação. Raízes geneticamente modificadas de cenoura foram transferidas para essas placas com esporos germinados e livres de contaminação, e por fim mantidas na BOD a 28°C por quatro meses. Após este período, as placas encontravam-se com fungos plenamente desenvolvidos, com hifas extra radiculares e esporos maduros.

Experimento 1. Avaliação do potencial de inóculo de *Rhizophagus clarus* produzido em sistemas de vaso e *in vitro* na cultura do milho (*Zea mays*)

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo dois tratamentos (T1 = inóculo em vaso e T2 = inóculo *in vitro*) e quatro repetições. A espécie vegetal hospedeira usada foi o milho (*Zea mays*), e as plantas semeadas e cultivadas em tubetes plásticos de 300 g, com substrato previamente autoclavado composto por solo (Cambissolo) e areia grossa, na proporção 1:1 (v:v).

No tratamento 1 adicionou-se 150 g dessa mistura de solo + areia na parte inferior do tubete. Logo após, colocou-se a mistura de inoculante (0,8 g) com 150 g de substrato (solo e areia) em um béquer e procedeu-se a homogeneização. Com este material, completou-se o volume total do tubete.

No tratamento 2, a inoculação foi realizada com material produzido em condições *in vitro*. Com auxílio de uma lupa, determinou-se a área da placa de Petri com 50 esporos. Inicialmente, colocou-se 150 g de substrato no tubete. Em seguida, cortou-se o fragmento da cultura *in vitro*, que foi disposto dentro do tubete. Por fim, completou-se o volume total do tubete com substrato (150 g). Em ambos tratamentos (T1 e T2), a quantidade de inóculo usada proporcionou a padronização de 50 esporos em cada unidade experimental.

Em cada tubete, foram adicionadas três sementes de milho a 3 cm de profundidade, e três dias posteriormente a germinação fez-se o raleio das mudas. A irrigação foi manual durante todo o experimento, durando 30 dias. Ao final deste período, as mudas foram retiradas dos tubetes e separou-se o sistema radicular da parte aérea. O sistema radicular foi lavado para retirar o excesso de solo e as raízes foram coradas, segundo metodologia de Koske e Gemma (1989). Adicionou-se às raízes uma solução de hidróxido de potássio (10%), sendo em seguida levadas a banho-maria por 80°C, durante 50 min. Na sequência procedeu-se a lavagem das raízes em água corrente e adicionou-se ácido clorídrico (2%). As raízes foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min. Ao retirar o excesso de ácido, adicionou-se a solução Azul de Tripan (5%). Posteriormente, as raízes permaneceram no banho-maria por 50 minutos. Ao término do procedimento, as raízes foram novamente lavadas e fracionadas em 10 partes.

Os fragmentos foram colocados em lâmina para visualização e divididos visualmente em cinco pontos, aleatoriamente distribuídos. Utilizou-se microscópio óptico com aumento de 10 e 40x para visualização destes fragmentos. A presença de estruturas observadas (hifas, arbúsculos, esporos e vesículas) foi registrada em cada ponto avaliado. O potencial de inóculo foi determinado pela estimativa de colonização radicular de fragmentos colonizados em relação aqueles não colonizados.

Experimento 2. Efeitos da inoculação da soja com *Rhizophagus clarus* produzido em sistemas de cultivo em vaso e *in vitro*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo três tratamentos e seis repetições. Cada planta foi considerada uma repetição. Os

tratamentos consistiram em: T1 = testemunha, T2 = inoculante de FMA produzido em vaso e T3 = inoculante de FMA produzido *in vitro*.

O mesmo solo do experimento 1 foi peneirado e autoclavado a 120°C, por 50 min. Após esterilização, o solo foi acondicionado em vasos com capacidade para 11 L. O calcário foi adicionado previamente à implantação do experimento. A adubação de base utilizada foi a base de fósforo e potássio, conforme recomendação para a cultura, ajustando-se as quantidades para o volume de solo comportado em cada vaso.

A cultivar de soja utilizada foi BMX Ativa, cujas sementes foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio (10%) e tratadas com fungicida. A semeadura foi realizada com três sementes por vaso e após emergência, realizou-se o desbaste, deixando apenas uma plântula por vaso. Após 30 dias do estabelecimento das plantas nos vasos, aplicou-se a primeira dose de inseticida e fungicida, a fim de reduzir a incidência de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) e oídio (*Erysiphe diffusa*). Os produtos usados foram Azoxistrobina (200 g L⁻¹) com Ciproconazol (80 g L⁻¹) para oídio e também Imidacloprido (100 g L⁻¹) com Beta-ciflutrina (12,5 g L⁻¹) para mosca branca. Houve a necessidade de reaplicação após 20 dias de experimentação.

Em todos os tratamentos, foi feita a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio da espécie *Bradyrhizobium japonicum* (estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080). O inoculante comercial foi fornecido pela Empresa Total Biotecnologia, contendo população bacteriana de 5 x 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias) g⁻¹. O mesmo foi aplicado na dose de 2 g kg⁻¹ de semente, previamente umedecida com 6 mL de calda açucarada, a 10%. A concentração final de bactérias foi de 1,2 x 10⁶ UFC g⁻¹ de sementes.

No tratamento 1, as plantas foram inoculadas apenas com *B. japonicum*. No tratamento 2, as plantas receberam inoculação com FMAs produzidos no sistema de cultivo em vaso. Foi utilizada a quantidade de 100 esporos em cada unidade experimental. Para tanto, foi aplicada a quantidade de 80 g de inóculo em cada um dos vasos. A inoculação foi realizada adicionando o inoculante em volta das três sementes, cobrindo em seguida as sementes e o inoculante com solo, para não deixar exposto.

No tratamento 3, foi utilizado inoculante produzido no sistema de cultivo *in vitro*. Com auxílio de uma lupa e pincel marcador, marcaram-se as partes da placa de Petri que continham 100 esporos. Cortou-se um fragmento contendo meio de cultura, raízes e esporos. Em seguida, adicionou-se o fragmento ao vaso, cobriu-se com solo e adicionou-se três sementes a 5 cm de profundidade.

Foram estabelecidas 12 unidades experimentais para cada tratamento. Destas, seis foram avaliadas no estágio de florescimento pleno (R2) e seis foram avaliadas no final do ciclo de desenvolvimento (maturação plena). As plantas receberam irrigação manual, com regador, todos os dias até o final do ciclo de crescimento.

No estágio R2, coletou-se uma planta de cada um dos seis vasos avaliados para avaliação da massa da parte

aérea seca (g/planta), número de nódulos por planta, número de nódulos viáveis, massa de nódulos secos (g/planta) e colonização radicular por FMAs (dividida em percentual de colonização por hifas, hifas + vesículas, hifas + arbúsculos e hifas + esporos).

Inicialmente, a parte aérea foi separada do sistema radicular, cortando-a no ponto de inserção dos cotilédones. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel pardo e levada à estufa de circulação forçada, com temperatura média de 65°C, por um período de cinco dias até atingir massa constante. Em seguida, a massa da parte aérea seca foi determinada em balança semi-analítica. A parte aérea foi moída e usada para determinação do percentual de nitrogênio, segundo metodologia de digestão e titulação (TEDESCO et al., 1995).

As raízes foram lavadas e os nódulos foram separados, contados e analisados quanto à viabilidade por coloração rosa-avermelhada. Posteriormente, foram levados à estufa para secagem e determinação da massa dos nódulos secos nas mesmas condições que a parte aérea. Uma vez finalizado o processo da coleta de nódulos, as raízes foram descartadas. A avaliação de colonização micorrízica foi determinada com o mesmo método usado para avaliação do potencial de inóculo (Experimento 1). A única adaptação necessária para as raízes de soja foi em relação ao tempo de permanência nas soluções de

hidróxido de potássio e azul de Tripán, que neste caso foi 60 min.

A produtividade foi realizada no estágio de maturação plena. As sementes foram coletadas das vagens, acondicionadas em sacos de papel pardo e colocadas em estufa a 65°C pelo período de cinco dias para secagem completa. Foi determinada a massa de grãos por planta, considerando uma correção para 13% de umidade.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, e posteriormente foi realizada a análise de variância. Não houve necessidade de transformação dos dados, uma vez que os pressupostos foram atendidos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro e o programa estatístico usado foi o Assistat 2.0 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, o potencial de inóculo foi maior no sistema *in vitro* (T2), com 7% mais áreas colonizadas do que aquele observado com o sistema em vaso (T1). O inóculo produzido *in vitro* também resultou em maior colonização por hifas e vesículas do que aquele produzido em vaso (Tabela 1). A utilização do inóculo produzido *in vitro* pode representar, em termos práticos, um material com maior potencial de colonização e, conseqüentemente, necessidade de uso de menores quantidades de propágulos.

TABELA 1 - Percentual de colonização radicular no milho (*Zea mays*) por *Rhizophagus clarus* após quatro semanas de crescimento em casa de vegetação.

Tratamentos	Colonização total (%)	Colonização por hifas (%)	Colonização por hifas e vesículas (%)
T1 (sistema em vaso)	91 b*	91 b	38 b
T2 (sistema <i>in vitro</i>)	98 a	98 a	72 a

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

No experimento 2, o número de nódulos (total e viáveis), foi maior no tratamento com inoculante produzido *in vitro* (T3), o qual promoveu um valor 48,3% maior que aquele em vaso (T2) e 53,4% superior à testemunha (T1), que recebeu inoculação apenas com *B. japonicum*. Apenas o inoculante *in vitro* alterou significativamente a massa de nódulos, quando comparado com a inoculação padrão (Tabela 2).

O aumento no número e massa de nódulos fora relatado por outros autores e observado como efeito da inoculação da soja com outras espécies de FMAs, tais

como *Funneliformis mosseae* e *Gigaspora margarita* (WANG et al., 2011; DING et al., 2016). Esses resultados suportam o fato de que o maior aporte de fósforo proporcionado pelas micorrizas ajuda a suprir a alta demanda de ATP dos nódulos (BAREA e AZCÓN-AGUILAR, 1983; CARDOSO, 1985). Entretanto, o fato de apenas o sistema *in vitro* ter promovido aumento nessas variáveis, pode estar relacionado a algum aspecto de atividade da fosfatase, desfavorecido durante o cultivo em vaso.

TABELA 2 - Valores médios de número total de nódulos (NTN), número de nódulos viáveis (NNV) e massa de nódulos secos (MNS) em plantas de soja submetidas a tratamentos de inoculação com *Rhizophagus clarus*.

Tratamentos	NTN	NNV	MNS (g)
T1 (testemunha)	31 b*	31 b	0,09 b
T2 (sistema em vaso)	28 b	28 b	0,16 ab
T3 (sistema <i>in vitro</i>)	58 a	58 a	0,31 a

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Todos os parâmetros de colonização radicular da soja foram superiores em plantas inoculadas com material produzido *in vitro*, em relação aquele produzido em vaso e

com colonização padrão (Tabela 3). As referidas porcentagens de colonização radicular estão dentro dos números encontrados em plantas colonizadas por FMAs

em comunidades indígenas, onde o principal gênero ocorrente é o *Glomus*. Os valores médios, dependendo do tipo de solo e localidade geográfica, variam de 60 a 100% (KHALIL et al., 1992).

Cely et al. (2016) não observaram valores diferentes de colonização micorrízica, de acordo com o sistema de produção de inóculo, quando o cultivo da soja foi realizado em substrato estéril. Na condição de esterilização, o inóculo *in vitro* mostrou efeito superior sobre a colonização radicular. No presente trabalho, o efeito foi reportado em condição não estéril, o que é um aspecto interessante, devido à condição de campo na qual um inoculante é aplicado, ou seja, com uma comunidade microbiana nativa no qual o material introduzido deve competir.

Quando comparados a outros trabalhos de inoculação, os valores de colonização micorrízica observados neste experimento podem ser considerados elevados. BRESSAN et al. (2001) registraram valores de 15% de colonização com inóculo de FMAs produzido em vaso. Cely et al. (2016) observaram valores entre 35 e 85% de colonização por *R. clarus* produzido *in vitro*. Abdel-Fattah et al. (2014) ao trabalharem com *Glomus constrictum*, obtiveram 98% de colonização radicular. No presente estudo, a colonização chegou até 99%, ou seja, praticamente todos os fragmentos de raízes apresentaram algumas das estruturas avaliadas. Com isso, pode-se ressaltar qualidade do inóculo produzido e a compatibilidade satisfatória do isolado de *R. clarus* em relação a colonização de raízes de plantas de soja.

TABELA 3 - Percentuais de colonização radicular em plantas de soja submetidas aos tratamentos de inoculação.

Tratamentos	CT (%)	CH (%)	CHV (%)	CHA (%)	CHE (%)
T1 (testemunha)	0 c*	0 c	0 c	0 c	0 c
T2 (sistema em vaso)	81 b	81 b	41 b	14 b	14 b
T3 (sistema <i>in vitro</i>)	99 a	99 a	72 a	36 a	28 a

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. CT = colonização total, CH = colonização por hifas, CHV = colonização por hifas e vesículas, CHA = colonização por hifas e arbúsculos e CHE = colonização por hifas e esporos.

A massa da parte aérea e o teor de nitrogênio não sofreram efeito dos tratamentos estudados. Porém, a massa de grãos por planta foi maior quando as plantas foram inoculadas com *R. clarus*, produzido no sistema em vaso, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 4). Esse parâmetro foi aumentado em 20% em relação aquele observado na inoculação padrão, apenas com

Bradyrhizobium. Notoriamente, esta foi a única variável para a qual o sistema em vaso se sobressaiu, frente ao sistema *in vitro*. É provável que os esporos, quando cultivados nesse sistema de produção de inóculo, possuam características fisiológicas e metabólicas que não são expressos no sistema *in vitro* e, de alguma maneira, contribuam para componentes de produtividade da cultura.

TABELA 4 - Valores médios de massa seca da parte aérea (MPAS), nitrogênio da parte aérea (NPA) e massa de grãos por planta (MG) em plantas de soja submetidas aos tratamentos de inoculação com *Rhizophagus clarus*.

Tratamentos	MPAS (g)	NPA (%)	MG (g)
T1 (testemunha)	18,64 ^{ns}	3,94 ^{ns}	14,45 b
T2 (sistema em vaso)	17,54	3,98	17,34 a
T3 (sistema <i>in vitro</i>)	20,47	3,37	14,55 b

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, ^{ns} = não significativo.

A ausência de efeito sobre a massa da parte aérea e teores de nitrogênio também foi registrada por Cely et al. (2016), ao estudar diferenças entre *R. clarus* produzido em vaso e *in vitro*. Porém, essas observações divergem dos estudos de outros pesquisadores (ABDEL-FATTAH et al., 2014; MENG et al., 2015; JOU e BESALATPOUR, 2018). Todavia, é importante destacar que os referidos trabalhos avaliaram espécies e gêneros de diversos FMAs, o que representa um fator de variação a ser considerado e, portanto, as comparações são limitadas. Pode-se apenas sugerir que o *R. clarus* não seja uma espécie que beneficia a cultura em questão, no aspecto de melhorar a nutrição nitrogenada da parte aérea.

Em relação a massa de grãos, destaca-se maior efeito de *R. clarus* quando produzido em vaso. O aumento da ordem de 20% está dentro da faixa de valores

observados por outros autores que usaram o mesmo sistema de cultivo, porém com diferentes espécies e gêneros. Jalaluddin (2005) estudando a resposta da soja à inoculação com *Glomus macrocarpum*, pode constatar um aumento de 11% nos valores de grãos frescos, quando comparado à inoculação apenas com *Bradyrhizobium*. Jou e Besalatpour (2018) testaram diferentes espécies de FMAs (*Glomus fasciculatum*, *G. versiforme*, *G. intraradices*, *G. mosseae* e *G. etunicatum*), verificando que estas promoveram aumento na produção de grãos, com valores entre 50 e 79%, dependendo da espécie.

Em relação ao sistema *in vitro*, a menor massa de grãos observada no presente estudo (comparada ao T1) divergiram dos resultados apresentados por Cely et al. (2016). Ao estudarem o efeito do inóculo de *R. clarus*, os autores verificaram produtividade de aproximadamente

3,2 ton ha⁻¹ em comparação a 1,5 ton ha⁻¹, na ausência do fungo. Alguns fatores podem estar relacionados com a divergência de respostas, tais diferenças no processo de inoculação, que no caso dos referidos autores utilizaram peletização, de inóculo com a adição de material orgânico (CELY et al., 2016). Além disso, a variabilidade fenotípica e genotípica dentro de isolados, até aqueles provenientes de um mesmo local, pode resultar em diversos benefícios para o hospedeiro (LEE e EOM, 2015).

Outros fatores a serem considerados no processo de desenvolvimento da tecnologia de inoculantes à base de FMAs incluem a fertilidade do solo e a cultivar de soja. Registros na literatura mostram que as espécies de FMAs produzem benefícios distintos, conforme as condições do solo utilizado. Maddox e Soileau (1991), pesquisaram o efeito de duas espécies (*Glomus fasciculatum* e *G. etunicatum*) inoculadas em plantas de soja. Os mesmos autores notaram que, em pH = 7,8, apenas a inoculação com *G. fasciculatum* foi capaz de aumentar a produtividade, na ordem de 20%. Em pH = 6,0, ambas as espécies de fungos testadas foram eficientes, aumentando em 27% o número de grãos. Este incremento na produtividade pode estar relacionado ao pH, pois os FMAs normalmente necessitam de pH levemente ácido para proporcionar rendimentos mais elevados.

Meghvansi et al. (2008) testaram combinações de três espécies de FMAs e quatro cultivares de soja e sugeriram a existência de uma forte relação seletiva entre a planta e os simbiontes. Os percentuais de aumento da massa de grãos proporcionados por *R. intraradices* nas cultivares testadas foram 31, 32, 48 e 60%. Segundo os autores, os dados sugerem a ocorrência de seleção, por parte da planta, que indica especificidade da resposta de inoculação. Essa hipótese é suportada por outros pesquisadores, que observaram respostas divergentes de acordo com o genótipo vegetal testado (WANG et al., 2011; ORTAS, 2012).

Experimentos mais detalhados considerando cultivares de soja são justificados, pelo fato de que a resposta à inoculação é também regulada pela planta hospedeira. Esse aspecto é importante e merece ser explorado, frente ao grande número de cultivares de soja cultivadas no Brasil, que comportam vasta gama de condições edafoclimáticas.

CONCLUSÕES

O sistema em vaso tem melhor efeito sob o ponto de vista econômico da recomendação de um inoculante de FMAs.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G.M.; ASRAR, A.A.; AL-AMRI, S.M.; ABDEL-SALAM, E.M. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization on the gas exchange, growth and phosphatase activity of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Photosynthetica**, v.52, n.4, p.581-588, 2014.
- BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. **Advances in Agronomy**, v.36, [s.n.], p.1-54, 1983.
- BÉCARD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, v.108, n.2, p.211-218, 1988.
- BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J.O.; VASCONCELLOS, C.A.; PURCINO, A.A.C. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p.315-323, 2001.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato de rocha na simbiose Soja-Rhizobium. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, [s.n.], p.125-130, 1985.
- CELY, M.V.T.; OLIVEIRA, A.G.; FREITAS, V.F.; LUCA, M.B.; BARAZETTI, A.R.; SANTOS, I.M. O.; GIONCO, B.; GARCIA, G.V.; PRETE, C.E.C.; ANDRADE, G. Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.720, p.1-9, 2016.
- CRANENBROUK, S.; VOETS, L.; BIVORT, C. **Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs**. In: DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; FORTIN, J.A. (Eds.). *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p.341-375, 2005.
- DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; PLENCHETTE, C. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. **Mycologia**, v.90, n.4, p.579-585, 1998.
- DING, X.D.; ZHANG, S.R.; WANG, R.P.; LI, S.Y.; LIAO, X.R. Am fungi and rhizobium regulate nodule growth, phosphorous (P) uptake, and soluble sugar concentration of soybeans experiencing P deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v.39, n.13, p.1915-1925, 2016.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, n.2, p.235-244, 1963.
- GRÜMBERG, B.C.; URCELAY, C.; SHROEDER, M.A.; VARGAS-GIL, S.; LUNA, C.M. The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v.51, n.1, p.1-10, 2015.
- ILBAS, A.I.; SAHIN, S. *Glomus fasciculatum* inoculation improves soybean production. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section B - Soil and Plant Science, v.55, n.4, p.287-292, 2005.
- JALALUDDIN, M. Effect of inoculation with VAM-fungi and *Bradyrhizobium* on growth and yield of soybean in sindh. **Pakistan Journal of Botany**, v.37, n.1, p.169-173, 2005.

- JOU, M.H.; BESALATPOUR, A.A. Interactive effects of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* strains and mycorrhiza species on soybean growth and nutrient contents in plant. **Journal of Plant Nutrition**, v.41, n.1, p.10-18, 2018.
- KHALIL, S.; LOYNACHAN, T.E.; MCNABB JR, H.S. Colonization of soybean by mycorrhizal fungi and spore populations in Iowa soils. **Agronomy Journal**, v.84, n.5, p.832-836, 1992.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p.488-505, 1989.
- LEE, E.; EOM, A. Growth characteristics of *Rhizophagus clarus* strains and their effects on the growth of host plants. **Microbiology**, v.43, n.4, p.444-449, 2015.
- MADDOX, J.J.; SOILEAU, J.M. Effects of phosphate fertilization, lime amendments and inoculation with VA-mycorrhizal fungi on soybeans in an acid soil. **Plant and Soil**, v.134, n.1, p.83-93, 1991.
- MEGHVANSI, M.K.; PRASAD, K.; HARWANI, D.; MAHNA, S.K. Response of soybean cultivars toward inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* in the alluvial soil. **European Journal of Soil Biology**, v.44, n.3, p.316-323, 2008.
- MENG, L.B.; ZHANG, A.Y.; WANG, F.; HAN, X.G.; WANG, D.J.; LI, S.M. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.1, p.1-10, 2015.
- MORTON, J.B. Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. **Mycorrhiza**, v.2, [s.n.], p.97-109, 1993.
- ORTAS, I. The effect of mycorrhizal fungal inoculation on plant yield, nutrient uptake and inoculation effectiveness under long-term field conditions. **Field Crops Research**, v.125, n.2, p.35-48, 2012.
- PAWLOWSKA, T.E.; DOUDS, D.D.; CHARVAT, I. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycological Research**, v.103, n.12, p.1549-1556, 1999.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.
- STUTZ, J.C.; MORTON, J.B. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Canadian Journal of Botany**, v.74, n.12, p.1883-1889, 1996.
- TEDESCO, M.J.; GINAELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 1995. Boletim Técnico, 5.
- WALKER, C; VESTBERG, M. A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. **Agricultural Science in Finland**, v.3, n.3, p.233-240, 1994.
- WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F.; YAN, X.; LIAO, H. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v.21, n.3, p.173-181, 2011.
- WANG, G.; YE, C.; ZHANG, J.; KOZIOL, L.; BEVER, J.D.; LI, S. Asymmetric facilitation induced by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi leads to overyielding in maize/faba bean intercropping. **Journal of Plant Interactions**, v.14, n.1, p.10-20, 2019.