

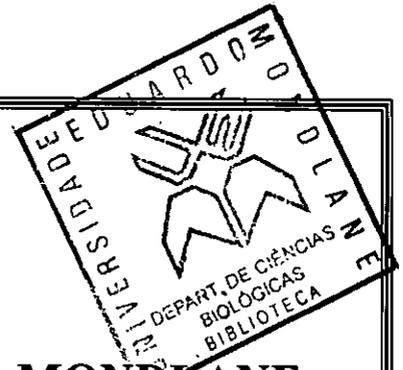
B10-237



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Trabalho de Culminação de Curso  
(Estágio)

**RASTREIO DE *Treponema pallidum* NOS DADORES  
DO BANCO DE SANGUE DO HCM**

**Autora:** Quitéria Alberto Manuel

Maputo, Novembro de 2007



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Curso**

**(Estágio)**

**RASTREIO DE *Treponema pallidum* NOS DADORES  
DO BANCO DE SANGUE DO HCM**

**Autora: Quitéria A. Manuel    Supervisor: dr<sup>a</sup>. Cristina Beatriz**

Maputo, Novembro de 2007



## Agradecimentos

Com estima e consideração endereço os meus agradecimentos a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para que este trabalho se tornasse numa realidade.

Assim, agradeço primeiro a Deus, sempre presente e iluminando as minhas acções.

Aaos meus pais, esposo e irmãos, pelo apoio moral e material, durante o meu percurso estudantil.

Registo aqui, em especial, e de forma indelével a minha gratidão a supervisora, dra. Cristina Beatriz, pela disponibilidade e atenção.

A todos funcionários do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, que contribuíram para minha aprendizagem e conclusão deste trabalho, em especial a Dona Adelaide, Celsa, Tenório, José Vitorino, Jorge, Enfermeira Teresa, Sr. Elias, Sra. Virgínia, enfermeiro Nhantumbo, Cristina, Dona Isaura, Sr. Abílio, Sr. Manhique, Sr. Omim e Yolanda.

Ao meu padrinho Dizimalta dos Santos pelo material fornecido e pelas sugestões dadas, aos meus amigos, em especial a Sónia Muchate, Mariamo Ussene, Helena Manhiça, pelas coisas que deixamos de fazer, aos meus colegas especialmente ao Nédio Mabunda pelas sugestões dadas para a realização deste trabalho, ao Flávio, Suzana, Mirian, Nelson, Ilda, Zita pelo apoio moral e compreensão.

A todos meus colegas que ingressaram no Departamento de Ciências Biológicas no ano 2004, pela amizade concedida.

Aos meus professores que sabiamente deram os alicerces para o presente trabalho, o meu muito obrigado!

### **Dedicatória**

Aos meus pais, Alberto Manuel Matsimbe e Vitória Ricardo (em memória), ao meu segundo pai, Ibraimo Narane os verdadeiros heróis da minha vida, que com amor e dedicação incondicionais fizeram com que este dia se tornasse uma realidade. Ao meu esposo, pela força moral e material dado durante todo o percurso estudantil, aos meus irmãos Catissa, Hanifa e Cassimo e ao meu sobrinho Sheiss pelo apoio, amor e carinho.

### Declaração de Honra

Declaro por minha honra, que este trabalho é fruto do meu esforço e dedicação, da minha inteira responsabilidade e que a informação aqui contida reflecte só e somente a realidade.

Quitéria Alberto Manuel

(Quitéria Alberto Manuel)

Maputo, Novembro de 2007

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADSM** – Associação dos Dadores de Sangue de Moçambique

**BSHCM** – Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo

**CVM** – Cruz Vermelha de Moçambique

**DAM** – Departamento de Assistência Médica

**DNS** – Direcção Nacional de Saúde

**ELISA** – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima)

**EDTA** — Ácido etilenodiaminotetraacético

**HIV** — Vírus de Imunodeficiência Humana

**IgG** — Imunoglobulina G

**ITS** -Infecção de transmissão sexual

**MISAU** – Ministério da Saúde

**OMS** — Organização Mundial da Saúde

**PNTS** — Programa Nacional de Transfusão de Sangue

**rpm** – rotações por minuto

**RPR** — Rapid Plasma Reagin

**SIDA/AIDS** – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

**SSCV** – Sociedade Suíça da Cruz Vermelha

**STS** – Serviço de Transfusão de Sangue

**VDRL** — Veneral Disease Research Laboratory

## Resumo

O presente trabalho de culminação de curso teve como suporte um estágio de 5 meses no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo. O referido estágio teve como objectivo principal aprender as técnicas para o processamento do sangue, com particular ênfase no rastreo do *Treponema pallidum* (agente da Sífilis).

Para a concretização dos objectivos a metodologia aplicada foi pesquisa bibliográfica, observação e execução das técnicas.

Avaliou-se a demanda das solicitações serológicas para sífilis (RPR), considerando-se o sexo e a idade dos dadores. Um total de 5566 amostras oriundas de dadores voluntários e repositores foram submetidos ao teste. A taxa de incidência foi de 1.1%, apresentando maior valor individuos do sexo masculino e da faixa etária compreendida entre os 20 e 29 anos de idade .

Foi possível com o estágio aprender todas as técnicas usadas para o processamento do sangue e a relevância de um Banco de Sangue na Hemoterapia.

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	1
1.1. Breve Historial da Actividade Transfusional em Moçambique.....	2
2. PROGRAMA DE ESTÁGIO .....	5
2.1. OBJECTIVOS.....	6
2.1.1. Geral.....	6
2.1.2. Específicos .....	6
3. APOIO CONCEDIDO POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
4.1 <i>Treponema pallidum</i> .....	8
4.2 Rastreio de <i>Treponema pallidum</i> .....	9
5. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	10
5.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
5.1.1. Material .....	11
5.1.2 Metodologia .....	12
Triagem de Sífilis.....	12
Tipagem ABO/Rh.....	12
Produção de hemocomponentes.....	13
a)Sangue Total (ST).....	13
b)Concentrado de Hemácias (CH).....	13
c)Concentrado de plaquetas (CP).....	13
d) Plasma Fresco Congelado (PFC).....	14
Triagem de HIV .....	14
Teste de Hepatite B.....	15
Provas de compatibilidade .....	16
6. INCIDÊNCIA DE SÍFILIS NOS DADORES DO BSHCM .....	16
6.1 Resultados .....	17
6.2 Discussão .....	19
7. PERSPECTIVA CRÍTICA DO ESTÁGIO .....	20
8. CONCLUSÃO .....	22
9. RECOMENDAÇÕES .....	23
10. BIBLIOGRAFIA .....	24
Anexos .....	27

## 1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo (BSHCM), fica situado no Bairro da Polana Cimento, na Avenida Agostinho Neto, número 1164. Este tem como actividade principal a coleta e o processamento de sangue (triagem e produção de hemocomponentes) bem como o acompanhamento médico dos dadores.

O BSHCM é dirigido por um Director de serviço Hospitalar e está dividido em três (3) secções: Secção Técnica, Secção de Administração e Secção de Enfermagem (Fig.1). Cada uma destas secções subdivide-se em subsecções de acordo com a especificidade do trabalho, cujo objectivo é a obtenção de um sangue seguro para a transfusão.

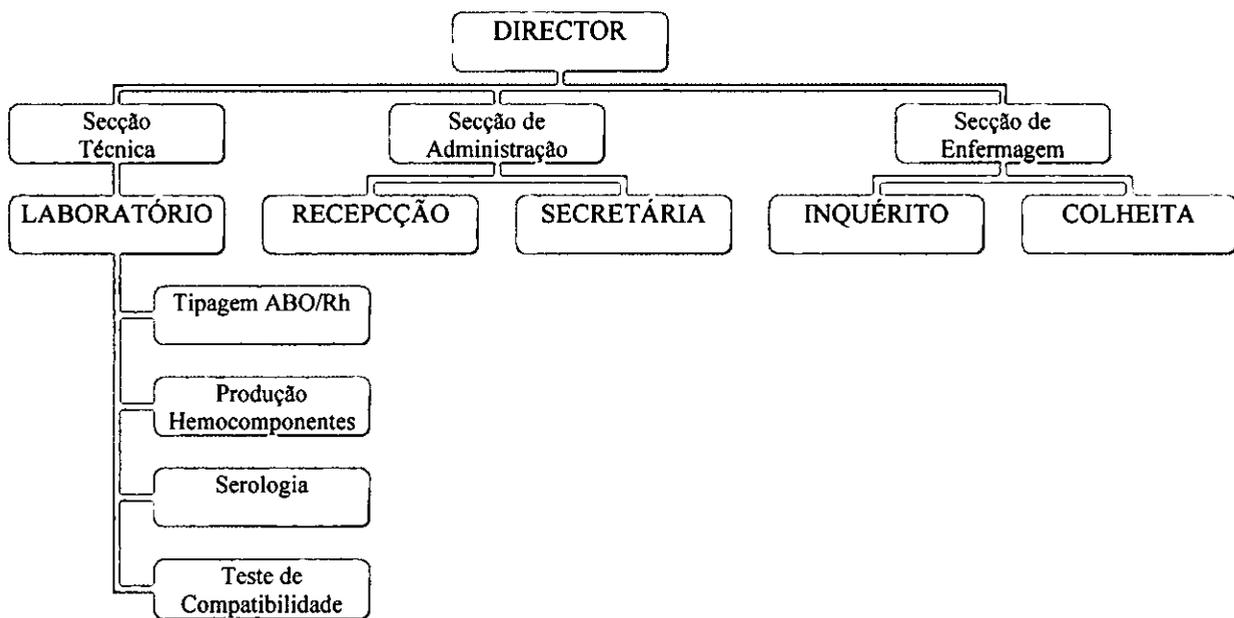


Fig.1: Organograma do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo

Fonte: Mabunda,2006.

**Recepção** (Secção de Administração): É onde são registados os dados do dador (nome, sexo, endereço, profissão, a causa da doação - voluntário/repositor, e outras);

**Sala de inquérito** (Secção de Enfermagem) Nesta sala, a pessoa é sujeita a uma série de perguntas que terá de responder, é feita uma avaliação preliminar do estado de saúde dos dadores ( sinais de alguma doença, pressão sanguínea, peso, altura, nível de hemoglobina) e o seu historial médico. Faz-se uma pré-triagem do dador.

**Sala de colheita** (Secção de Enfermagem), Recebe-se o Dador, procede-se o registo do mesmo, prepara-se o saco e o frasco para a colheita e faz-se a colheita sangue.

**Laboratório** (Secção Técnica), este local está dividido em 5 subsecções, o sangue segue o seguinte trajecto:

- **Subsecção 1:** Tipagem ABO/Rh;
- **Subsecção 2:** Produção de hemocomponentes;
- **Subsecção 3:** Triagem de HIV e Hepatite B;
- **Subsecção 4:** Triagem de Sífilis, Isoaglutininas, Isohemolisinas; e
- **Subsecção 5:** Provas de compatibilidade.

### **1.1. Breve Historial da Actividade Transfusional em Moçambique**

Apenas o Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo é que tem um Clínico dedicado ao acompanhamento da actividade transfusional. Fala-se da existência de duas fases que marcaram os serviços de transfusão de sangue em Moçambique: os períodos colonial e pós Independência (Gudo citado por Rosário,2006).

Durante o período colonial, a transfusão de sangue era feita com base em doação familiar e através de doações remuneráveis. No entanto, em 1975, após a Independência foi abolida a doação remunerável (Gudo citado por Rosário,2006).

Em 1979, foi estabelecido um acordo bilateral de cooperação entre o Governo de Moçambique e a Cooperação Suíça, para apoio na área de Saúde incluindo os Serviços de Transfusão de Sangue (Gudo citado por Rosário,2006).

Um ano depois, em 1980, foi enviado a Moçambique um consultor da Federação Internacional da Cruz Vermelha e da Crescente Vermelha Suíça, para uma primeira avaliação da situação transfusional. Dois anos mais tarde, em 1982, realizou-se uma segunda avaliação, cujos resultados culminaram num acordo trilateral, em 1983, entre o Ministério da Saúde (MISAU), Cruz Vermelha de Moçambique (CVM) e Sociedade Suíça da Cruz Vermelha (SSCV), assim como, num pedido de apoio financeiro da Cooperação Técnica Suíça. Este acordo constituiu a primeira fase (1984-1985) e tinha como principais objectivos a criação do Programa de Sangue (Gudo citado por Rosário,2006).

Com o apoio da SSCV, em 1984, foi estabelecido o Programa Nacional de Transfusão de Sangue (PNTS).

A segunda fase do acordo tripartido foi estabelecida entre o período de 1986-1987, e tinha como principais objectivos a melhoria da capacidade de realização de testes de grupo sanguíneo, o aumento do número de doações e a redução da dependência do País em relação a material importado para a transfusão de sangue (Gudo citado por Rosário,2006).

Em 1986, foi enviada a Moçambique uma missão de avaliação da OMS, que constatou que o PNTS se subordinava à Secção de Laboratórios e que a nível dos Bancos de Sangue dos Hospitais Rurais o pessoal técnico era constituído apenas por microscopistas. Apesar de haver um programa de formação este não era acompanhado de supervisão, devido ao clima de instabilidade gerado pela guerra civil. A mobilização de Dadores de Sangue era feita em colaboração com a CVM e a testagem de sangue era apenas feita para Sífilis (Gudo citado por Rosário,2006).

A terceira fase do acordo tripartido foi assinada nos anos 1988 e 1990, e estabelecia a instalação dos Bancos de Sangue a nível das capitais provinciais e a introdução do despiste de HIV, nas unidades de sangue (Gudo citado por Rosário,2006).

A 30 de Novembro de 1988, foi aprovado pelo Conselho de Ministros o Decreto nº 14/88, um instrumento que regula, desde então, a actividade de transfusão de sangue no País (Gudo citado por Rosário,2006).

A quarta fase do acordo com o Governo Suíço, foi assinada para o período 1990-1991, e que de facto terminou nos finais de 1992. Durante este período foi feita uma

avaliação dos progressos alcançados até a altura, no entanto, este relatório não está disponível (Gudo citado por Rosário,2006).

Só 1993 é reactivada a Associação dos Dadores de Sangue de Moçambique (ADSM), inicialmente criada em 1957. Actualmente, esta associação congrega cerca de 300 Dadores de Sangue (Gudo citado por Rosário,2006).

Na sétima fase (1996-1998), foi assinado um acordo bilateral entre o MISAU e SSCV. Em finais de 1997, foi realizado o II Seminário Nacional de Transfusão de Sangue no qual foi recomendada a necessidade de se orçamentar a actividade transfusional a nível do Ministério, das Direcções provinciais e dos Hospitais; e também a necessidade de se formular o Regulamento de Transfusão de Sangue, de modo a que se adeque à realidade actual (Gudo citado por Rosário,2006).

Também nos finais de 1997, foi feita uma avaliação do Programa de Sangue no âmbito do apoio Suíço e propostas para o futuro. Nesta avaliação foi demonstrado o impacto positivo deste apoio e reconhecida a necessidade de se reforçarem as áreas de Mobilização e Recrutamento de Dadores de Sangue, a Testagem de Sangue para Doenças Infecciosas e a Formação do Pessoal. A missão da avaliação também manifestava apreensão devido à incerteza sobre a continuidade do apoio Suíço ao Programa (Gudo citado por Rosário,2006).

Em 1999, foi assinado o último acordo bipartido entre os Governos de Moçambique e Suíço para 1999 e 2000, que foi considerado uma fase de transição entre o final de apoio Suíço e a integração no orçamento do Governo de Moçambique (Gudo,2006 citado por Rosário,2006).

O Programa de Sangue, também beneficiou do apoio da Cooperação Francesa, no período 1996 a 1999, na área de Testagem de Sangue para o HIV e na computarização do Banco de Sangue de Referência Nacional (Gudo citado por Rosário,2006).

O PNTS é um programa do MISAU inserido na Secção de Transfusão de Sangue (STS), que tem a responsabilidade de coordenar toda a actividade de Transfusão de Sangue a nível do País (Gudo citado por Rosário,2006).

Hierarquicamente, a STS subordina-se à Repartição dos Meios Auxiliares de Diagnóstico e Terapêutica, Departamento de Assistência Médica (DAM) e à Direcção Nacional da Saúde (DNS) (Gudo citado por Rosário,2006).

A actividade transfusional está baseada nos Hospitais, sofrendo assim uma dupla subordinação.

No País, existem cerca de 936 unidades sanitárias com cerca de 14 000 camas. Destas unidades, 111 fazem transfusão e se encontram distribuídas da seguinte maneira: 17 destas possuem Bancos de Sangue (3 Hospitais Centrais, 7 Hospitais Provinciais, 7 Hospitais Rurais) e as restantes têm a actividade transfusional dentro do Laboratório Clínico (Gudo citado por Rosário,2006).

A gestão dos fundos do Programa é feita com base na proposta do Chefe da STS com aprovação da Directora Nacional ou Director Nacional Adjunto, pela Contabilidade da DNS (Gudo citado por Rosário,2006).

A aquisição dos bens de consumo do Programa é feita com base na proposta do Chefe da STS e aprovação do Departamento Farmacêutico-Central de Medicamentos. Para o caso dos testes de HIV e Sífilis, estes são aprovados também pelo Programa de HIV/SIDA (Gudo citado por Rosário,2006).

A Distribuição dos bens de consumo do Programa é feita com base num mapa de distribuição, proposto pelo Chefe da STS e aprovado pela DNS, pela MEDIMOC e pelo Centro de Abastecimento (Gudo citado por Rosário,2006).

## **2. PROGRAMA DE ESTÁGIO**

O estágio consistiu em duas fases: um pré – estágio e estágio final. O pré – estágio decorreu entre os meados do mês de Fevereiro e terminou no final do mês de Junho, seguido do estágio final que terminou no final do mês de Setembro fazendo um total de 456 horas úteis obedecendo os seguintes períodos:

Tabela 1 – Cronograma do estágio

FASES	PERIODO	ACTIVIDADES
Primeira	01/02/07 a 02/02/07	Registo do Dador
	05/02/07 a 06/02/07	Seleccção do Dador
	07/02/07 a 16/02/07	Colheita de sangue no Banco de Sangue
	19/02/07 a 09/03/07	Grupagem Sanguinea Directa
	12/03/07 a 23/03/07	Grupagem Sanguinea Reversa (Isoaglutininas)
	25/03/07 a 13/04/07	Provas de Compactibilidade
Segunda	16/04/07 a 31/08/07	Serologia de Doenças infecciosas
	2/09/07 a 07/09/07	Produção de Hemocomponentes
	10/09/07 a 30/09/07	Preparação de Reagentes
Terceira	01/10/07 a 30/11/07	Processamento de dados, elaboração e entrega do relatório

## 2.1. OBJECTIVOS

### 2.1.1. Geral

- Conhecer, compreender e saber executar todas as técnicas laboratoriais realizadas no Banco de Sangue do HCM.

### 2.1.2. Específicos

- Adquirir habilidades técnicas para o rastreo de *T. pallidum*;
- Adquirir habilidades técnicas para o rastreo de HIV e Hepatite B;
- Adquirir habilidades técnicas para a produção de hemocomponentes e realização de testes de compatibilidade e tipagem sanguínea;
- Determinar a incidência de *Treponema pallidum* durante o período de estágio;
- Relacionar a incidência de *T. pallidum* com a idade e o sexo dos indivíduos.

### 3. APOIO CONCEDIDO POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo disponibilizou todo o apoio necessário para a execução deste trabalho, desde o apoio moral, material e técnico. A unidade de estágio responsabilizou-se, também, em fornecer refeições durante o exercício das actividades.

### 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A hemoterapia moderna baseia-se no uso selectivo dos componentes do sangue. A utilização correcta dos diversos hemocomponentes associada a um maior controle de qualidade nas diversas etapas, desde a colecta até ao fracionamento, tem tornado a hemoterapia mais segura e, hoje, muitos pacientes beneficiam dos derivados de uma única doação (Calvante, 2006).

O sangue e seus produtos, são utilizados com uma série de propósitos, mas as três principais razões para a transfusão são: correcção da anemia (baixo nível de hemoglobina); reposição de sangue perdido no sangramento, durante uma cirurgia ou após um acidente; reposição de outros componentes do sangue, tais como factores de coagulação (OMS, 1993).

Segundo Andrade *et al.* (2005), o sangue, pela sua característica de produto biológico, mesmo se correctamente preparado e indicado, quando transfundido, carrega intrinsecamente vários riscos, incluindo o de transmitir o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), Vírus da hepatite B e o *Treponema pallidum*.

A segurança da transfusão sanguínea depende de uma série de factores que, em conjunto, podem proporcionar melhor qualidade do sangue e dos hemocomponentes a serem utilizados. Dentre esses factores, os mais importantes são: a selecção da população de doadores, a triagem clínica, a realização dos testes imunohematológicos, a triagem serológica e o uso racional do sangue e hemocomponentes. A triagem serológica tem um significado estratégico especial pois, a partir de um determinado momento, é o único procedimento que vai validar, ou não, a utilização do hemocomponente (Alquézar, 1995).

#### 4.1 *Treponema pallidum*

As duas espécies de *Treponema* que causam doença no Homem são: *T. pallidum* (com três subespécies) e *T. carateum*; todas são morfologicamente idênticas e produzem a mesma resposta serológica nos seres humanos, sendo ambas susceptíveis à penicilina. Os microrganismos são diferenciados pelas suas características epidemiológicas e manifestações clínicas. *T. pallidum* subespécie *pallidum* (denominado *T. pallidum* neste trabalho) é o agente etiológico da doença venérea sífilis (Murray *et al.*, 2004).

A sífilis é uma doença sexualmente transmitida que aflige os seres humanos há muitos séculos. A espiroqueta responsável por esta doença é um patógeno restrito aos seres humanos (Murray *et al.*, 2004).

A sífilis é encontrada no mundo inteiro e constitui a terceira mais prevalente doença bacteriana sexualmente transmissível (depois das infecções causadas por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia*) (Murray *et al.*, 2004)

A via mais comum de transmissão é através do contacto sexual directo. A doença também pode ser adquirida de forma congénita ou através da transfusão de sangue contaminado. A sífilis não é altamente contagiosa; o risco de uma pessoa contrair a doença após um único contacto sexual é estimado em 30%. Entretanto, o contágio é influenciado pelo estágio da doença num indivíduo infectado (Murray *et al.*, 2004).

Segundo Murray *et al.* (2004), a história natural da sífilis pode ser dividida em três fases: sífilis primária, sífilis secundária e sífilis tardia. A sífilis primária caracteriza-se pelo aparecimento do cancro sífilítico que se desenvolve no local onde a espiroqueta é inoculada. A sífilis secundária caracteriza-se por um síndrome (semelhante à gripe) com dor de garganta, febre, mialgias e exantema mucocutâneo generalizado. O exantema e os outros sintomas gradualmente sofrem resolução espontânea, e o paciente entra no estágio latente, ou clinicamente inactivo da doença. Apenas um pequeno número de casos pode evoluir para o estágio terciário da sífilis, caracterizado por uma inflamação crónica e difusa.

## 4.2 Rastreamento de *Treponema pallidum*

O emprego de determinados testes serológicos permite identificar a infecção sífilítica em doadores de sangue, evitando assim a transmissão desta enfermidade por transfusão, mediante a eliminação de unidades reactivas e a orientação para o estudo completo dos doadores (Cura & Windel, 1994).

Até há pouco tempo atrás, a maioria dos testes utilizados na triagem serológica de doadores eram não treponêmicos do tipo VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e RPR (Rapid Plasma Reagin). Os métodos treponêmicos, IgG e ELISA, desenvolvidos mais recentemente, em geral apresentam melhor sensibilidade e especificidade, permitindo detectar casos de infecções anteriores e tendo a vantagem de apresentarem leituras precisas e a possibilidade de automatização do processo (Alquézar, 1995).

Segundo a OMS (1993), qualquer um dos métodos não treponêmicos (VDRL e RPR), ou treponêmicos (IgG e ELISA), podem ser utilizados na triagem serológica, desde que bem padronizados e o pessoal técnico esteja treinado adequadamente para a leitura dos testes não treponêmicos.

Dentre os testes não treponêmicos, os mais correntemente utilizados são os testes de floculação: testes de VDRL e RPR. Estes evidenciam anticorpos chamados reaginas, presentes no soro de pessoas com sífilis e, ocasionalmente, em soros de pessoas com outras doenças agudas ou crónicas (malária, pneumonia viral, tuberculose, lúpus sistémico, etc.) e, também, em determinadas condições fisiológicas (isto é, não patológicas), tais como a gravidez. São reacções de fácil realização, económicas e reprodutíveis, mas não são totalmente específicas. São baseadas na propriedade das reaginas de se combinarem com suspensões de lípidos tecidulares (obtidas de coração de boi no caso do VDRL), originando grânulos cuja a formação é facilitada pela agitação da mistura (Cura & Windel, 1994).

No teste RPR, o antígeno é preparado com uma suspensão de antígeno de VDRL modificada com adição de cloreto de colina, para eliminar a necessidade aquecer o soro; EDTA, para aumentar a estabilidade da suspensão; e partículas muito finas de carvão,

como agente de visualização. Para o teste, o antígeno RPR é misturado ao soro, aquecido ou não, em um cartão com cobertura plástica. Se há anticorpos presentes, estes combinam-se com as partículas lipídicas do antígeno, produzindo floculação. As partículas de carvão coagulam-se com os anticorpos e aparecem grânulos negros sobre o fundo branco do cartão. Se não há anticorpos presentes, a mistura fica com cor cinzenta uniforme. A reação positiva deve ser quantificada quer no teste RPR quer no VDRL (Cura & Windel, 1994).

De acordo com Alquézar (1995), alguns autores acreditam ser desnecessário o rastreamento serológico para a sífilis, em doadores de sangue, devido ao facto do *Treponema pallidum* tornar-se inviável num curto espaço de tempo (72 horas) quando as bolsas são armazenadas na geladeira após a colecta. No entanto, a maioria dos serviços de Hemoterapia continua utilizando algum tipo de teste para a Sífilis, no rastreamento serológico de doadores.

De acordo com a OMS (1993) e Alquézar (1995), a infecção de doadores pelo *T. pallidum* é utilizada como um marcador da conveniência dos doadores. Ela indica possíveis doadores expostos ao risco de doenças sexualmente transmitidas, devido ao seu comportamento sexual, podendo estes, deste modo, apresentarem HIV no período de janela imunológica (período antes da produção de anticorpos).

## **5. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO**

Várias foram as actividades desenvolvidas na unidade de estágio, a colheita e o processamento das amostras de sangue constituíram actividades fundamentais. O laboratório do Banco de Sangue faz três tipos de testes (HIV, HBV, Sífilis) para a determinação da existência de infecções.

## 5.1. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1.1. Material

- Kit RPR
- Kit ENZAIDS HIV 1+2 ELISA
- Kit ELISA HBV SD<sup>BIO LINE</sup> HBs-Ag ELISA 3.0
- Pipetas de precisão de 0,02; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; e 1ml
- Provetas graduadas de 25ml, 100ml e 1000ml
- Centrifuga de mesa (American DADE)
- Centrifuga para sangue total (BECKMAN COULTER J6 MI)
- Aglutinoscopio ou visor iluminado
- Leitor de micro-placas (Espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT)
- Agitador de cartões
- Copos de lavagem de pipetas
- Amostras (soro)
- Pipetas e micropipetas reguláveis de 100µl
- Reagente Antiglobulina (AGH)
- Papel absorvente
- Luvas
- Bata
- Banho-maria a 37°C
- Contentor de resíduos contaminados
- Incubadora de microplacas com termostato (iEMS-ELISA test)
- Dispositivo de lavagem manual, semi-automático ou aparelho de lavagem para placas de microtitulação
- Lupas manuais ou de mesa
- Medidor de pH
- Hipoclorito de Sódio
- Água destilada
- Máquina de lavagem de microplacas (Processador da microplaca WELLWASH AC)

## 5.1.2 Metodologia

### Triagem de Sífilis

1. Pipetou-se 50 µl do controle reactivo e controle não reactivo em duas áreas (círculos) consecutivas do cartão teste, respectivamente.
2. Pipetou-se 50 µl da amostra (soro) em análise em outras áreas do cartão teste.
3. Agitou-se os frascos contendo a suspensão do antígeno RPR antes de usar.
4. Colocou-se uma gota de suspensão nos círculos contendo os controles e as amostras.
6. Colocou-se o cartão teste no Agitador a 100 rpm por 8 minutos
7. Observou-se os resultados após 3 minutos.

### Interpretação dos resultados

(-) Não reactiva. Ausência de aglutinação.

Reactiva (de acordo com a intensidade de aglutinação)

(+) Infima

(++) Média

(+++) Elevada

### Tipagem ABO/Rh

1. Para duas gotas de anti-soros A, B, AB e D, adicionou-se em cada tubo, uma gota de suspensão de eritrócito a 2-4%;
2. Misturou-se bem e agitou-se os tubos gentilmente;
3. Centrifugou-se por 30 segundos a velocidade baixa;
4. Examinou-se a presença de hemólise ou aglutinação;
5. Registou-se o resultado de hemólise ou aglutinação positivo, caso não negativo.

## **Produção de hemocomponentes**

### **a) Sangue Total (ST)**

O ST caracteriza-se como o sangue colectado de um doador, misturado com a solução preservativa e anticoagulante, na proporção de aproximadamente 450 ml de sangue para 63 ml de solução preservativa (Razouk & Reiche citados por Mabunda 2006).

### **b) Concentrado de Hemácias (CH)**

1. Pesou-se e equilibra-se cada unidade de sangue total;
2. Colocou-se as unidades balanceadas na centrífuga.
3. Centrifugou-se pelo tempo e velocidade especificados. Embora a velocidade média seja de aproximadamente 3200 rpm por cerca de cinco minutos, cada centrífuga deve ser calibrada individualmente para assegurar um produto de qualidade.
4. Quando a centrífuga parou completamente, retirou-se cuidadosamente a unidade, colocando-a num expressor;
5. Exprimiu-se o plasma para dentro da bolsa satélite acoplada. O hematócrito pode ser avaliado por retirar bastante plasma até trazer a interface célula/plasma para o canto superior da bolsa ou removendo o peso especificado do plasma.
6. Quando a quantidade desejada do plasma foi retirada, selou-se o tubo (Razouk & Reiche citados por Mabunda 2006).

### **c) Concentrado de plaquetas (CP)**

1. Manteve-se o sangue total em 20 a 24°C, antes e durante a preparação da plaqueta;
2. Centrifugou-se o sangue em rotação leve (em média 3200 rpm). Essa centrifugação separou os eritrócitos, deixando as plaquetas suspensas no plasma.
3. Exprimiu-se o plasma rico em plaquetas para dentro de uma das bolsas satélites
4. Selou-se o tubo entre as hemácias e o plasma. O concentrado de hemácias foi armazenado a 4°C.
5. Centrifugou-se mais uma vez o plasma rico em plaquetas em rotação pesada (3600 rpm por cinco minutos). Isso separou as plaquetas do plasma (Razouk & Reiche citados por Mabunda 2006).

6. Exprimiu-se a maior parte do plasma sobrenadante para a bolsa satélite, deixando aproximadamente 50ml com as plaquetas.

**d) Plasma Fresco Congelado (PFC)**

Seguiu-se os mesmos procedimentos já citados na secção de concentrado de plaquetas.

**Triagem de HIV**

1. Estabeleceu-se cuidadosamente o plano de distribuição e de identificação de amostras; Depois de retirar a microplaca da embalagem, colocou-se directamente (sem pré-lavagem da placa) sucessivamente:
  - 25µl de diluente em cada poço;
  - 75 µl de soro do controlo negativo no poço A1;
  - 75 µl de soro do controlo “cut-off” nos poços B1,C1,D1;
  - 75 µl de soro do controlo positivo no poço E1;
  - 75 µl da primeira amostra (controlo interno negativo) em F1;
  - 75 µl da segunda amostra (controlo interno positivo) em G1;
  - 75 µl do soro das amostras (uma em cada poço);
2. Preparou-se a solução de lavagem diluída (de acordo com o kit);
3. Preparou-se a solução de trabalho do conjugado 2;
4. Retirou-se o tabuleiro e as tiras da embalagem de protecção;
5. Depositou-se directamente, sem pré-lavagem da placa, e em sucção;
6. Sempre que possível, cobria-se com fita adesiva, pressionando bem sobre toda a superfície, para assegurar o selamento;
7. Incubou-se a micro-placa em banho-maria equipado com termostato ou numa incubadora a seco de microplacas, durante 1 hora ± 5 minutos, a 37°C ± 1°C;
8. Retirou-se a fita adesiva. Aspira-se o conteúdo dos poços para um contentor de resíduos contaminados contendo Hipoclorito de Sódio e adicionou-se imediatamente em cada uma delas, um mínimo de 0.370ml de solução de lavagem. Respeitou-se um tempo de imersão mínimo de 30 segundos. Aspirou-se de novo. Repetiu-se a lavagem pelo menos duas vezes;

9. Distribuiu-se rapidamente 100µl da solução de trabalho do conjugado por todos os poços. O conjugado deve ser agitado antes da utilização;
10. Sempre que possível cobria-se com uma nova fita adesiva e incubava-se  $30 \pm 5$  minutos à temperatura ambiente. Nesta incubação não se utiliza película adesiva;
11. Retirou-se a fita adesiva, esvaziou-se todos os poços por aspiração e lavou-se pelo menos cinco vezes, como atrás descrito;
12. Distribuiu-se rapidamente por todos os poços 80µl da solução de revelação da actividade enzimática;
13. Adicionou-se 100 µl da solução de paragem adoptando a mesma sequência e o mesmo ritmo de distribuição que para a solução de revelação. Homogenizou-se a mistura reaccional;
14. Secou-se cuidadosamente a superfície inferior das placas. Pelo menos quatro minutos após a distribuição da solução de paragem e nos trinta minutos que se seguiram, a paragem da reacção, procedeu-se a leitura da densidade óptica a 450/620 - 700nm por meio de um leitor de placas;
15. Antes de se efectuar a transcrição dos resultados, assegurava-se a concordância entre a leitura e o plano de distribuição e de identificação das placas e das amostras.

### **Teste de Hepatite B**

1. Diluiu-se o concentrado "wash buffer" num volume de 19 litros de água destilada;
2. Misturou-se todos os reagentes e incubar a 37° C;
3. Adicionou-se 50 µl de controle e 50µl do conjugado enzimático (de acordo com o kit);
4. Incubou-se durante 1 hora a 37°C;
5. Lavaram-se os poços das placas 5 vezes com solução "wash buffer";
6. Aspirou-se completamente os poços, seguidos da embebição dos mesmos em solução de "washer buffer", durante 30 a 60 segundos. Aspirou-se novamente repetindo o procedimento 4 vezes;

7. Adicionou-se 50 µl de solução corante A e 50 µl de solução corante B em cada poço;
8. Incubou-se a placa a 37° C, durante 15 minutos;
9. Adicionou-se 50 µl de ácido sulfúrico 2 M em cada poço;
10. Procedeu-se à leitura da absorvância em espectrofotometro, a um comprimento de onda de 450nm.

### **Provas de compatibilidade**

1. Pipetou-se duas gotas do soro do paciente, ou dador, em tubos apropriados;
2. Adicionou-se uma gota de hemáceas A, B e O, respectivamente;
3. Centrifugou-se durante 30 segundos “em velocidade baixa”;
4. Misturou-se gentilmente para suspender as células não aglutinadas e examinou-se no Aglutinoscópio;
5. Registou-se a reacção.

## **6. INCIDÊNCIA DE SÍFILIS NOS DADORES DO BSHCM**

Foram incluídos neste estágio 5566 amostras de sangue, submetidas a análises serológicas para a sífilis através de RPR. Essas amostras eram procedentes de dadores voluntários e dadores repositores. Cumpre destacar que os pacientes cujas amostras foram analisadas não apresentavam sintomas de sífilis.

As amostras foram colhidas no período compreendido entre 01 de Julho e 30 de Setembro (Tabelas 1 a 3 em anexo).

Para o cálculo da incidência, foi usado a *taxa de incidência* que, segundo a OMS (2000), mede a incidência (novos casos) num período específico de tempo.

$$\text{Incidência} = (x/y)k$$

Onde:

*x* é o número de novos casos numa população definida que teve o seu início durante um determinado período de tempo;

*y* é a dimensão média de uma população em risco onde a doença pode ocorrer durante o período de tempo específico, geralmente o meio desse período de tempo;

$k$  uma constante, estabelecida convencionalmente ou tem valor tal que a taxa mais pequena no conjunto de dados tem pelo menos um dígito do lado esquerdo do ponto decimal.

## 6.1 Resultados

**Tabela 2** – Distribuição dos resultados do RPR, valores absolutos e relativos encontrados nos indivíduos de acordo com o sexo

sexo				total	
masculino		feminino			
n°	%	n°	%	n°	%
40	64.5	22	35.5	62	100

Do total de 5566 amostras analisadas, 4108 eram indivíduos do sexo masculino e 1458 do sexo feminino. Do total de indivíduos positivos, 40 (64.5%) eram do sexo masculino e 22 (35.5%) do sexo feminino, fazendo um total de 62 positivos (tabela 4, em anexo ).

**Tabela 3** - Distribuição dos resultados do RPR, valores absolutos e relativos encontrados nos indivíduos de acordo com a idade

Idade (anos)	16-19		20 - 29		330 -39		40 - 49		50 - 59		total	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
sexo												
Masculino	10	25	12	30	5	12.5	4	10	9	22.5	40	100
Feminino	7	31.8	9	40.9	4	18.2	2	9.1	0	0	22	100

Quanto á faixa etária, 1165 situavam-se entre 16 e 19 anos, 2293 entre 20 e 29 anos, 1067 entre 30 e 39 anos, 702 entre 40 e 49 anos e 339 incluíam-se na faixa de 50 a 59 anos. Dos 40 dadores positivos do sexo masculino, 10 (25%) situavam-se entre 16 e 19 anos, 12 (30%) entre 20 e 29 anos, 5 (12.5%) entre 30 e 39 anos, 4 (10%) entre 40 e 49 anos e 9 (22.5%) entre 50 e 59 anos de idade. Dos 22 dadores positivos do sexo femenino, 7 (31.8%) situavam-se entre 16 e 19 anos, 9 (40.9%) entre 20 e 29 anos, 4 (18.2%) entre 30 e 39 anos e 2 (9.1%) entre 40 e 49 anos de idade, não se observando dadores de sexo feminino situados na faixa etária entre 50 e 59 anos (tabela 5, em anexo).

Para as avaliações dos resultados de RPR considerando-se o sexo dos dadores, na figura 2 observa-se que a incidência é maior entre as amostras séricas de dadores masculinos que de dadores femininos.

Na figura 3 observa-se maior incidência nos dadores da faixa etária situada entre 20 e 29 anos de idade e do sexo masculino.

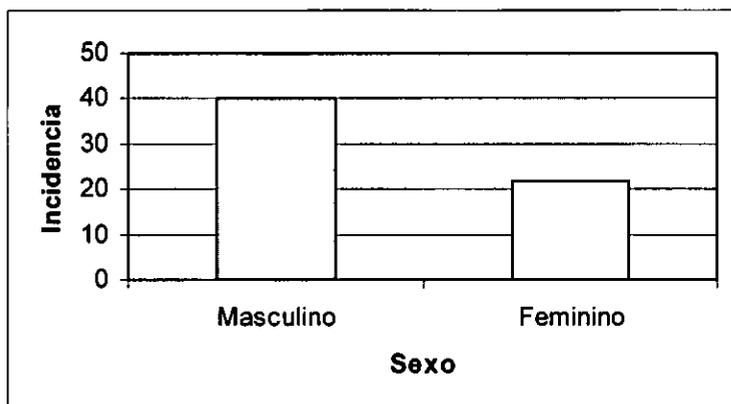
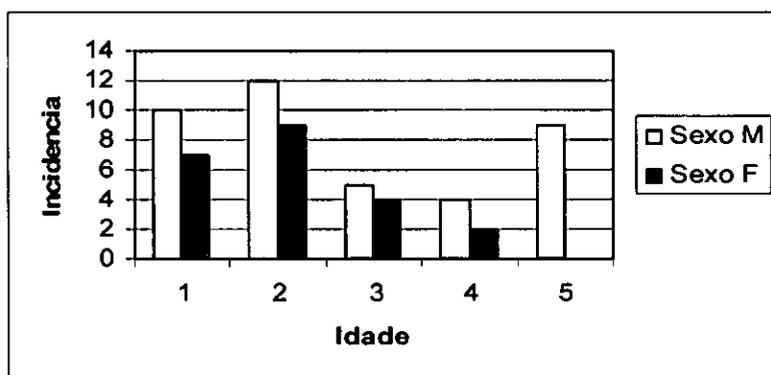


Figura 2- Distribuição dos resultados serológicos positivos para sífilis de acordo com o sexo



Idades: 1= 16 - 19 anos; 2 = 20 - 29 anos; 3 = 30 - 39 anos; 4 = 40 - 49 anos e 5 = 50 - 59 anos.

Figura 3 - Distribuição dos resultados serológicos positivos para sífilis de acordo com a idade

## 6.2 Discussão

A sífilis em Moçambique vem sendo motivo de preocupação visto que se trata de uma das ITS com um número presumivelmente mais alto. Segundo Avelleira (2006), é conhecida desde o século XV e continua como um problema de saúde importante em países desenvolvidos e subdesenvolvidos.

Considerando-se o número de reacções positivas, estimou-se a frequência da seropositividade para a sífilis em 1.1%, existindo a possibilidade de se ter observado falsos positivos e falsos negativos. Estes dados alertam para a necessidade de acesso desburocratizado e rápido as reacções específicas para o diagnóstico de sífilis. A possibilidade de reacções cruzadas com outras doenças como malária, pneumonia viral, tuberculose, HIV e outras doenças faz com que este item seja imperativo no suporte laboratorial para o rastreio dessa doença.

Dois aspectos devem ser enfatizados: o técnico e a população. O aspecto técnico não deve ser subestimado: os processos de esterilização do equipamento utilizado para a colecta sanguínea e aqueles ligados ao acondicionamento e transporte dessas amostras, bem como a competência técnico-científica do profissional para a interpretação dos resultados. É imperativo a necessidade de programas de controle tanto de qualidade interna como externa do laboratório, conforme destaca Jorge (1984). Em relação ao aspecto populacional é bom lembrar os profissionais de saúde outras situações ou enfermidades que apresentam reacção cruzada com o RPR.

Ao considerar-se os dados contidos na tabela 2, verifica-se que a seropositividade para sífilis entre os homens foi, significativamente, maior que entre as mulheres. Este dado reflecte características dos indivíduos atendidos. Os homens, geralmente, procuram atendimento em decorrência de sinais ou sintomas da doença, na maioria dos casos eles são os primeiros a apresentarem os sintomas (Barreto, 1985) enquanto que nas mulheres os sintomas passam despercebidos (na mulher o cancro duro ou protossifiloma, é mais frequente nos pequenos lábios, parede vaginal e colo uterino) algumas submetem-se pelo menos uma vez por ano a uma avaliação na ginecologia e só durante a gestação é que submetem-se rotineiramente a essa avaliação (Mendes *et al.*, 1996). Cumpre destacar que o maior número de dadores eram do sexo masculino, visto que estes podem doar sangue 4

vezes ao ano (de 3 a 3 meses), enquanto que os dadores do sexo feminino doam 3 vezes ao ano (de 4 a 4 meses). Estas, muitas das vezes, na pré-triagem são excluídas temporariamente quando estão menstruadas, grávidas ou a amamentar. O outro aspecto que não deve ser deixado de lado é o facto dos homens terem várias parceiras, terem vergonha de ir a uma consulta de ginecologia quando não se sentem bem, porque têm vergonha da situação ou não tem a cultura de ir visitar um ginecologista, outros mesmo com sintomas ignoram por falta de informação e alguns interrompem a medicação quando acham que se sentem bem.

Em relação a idade, verifica-se que a seropositividade para sífilis foi maior em dadores entre 20 e 29 anos de idade visto que estes constituem um grupo com comportamento de risco e profissionais de sexo (Wong,1999; Mgnone,2002; Dilley,2004; Buchacz,2005).

Para finalizar, considero que este trabalho possa, realmente, auxiliar tanto a equipe de saúde responsável pelo atendimento directo dos dadores, como o laboratório responsável pelas reacções serológicas, propiciando conhecer melhor a questão da população com a qual trabalha. Para as autoridades sanitárias, imagino que os resultados deste estudo possa lhes situar indicando a necessidade de novas estratégias de educação e atendimento populacional, no tocante a doença em estudo.

## **7. PERSPECTIVA CRÍTICA DO ESTÁGIO**

O Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo foi o primeiro Banco de Sangue do País, e continua sendo o Banco de Sangue de referência a nível nacional. Verificou-se que existe uma operacionalização parcial das normas internacionais recomendadas pela OMS (Princípios Operacionais Padronizados) para a preparação das amostras.

É importante que as amostras estejam em boas condições para que se atinjam os resultados correctos e precisos (para evitar falsos positivos e falsos negativos), refiro-me a algumas amostras mal conservadas o que pode favorecer a entrada de uma substância não desejada, sangue guardado por muito tempo, colheita mal feita com agulha muito fina e algumas das amostras aparecem hemolizadas. Segundo Fischbach e Dunning III (2005), as amostras devem ser observadas antes de 48h depois da sua colheita, sob o risco de

identificar alguns falsos positivos, visto que nestas amostras podem produzir-se algumas partículas que podem ser reconhecidas como reaginas e induzir a um falso diagnóstico.

## 8. CONCLUSÃO

- Com o estágio no BSHCM foi possível conhecer, compreender, saber executar e aperfeiçoar habilidades técnicas laboratoriais realizadas lá: rastreamento de *T. pallidum*, rastreamento de HIV e Hepatite B, produção de hemocomponentes, realização de testes de compatibilidade e tipagem sanguínea.
- A taxa de incidência de sífilis foi maior nos dadores do sexo masculino, 64.5%, em relação a dadores do sexo feminino, 35.5%.
- Em relação á faixa etária, a taxa de incidência foi maior entre 20 e 29 anos (30%).
- Apesar de algumas dificuldades que foram surgindo em algum momento do estágio foi possível alcançar os objectivos traçados .

## 9. RECOMENDAÇÕES

Para evitar a contaminação dos funcionários recomendo que os mesmos cumpram á risca as regras de biosegurança recomendadas pela OMS.

Para garantir a segurança do laboratório e dos funcionários recomendo ao BSHCM a aquisição de um extintor e outros meios de protecção para incêndios.

A respeito dos prazos que se encontram nos rótulos das embalagens, é necessário verificar muito bem para evitar trabalhar com material fora do prazo sendo assim, recomendo o uso de kits dentro do prazo para evitar a obtenção de falsos resultados. E a solicitação e substituição imediata dos kits fora de prazo.

No que diz respeito á conservação e trasporte de amostras de sangue, é necessário que se efectue em tubos de ensaio com o máximo de segurança possível e para isso recomenda-se o uso de tubos de ensaio que contenham uma tampa para isolar e não permitir a contaminação.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- # Alquézar A. S. (1995). Triagem serologica em Unidades Hemoterapicas. Boletim COSAH.
- # Andrade, F.B., F.C. Carvalho, P.G. Carvalho, A.T. Dias, J. Heukelbach, J.A. Queiroz (2005). Evaluation of a Combined Antigen/ Antibody Test for The Identification of Recent HIV I/II Infection in Blood Donors. vol.37. (3). Brasil.RBAC.169-174pp.
- # Avelleira, J.C.R. e Bottino,G, (2006). Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle: Anais Brasileiros de Dermatologia.vol. 81(2).Brasil.111-126pp.
- # Barreto, S.M.V.,Gonçalves, A.L. e Costa, J.C. (1985). Reacções de Wassermann em gestantes atendidos em Hospital de Ribeirão Preto (Brasil),no período de 1976-1981. Rev Saúde Pública. 19:108-122.
- # Buchacz, K., Greenberg, A., Onorato, I., Janssen, R. (2005). Syphilis epidemics and human immunodeficiency virus (HIV) incidence among men who have sex with men in the United States: implications for HIV prevention. Sex\_Transm Dis.vol.32 (10 Suppl).73-79pp.
- # Calvante, T.A. (2006). O Sangue e seus Derivados. [www.hemonline.com.br] Consultado a 27 de Maio de 2007.
- # Cura E. e S. Wendel (1994). Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serologia de los Bancos de Sangre.OPAS.Washington D.C.

- # Dilley, J.W., Klausner, J.D., McFarland, W., Kellogg, T.A., Kohn, R., Wong, W., *et al.* (2004). Trends in primary and secondary syphilis and HIV infections in men who have sex with men – San Francisco and Los Angeles, California. 1998-2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.vol.53.USA.575-578pp.
- # Fischbach, F.T. e Dunning III, M. B. (2005).Manual de enfermagem,Exames Laboratoriais e Diagnóstico. 7ª edição. Edictora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil.738pp.
- # Jorge, J.C. (1984). Controle de qualidade de reacções sorológicas para sífilis, em laboratórios de saúde de Florianópolis,Santa Catarina.Tese de Doutorado.Faculdade de Saúde Pública da USP.São Paulo.134pp.
- # Mabunda, N.E.J. (2006) Uso da Técnica Elisa e Testes Rápidos para Triagem de HIV no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo .Trabalho de Culminação do Curso.UEM. Maputo.57pp
- # Mendes,K.H.C.,Duarte,G.,Gir,E.,Aleixo,Y.A.,Capuano,D.M.(1996).Sosopositividade para sífilis em amostras sanguíneas,procedentes de quatro regiões (136 bairros) da cidade de Ribeirão-SP.Medicina.Ribeirão Preto.29:123-129pp.
- # Mgnone, C.S., Passey, M.E., Anang, J., Peter, W., Lupiwa, T.,Russell, D.M., *et al.* (2002).Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted diseases in two major cities in Papua New Guinea. Sex Transm Dis.vol.29.265-270.
- # Murray, P. R., K.S. Rosenthal, G.S Kobayashi, M.A. Pflaller (2004). Microbiologia Médica .4ª edição. Guanabara Koogan. 762pp.
- # OMS (Organização Mundial da Saúde) (1993).Triagem Para HIV e Outros Agentes Infecciosos. Modulo 2. Genebra .160pp.

- ✚ OMS (Organização Mundial da Saúde) (2000). Introdução á Epidemiologia Básica e aos principios de estatísticas para o controlo das doenças tropicais. Parte I. Manual de Aprendizagem. Genebra. 23-30pp.
  
- ✚ Rosário, A. (2006). Técnicas de Rotina Para a Tipagem Sanguínea e Provas de Compatibilidade em Utilizadores do Banco de Sangue. Trabalho de Culminação do Curso. UEM. Maputo. 27pp
  
- ✚ Wong, M.L., Chan, R.K.W., Chua, W.L., Wee, S. (1999). Sexually transmitted diseases and condoms use among female freelance and brothel-based sex workers in Singapore. Sex Transm Dis. vol. 26. Singapura. 593-600pp.
  
- ✚ World Health Organization (2003). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2<sup>nd</sup> ediction. Geneva. 69pp.

# Anexos

Tabelas de resultados (dados brutos correspondentes ao período de Julho, Agosto e Setembro)

Tabela 1

Mês de Julho							
Data	Sexo		Idade				
	Masc	Femin	1	2	3	4	5
1	62	18	31	30	10	3	6
2	57	22	26	25	16	8	4
3	51	44	18	28	21	14	14
4	44	17	14	29	12	2	4
5	58	27	16	34	24	7	4
6	12	4	0	6	5	4	1
7	51	25	36	30	8	1	1
8	47	29	27	32	9	4	4
9	48	40	45	19	17	6	1
10	44	30	32	22	17	3	0
11	60	20	13	20	20	15	12
12	2	0	0	0	0	0	2
13	38	13	8	20	9	9	5
14	61	15	3	33	17	16	7
15	50	18	3	29	15	17	4
16	45	38	5	29	24	21	4
17	62	38	8	42	33	11	6
18	53	2	0	55	0	0	0
19	33	18	15	21	6	6	3
20	36	22	2	27	16	9	4
21	52	7	7	35	12	4	1
22	43	8	5	34	10	2	0
23	34	14	5	20	17	6	0
24	56	10	5	30	15	9	7
25	39	1	1	39	0	0	0
26	8	5	4	5	0	0	4
27	42	7	8	17	5	12	7
28	61	9	5	34	12	8	11
29	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1249</b>	<b>501</b>	<b>342</b>	<b>745</b>	<b>350</b>	<b>197</b>	<b>116</b>

Legenda: Idade 1 - 16 e 19 anos; idade 2 - 20 e 29 anos; idade 3 - 30 e 39 anos; idade 4 - 40 e 49 anos; idade 5 - 50 e 59 anos

Tabela 2

Data	Mês de Agosto						
	Sexo		Idade				
	Masc	Femin	1	2	3	4	5
1	46	8	2	23	17	7	5
2	50	11	2	25	20	10	4
3	48	7	8	20	11	13	3
4	6	3	0	6	1	2	0
5	14	14	1	6	5	13	3
6	37	13	0	21	15	4	10
7	47	17	8	29	15	9	3
8	53	18	22	23	11	11	4
9	60	21	9	49	15	6	2
10	69	8	3	49	12	8	5
11	23	2	0	8	11	6	0
12	15	22	11	18	5	1	2
13	58	9	9	25	17	10	6
14	90	17	3	56	21	16	11
15	91	12	5	69	15	11	3
16	95	9	7	51	12	18	16
17	172	13	7	125	27	14	12
18	15	3	1	8	6	1	2
19	15	11	3	10	6	4	3
20	90	14	7	45	24	25	3
21	63	10	23	30	11	7	2
22	66	11	1	14	20	36	6
23	34	6	4	19	8	6	3
24	57	23	4	41	23	9	3
25	11	3	0	2	5	3	4
26	32	30	10	15	14	9	14
27	61	13	7	27	16	20	4
28	70	29	6	53	24	12	4
29	101	24	4	58	32	26	5
30	56	26	7	29	26	15	5
31	66	14	8	36	13	18	5
<b>Total</b>	<b>1711</b>	<b>421</b>	<b>182</b>	<b>990</b>	<b>458</b>	<b>350</b>	<b>152</b>

Legenda: Idade 1 - 16 e 19 anos; idade 2 - 20 e 29 anos; idade 3 - 30 e 39 anos; idade 4 - 40 e 49 anos; idade 5 - 50 e 59 anos

Tabela 3

Mês de Setembro							
Data	Sexo		Idade				
	Masc	Femin	1	2	3	4	5
1	7	1	0	3	2	2	1
2	29	16	8	23	7	5	2
3	45	37	44	26	5	5	2
4	56	31	56	14	3	9	5
5	62	41	43	35	12	6	8
6	78	18	2	53	27	8	6
7	5	2	0	3	3	1	0
8	9	16	6	13	4	2	0
9	75	37	43	39	14	10	6
10	66	27	47	23	13	8	2
11	83	23	38	32	15	19	2
12	62	18	13	32	23	4	8
13	40	17	11	21	15	8	2
14	4	5	5	0	1	1	2
15	82	23	43	29	20	9	4
16	86	10	51	31	7	5	2
17	36	26	30	13	12	4	3
18	52	37	31	32	13	9	4
19	45	17	31	9	13	9	0
20	5	0	1	3	0	0	1
21	89	43	59	48	13	9	3
22	41	34	21	22	22	8	2
23	41	26	32	26	6	3	0
24	39	29	25	22	7	8	6
25	11	2	1	6	2	3	1
26	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1148</b>	<b>536</b>	<b>641</b>	<b>558</b>	<b>259</b>	<b>155</b>	<b>71</b>

Legenda: Idade 1 - 16 e 19 anos; idade 2 - 20 e 29 anos; idade 3 - 30 e 39 anos; idade 4 - 40 e 49 anos; idade 5 - 50 e 59 anos

Tabela - 4 Distribuição de resultados de RPR de acordo com a sexo

Mês	Masculino						Feminino						Total geral	
	Positivo		Negativo		Total		Positivo		Negativo		Total		n°	%
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%		
Julho	11	0.9	1238	99.1	1249	100	4	0.8	497	99.2	501	10	1750	31.4
Agost	21	1.2	1690	98.8	1711	100	13	3	408	97	421	100	2132	38.3
Setem	8	0.7	1140	99.3	1148	100	5	0.9	531	99.1	536	100	1684	30.3
Total geral	40	1	4068	99	4108	100	22	1.5	1436	98.5	1458	100	5566	100

Tabela - 5 Distribuição de resultados de RPR de acordo com a idade

Idade	Masculino										Feminino										Total geral					
	1		2		3		4		5		Total		1		2		3		4		5		Total		n°	%
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%		
Julho	2	18.2	1	9.1	1	9.1	1	9.1	6	54.5	11	100	2	50	1	25	1	25	0	0	0	0	4	100	15	24.2
Agosto	6	28.6	9	42.8	3	14.3	1	4.8	2	9.5	21	100	4	30.8	6	46.1	2	15.4	1	7.7	0	0	13	100	34	54.8
Setembro	2	25	2	25	1	12.5	2	25	1	12.5	8	100	1	20	2	40	1	20	1	20	0	0	5	100	13	21
Total geral	10	25	12	30	5	12.5	4	10	9	22.5	40	100	7	31.8	9	40.9	4	18.2	2	9.1	0	0	22	100	62	100

Legenda: Idade 1 - 16 e 19 anos; idade 2 - 20 e 29 anos; idade 3 - 30 e 39 anos; idade 4 - 40 e 49 anos; idade 5 - 50 e 59 anos



B10-238

131

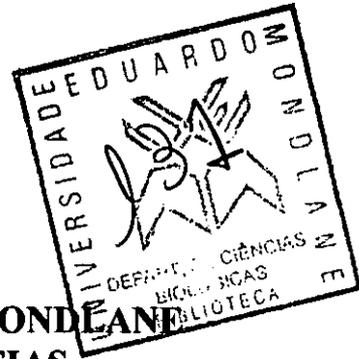
**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**



**EFEITO DAS ENDOMICORRIZAS NO CRESCIMENTO  
DE PLANTAS DAS DUNAS**

**AUTOR: JEREMIAS JOAQUIM MOCUBA**



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**TEMA: EFEITO DAS ENDOMICORRIZAS NO CRESCIMENTO  
DE PLANTAS DAS DUNAS**

**AUTOR: JEREMIAS JOAQUIM MOCUBA**

**SUPERVISOR: Prof. Dr. ORLANDO QUILAMBO**

Maputo, Junho de 2005

### **Agradecimentos**

- Agradeço ao meu supervisor Prof. Doutor Orlando Quilambo pela sua prontidão, vontade e encorajamento manifestados desde o início do trabalho.
- À dra. Célia Martins pela colaboração prestada no trabalho
- Ao dr. Alexandre Sitoi pela sua colaboração no trabalho
- Ao meu colega Sofrimento Matsinhe pela sua colaboração na identificação das espécies de plantas que foram objecto deste trabalho.
- Ao meu colega Sérgio Gomane pelo intercâmbio científico e interajuda durante o trabalho
- Ao meu colega, Sr. Maurício Lipassula pela sua ajuda nos trabalhos laboratoriais.
- Ao Sr. Ernesto, pela sua ajuda no transplante das estacas
- Aos colegas Amélia Cumbe, Célia Michangula, Holanda Mahanjane, Telma Magaia, Bruno Nhancale, Jossias Joaquim e Gido Mulhovo pelo seu incentivo durante o trabalho.
- Aos trabalhadores das estufas e viveiros do Departamento de Ciências Biológicas pela sua ajuda na preparação do campo de experimentação e cuidado das plantas.
- Aos docentes, colegas, amigos, familiares, trabalhadores e todos aqueles que directa e indirectamente contribuíram neste trabalho os meus sinceros agradecimentos

Declaração

Declaro por minha honra que este trabalho com o título “efeito das endomicorrizas no crescimento de plantas das dunas” é da minha autoria e que os dados que nele constam constituem a realidade colhida em campo.

Jeremias Joaquim Mocuba

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Joaquim Mocuba e Graciana Muecopia e aos meus irmãos pelo seu amor, incentivo, acompanhamento e participação na minha carreira estudantil.

## Resumo

*Carpobrotus dimidiata* (da família Aizoaceae) e *Ipomoea pes-caprae* (da família Convolvulaceae) são espécies de plantas características das areias das dunas e adaptadas ao stress de falta de nutrientes, água e excesso de sal que caracterizam estes ecossistemas. A distribuição e abundância destas espécies em Moçambique é pouco conhecida.

O objectivo deste trabalho foi de analisar o efeito da aplicação do inóculo de fungos endomicorrízicos no desenvolvimento das espécies *Carpobrotus dimidiata* e *Ipomoea pes-caprae* e no nível de colonização das suas raízes.

O trabalho foi feito em campo aberto, arredores das estufas do Departamento de Ciências Biológicas, Campus principal da Universidade Eduardo Mondlane.

O ensaio começou em Março de 2004 com a produção do inóculo de fungos micorrízicos que foi aplicado no plantio das estacas de espécies acima mencionadas em Junho do mesmo ano. O inóculo foi depositado sobre um solo arenoso usado para preencher as covas e que serviu de meio de crescimento das plantas. Foram feitas três colheitas a partir de Agosto de 2004 e o intervalo de tempo de uma colheita para outra foi de 3 semanas. Em cada colheita foram analisadas 15 plantas com inóculo e 15 sem inóculo. O trabalho laboratorial consistiu na contagem do número de raízes, número de folhas; medição do comprimento máximo de raiz, medição dos pesos frescos e pesos secos das três partes da planta (raízes, caule e folhas) e determinação do nível de colonização das raízes por fungos micorrízicos.

A experiência mostrou que o uso do inóculo de fungos micorrízicos na propagação da *Carpobrotus dimidiata* por meio de estacas é uma forma de promover o seu desenvolvimento vegetativo. As estacas da *Ipomoea pes-caprae* não formaram raízes e todas murcharam prematuramente.

## Índice

1. Introdução-----	1
2. Objectivos-----	7
3. Hipóteses-----	7
4. Área de estudo-----	7
5. Material e métodos-----	7
5.1 Material-----	7
5.2 Métodos-----	8
5.2.1 Produção do inóculo-----	8
5.2.2 Propagação das estacas-----	9
5.2.3. Plano de colheita-----	10
6. Parâmetros medidos e calculados-----	10
6.1. Nível de colonização das raízes por fungos micorrízicos-----	10
6.2. Crescimento das plantas-----	12
6.2.1. Cálculo dos parâmetros de crescimento derivados-----	12
7. Análise estatística dos resultados-----	14
8. Resultados-----	15
8.1 Taxas de sobrevivência e a capacidade de regeneração das estacas-----	15
8.2 Efeitos da inoculação na percentagem de colonização das raízes por fungos micorrízicos-----	16
8.3 Efeito da inoculação na frequência de colonização das raízes de plantas-----	17
8.4 Efeito da inoculação no peso fresco total da planta-----	18
8.5 Efeito da inoculação no peso seco total da planta-----	19
8.6 Efeito da inoculação na percentagem da matéria seca-----	20
8.7 Efeito da inoculação no número de raízes por planta-----	21
8.8 Efeito da inoculação no comprimento máximo da raiz-----	22
8.9 Efeito da inoculação no peso seco da raiz-----	23
8.10 Efeito da inoculação na razão do peso seco da raiz-----	24
8.11 Efeito da inoculação no peso seco do caule-----	25
8.12 Efeito da inoculação na razão do peso do caule-----	26

8.13 Efeito da inoculação no número de folhas por planta-----	27
8.14 Efeito da inoculação na área foliar-----	28
8.15 Efeito da inoculação no peso seco da folha-----	29
8.16 Efeito da inoculação na razão da área da folha-----	30
8.17 Efeito da inoculação na área específica da folha-----	31
8.18 Efeito da inoculação no peso específico da folha-----	32
8.19 Efeito da inoculação na razão do peso seco da folha-----	33
8.20 Correlação entre a percentagem de colonização e acumulação de matéria seca vegetal-----	34
9. Discussão-----	35
9.1 Taxas de sobrevivência e capacidade de regeneração das estacas-----	35
9.2 Efeito da inoculação na percentagem de colonização das raízes por fungos micorrizicos-----	36
9.3 Efeito da inoculação no peso seco total da planta-----	37
9.4 Efeito da inoculação no desenvolvimento da raiz-----	38
9.5 Efeito da inoculação no desenvolvimento do caule-----	39
9.6 Efeito da inoculação no desenvolvimento da folha-----	39
9.7 Correlação entre a percentagem de colonização e acumulação de matéria seca vegetal -----	42
10 Conclusões-----	43
11 Recomendações-----	44
12 Bibliografia-----	45
13 Anexos-----	53

Lista de abreviaturas

- AEFo -----área específica da folha  
AFo ----- área foliar  
Km----- constante de Michaelis  
MA ----- micorrizas arbusculares  
%M ----- intensidade de infecção  
Mat. S ----- matéria seca  
PCNB ----- Pentachloronitrobenzeno  
PEFo ----- peso específico da folha  
PFT----- peso fresco total  
PSC ----- peso seco do caule  
PSFo ----- - peso seco da folha  
PSR ----- peso seco da raiz  
PST -----peso seco total da planta  
RAFo ----- razão da área foliar  
RPSC ----- razão do peso seco do caule  
RPSFo -----razão do peso da folha  
RPSR ----- razão do peso seco da raiz  
VAM ----- micorriza vesiculo-arbuscular

TEMA: O EFEITO DAS ENDOMICORRIZAS NO CRESCIMENTO DE PLANTAS DAS DUNAS.

1. Introdução

Micorriza é um sistema simbiótico de raízes de plantas e os fungos que contribuem na absorção de nutrientes e água (Hock & Varma, 1998). Os fungos micorrizicos estão associados a quase todas as plantas, porém certas espécies das famílias Cyperaceae, Juncaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae e Brassicaceae (Crucifereae) são caracteristicamente não micorrizicas (Paul & Clarck, 1996).

As micorrizas podem ser divididas em dois grupos, ecto e endo-micorrizas. Nas ectomicorrizas os fungos formam uma bainha em torno da raiz dando origem à raízes mais pequenas, mais grossas, mais frágeis e com uma coloração diferente das raízes não infectadas. Para além disso, as raízes colonizadas desenvolvem muitos ramos, também eles pequenos e grossos (Hudson, 1992; Schinner *et al.*, 1995). Da parte externa da bainha partem hifas que se dispersam para o solo atingindo longas distâncias, e da parte interna da bainha partem as hifas que penetram o córtex da raiz a uma profundidade de duas camadas de células (Hudson, 1992). Durante a penetração as hifas crescem entre as células epidérmicas e corticais, não sendo usual a invasão destas. Este tipo de crescimento, entre as células da raiz, conduz à formação de estruturas características, a rede de Hartig (Raven *et al.*, 1992; Hudson, 1992).

As ectomicorrizas são características de certos grupos de árvores e arbustos encontrados principalmente em regiões temperadas. Esse grupo inclui a família das faias e carvalhos (Fagaceae), a família dos pinheiros (Pinaceae), bem como em famílias bem representadas nos trópicos, especialmente alguns membros de Myrtaceae e Dipterocarpaceae (Raven *et al.*, 1992; Hudson, 1992).

Nas endomicorrizas a hifa penetra nas células corticais da planta, onde são formadas pequenas estruturas densamente ramificadas, com aspecto de árvores minúsculas, os arbúsculos, ou dilatações denominadas vesículas. As endomicorrizas

são frequentemente chamadas micorrizas vesículo-arbusculares (VAM), embora, actualmente, se fale em fungos micorrizicos arbusculares (MA), uma vez que todos os fungos desta associação obrigatoriamente formam arbúsculos, mas nem sempre vesículas (Raven *et al.*, 1992). Nas endomicorrizas não se dá a formação de uma bainha externa, existe uma rede frouxa e esparsa de hifas, geralmente alinhadas paralelamente ao comprimento da raiz. As hifas crescem a partir desta rede para o solo e podem se dispersar até alguns centímetros da raiz (Hudson, 1992; Richards, 1987).

As endomicorrizas são as mais comuns e são encontradas nas Briófitas, Pteridófitas, Gimnospermicas, excluindo as Pinaceae, que possuem ectomicorrizas, e em quase todas as famílias de Angiospermicas (Hudson, 1992).

As associações micorrizicas são importantes no aumento da obtenção de nutrientes para as plantas sob condições de sua escassez especialmente nitrogénio e fósforo, absorção de água e no fornecimento de produtos fotossintéticos aos fungos (Atlas & Bartha, 1987).

O aumento na absorção do fósforo por fungos micorrizicos pode ser explicada através dos seguintes aspectos: os fungos podem aumentar a área de absorção efectiva da raiz e, assim, o fosfato disponível na maior parte da rizosfera e arredores é explorado; as hifas são mais eficientes (como consequência do seu tamanho e distribuição espacial) que raízes na competição com microorganismos livres do solo para o fósforo recentemente solubilizado, as hifas têm maior afinidade na absorção (baixo Km) permitindo uma absorção mais eficaz de baixas concentrações do fósforo na solução do solo e possivelmente valores abaixo do limiar de absorção das raízes (Smith & Read, 1997). A maior parte do fósforo no solo encontra-se na forma orgânica (Hudson, 1992; Schinner *et al.*, 1995; Fritz & Noggle, 1983) e principalmente como cálcio inositol hexafosfato, comumente chamado de fitato de cálcio (Speir & Ross, 1978; Malcolm, 1983). Os fungos das micorrizas contribuem para a solubilização dos minerais de fosfatos através da produção de CO<sub>2</sub> no processo de respiração e através da excreção de ácidos orgânicos; alguns fungos ectomicorrizicos produzem fosfatases que contribuem nos processos de mineralização do fósforo orgânico não disponível para as plantas (Paul

& Clark, 1996), mas a sua síntese não foi confirmada em fungos endomicorrizicos (Smith & Read, 1997).

Os fungos das micorrizas têm também a capacidade de extrair nitrogénio e transportá-lo do solo para a planta através do aumento da área de superfície de absorção. Em muitos ecossistemas naturais uma larga fracção do nitrogénio disponível no solo é amónio, e não nitrato (Van Kessel *et al.*, 1985). Nestas condições, os fungos endomicorrizicos transportam o  $\text{NH}_4^+$  prontamente para a planta (Smith & Smith, 1990). Aumentos no nível de nodulação e taxa de fixação de nitrogénio com micorrizas foram observadas nas associações simbióticas entre os legumes e as bactérias globalmente denominadas por Rhizobia, nas associações entre certas famílias de plantas (não leguminosas) e bactérias do género Frankia, actinorhizas; e também nas associações de organismos livres que habitam a rizosfera de plantas (Azospirillum, Azotobacter) (Varma, 1979; Singh & Varma, 1988; Singh *et al.*, 1988; Barea, 1992; Barea *et al.*, 1992).

O nitrogénio está presente em concentrações suficientemente altas em muitos solos onde ocorrem fungos micorrizicos tendo, assim, maior coeficiente de difusão. Portanto, as micorrizas têm pequeno efeito no aumento do nitrogénio na nutrição da planta. O maior efeito na absorção de nutrientes é notório no fósforo (Paul & Clarck, 1996).

Plantas micorrizadas são geralmente menos susceptíveis à seca do que as não micorrizadas (Paul & Clarck, 1996). A resistência à seca pode ser devida a boa agregação do solo na rizosfera das plantas micorrizadas induzida pelas hifas, que pode permitir um bom escoamento/circulação da água do solo para as raízes micorrizadas, resultando na melhoria na absorção de água das plantas MA (Hock & Varma, 1998). Esta também pode ser devida ao aumento do fósforo na nutrição da planta (Graham & Timmer, 1984; Fitter, 1988); ou a outros mecanismos tais como, o aumento na absorção da água do solo pelas hifas; retenção da água no simplasto (Levy & Krikum, 1980; Augé *et al.*, 1987; Augé & Stodola, 1990; Davies *et al.*, 1992). As micorrizas arbusculares diminuem o efeito prejudicial de alguns organismos no crescimento das plantas nomeadamente, o dano causado por nemátodos, fungos, ou bactérias patogénicas (Dehne, 1992; Cayrol, 1991). O aumento desta resistência

aos agentes patógenos é considerado como resultado do aumento na absorção não só do fósforo mas de todos nutrientes que são absorvidos de forma substancial quando a planta está associada à fungos micorrizicos. Outros mecanismos incluem a activação de vias metabólicas envolvidas nos mecanismos de defesa da planta a seguir à infecção com MA (Gianinazzi, 1991).

As hifas dos fungos micorrizicos exercem um papel muito importante na estabilização dos agregados do solo (Hock & Varma, 1998), especialmente nos solos de areia grossa (Paul & Clarck, 1996). A estabilização das dunas de areia e de antigas explorações mineiras é facilitada por plantas extensivamente infectadas por fungos micorrizicos (Paul & Clarck, 1996). As hifas dos fungos criam agregados do solo possivelmente através da produção de polissacarídeos em adição aos que são produzidos por bactérias da rizosfera que agregam partículas do solo (Bethlentavay & Linderman, 1992). As hifas externas ligam os grãos de areia directamente, aumentando a estabilidade dos solos das dunas ou mesmo de praias arenosas (Hock & Varma, 1998).

A expressão das endomicorrizas em termos de crescimento das plantas é profundamente condicionada por factores ambientais. Práticas de manejo do solo como a lavoura podem afectar profundamente a acção das endomicorrizas (Hock & Varma, 1998). A perturbação do solo pode reduzir o potencial de infecção dos fungos através da danificação de esporos, propágulos e rede de hifas (Evans & Miller, 1990). A perturbação pode alterar o ambiente físico, químico ou biológico do solo que em consequência afectará a colonização ou a germinação dos propágulos MA (Stahl *et al.*, 1988); a perturbação pode eliminar plantas hospedeiras provocando mudanças no suprimento de carbono disponível para os fungos (Bellgard, 1992).

A aplicação de fertilizantes é outro factor importante a ter em conta pois o uso de altos níveis de fósforo reduz a infecção e/ou actividade da simbiose. Adicionalmente, alguns dos pesticidas usados podem prejudicar o desenvolvimento e o funcionamento das associações micorrizicas, como foi demonstrado para os fungicidas PCNB (Pentachloronitrobenzeno) por Shuepp & Bodmer (1991) e Etridiazol por Gianinazzi (1991).

A acidez do solo é outro factor que regula a germinação de esporos e pode, em parte, explicar a distribuição dos fungos micorrícos em diferentes solos (Mosse *et al.*, 1981; Porter *et al.*, 1987). A solubilidade do  $MnO_2$  aumenta com a acidez do solo e este pode ter um efeito inibidor na germinação dos esporos. A toxicidade do Mn e insuficiência do Ca são responsáveis pelos baixos níveis da eficácia dos fungos micorrícos observados a baixos níveis de pH (Habte & Soedarjo, 1995; Soedarjo & Habte, 1995).

A exudação das raízes afecta o desenvolvimento do micélio na sua fase pré-simbiótica e o desenvolvimento do mesmo na fase simbiótica, ao agir sobre a taxa de crescimento das hifas, frequência de ramificação e direcção de crescimento (Koske & Gemma, 1992; Giovanetti *et al.*, 1996). Os exudatos voláteis libertos das raízes são responsáveis pela resposta quimiotrópica, agindo como mensageiros que afectam a direcção e/ou a taxa do crescimento do micélio (St John *et al.*, 1983).

Os flavonoides foram consideradas como fazendo parte das moléculas mensageiras que estão envolvidas na interacção inicial dos simbiontes das micorrizas arbusculares (Gianinazzi- Pearson *et al.*, 1989).

Muitas sugestões foram propostas para explicar o efeito estimulador que os microrganismos do solo têm na germinação e crescimento dos esporos de fungos MA e que incluem:

- 1) Desintoxicação do meio - os microrganismos removem do meio inibidores de crescimento dos fungos micorrizicos ;
- 2) Utilização dos inibidores sintetizados pelos fungos MA- compostos formados pelos fungos podem limitar o seu próprio crescimento (Watrud *et al.*, 1978). A utilização destes compostos pelos microrganismos pode eliminar a auto-inibição dos fungos MA.
- 3) Produção de compostos estimulantes – substâncias biologicamente activas tais como aminoácidos, hormonas vegetais, vitaminas e outros compostos orgânicos podem ser produzidos por microrganismos do solo (Lynch, 1990) e também aumentam a taxa de crescimento dos fungos MA.

O aumento da desertificação de extensas áreas da terra está a atingir proporções alarmantes. A deterioração estrutural dos solos (devido a remoção da vegetação natural, intensidade excessiva de cultivo, sobrepastoreio, etc); temperaturas extremas, chuvas irregulares, mau uso dos solos (construção de fornos de tijolos), e a remoção das camadas superficiais dos solos (durante o nivelamento das margens dos rios, construção de cais ou devido a acção da água) são factores que contribuem para a erosão das paisagens (Hock & Varma, 1998). A aplicação em larga escala de fungos MA em ambientes desfavoráveis promete estimular a saúde das plantas, a fertilidade dos solos e a prevenção da erosão (Hock & Varma, 1998). A importância das micorrizas arbusculares (MA) no estabelecimento e crescimento de plantas das areias das dunas foi primeiro sugerida por Nicolson 1959 citado por Harley & Smith (1983). Desde então, o papel dos fungos MA na atenuação dos efeitos de baixos níveis de fósforo no solo e stress hídrico em plantas numa variedade de habitats tem sido documentada ( Harley & Smith, 1983). Os solos arenosos das dunas constituem um meio especialmente favorável para o desenvolvimento dos fungos MA por causa do seu baixo conteúdo em fósforo (Koske & Halvorson, 1981; Ranwell, 1972), e os fungos MA são necessários para que ocorra uma estabilização significativa das areias das dunas (Koske & Polson, 1984).

## 2. OBJECTIVOS

**OBJECTIVO GERAL:** estudar o efeito das endomicorrizas no crescimento de plantas das dunas.

### OBJECTIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar o efeito da aplicação do inóculo de fungos micorrizicos no nível de colonização da *Ipomoea pes-caprae* e *Carpobrotus dimidiata* por estes fungos.
2. Avaliar o efeito das endomicorrizas no crescimento vegetativo da *Ipomoea pes-caprae* e *Carpobrotus dimidiata*.

## 3. HIPÓTESES

A aplicação de inóculo de fungos micorrizicos aumenta o nível de colonização de plantas das dunas por estes fungos.

As endomicorrizas aumentam o crescimento de plantas das dunas.

## 4. ÁREA DE ESTUDO

O ensaio foi efectuado nos arredores das estufas do Departamento de Ciências Biológicas, Campus principal da Universidade Eduardo Mondlane.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

Vasos de barro 5 l

Regador

Pá pequena

Solução de \*Hoagland 50%

Balança eléctrica

Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% (p/v)

---

\* A solução de Hoagland é uma solução que é usada nos laboratórios de Fisiologia Vegetal para fornecer nutrientes às plantas.

HCl a 1% (p/v)  
Azul de triptofano em glicerol acídico a 0.05% (p/v)  
Microscópio óptico  
Canivete afiado  
Um par de tesouras de podar  
Inóculo comercial de fungos endomicorrizicos  
Pá pequena  
Tesoura pequena  
Lâminas e lamelas  
Sensor de quantum (SKYE instruments)  
Aparelho de medição da área foliar (Delta-T Divices)  
Sensor de temperatura (Testo 600)  
Estufa de secagem

## 5.2 MÉTODOS

O ensaio consistiu no plantio de estacas das espécies *Ipomoea pes-caprae* (anexo 2) e *Carpobrotus dimidiata* (anexo 1) com aplicação de um inóculo de fungos micorrizicos, produzido previamente, para avaliar o efeito destes fungos no desenvolvimento das plantas.

### 5.2.1 PRODUÇÃO DO INÓCULO

O objectivo deste ensaio foi produzir um inóculo de fungos micorrizicos (Mengue, 1984) que foi aplicado no plantio das estacas de *Ipomoea pes-caprae* e *Carpobrotus dimidiata*.

Este ensaio consistiu no cultivo de plantas de milho em vasos de barro na estufa do Departamento de Ciências Biológicas. Foi feita uma pré – hidratação que consistiu na embibição das sementes de milho com água da torneira em caixas de petri. O plantio foi feito depois das radículas das plântulas atingirem mais ou menos 2 cm de comprimento. Para cada vaso foram transplantadas 5 plântulas que foram deixadas crescer até ao período de floração.

O solo usado para o cultivo do milho foi colhido nos arredores da Faculdade de Ciências e a sua extracção foi feita do topo até uma profundidade de 20 cm, incluindo as raízes. Este solo foi misturado numa proporção de 1 : 1 com um inóculo comercial denominado Hanôver constituído por partículas de argila e esporos de fungos micorrizicos das espécies *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum* (Quilambo, 2000). Esta mistura de solo serviu como fonte de propágulos de fungos MA (inóculo inicial) para a produção de propágulos em massa (Quilambo 2000).

As condições de cultivo incluíram uma rega de dois em dois dias com água da torneira e aplicação da solução de Hoagland 50% (um fertilizante líquido), como fonte de nutrientes, nas primeiras 4 semanas.

A irrigação foi interrompida quando as plantas começaram a florir e uma semana depois as mesmas foram cortadas ao nível do substrato. O material dos vasos (solo mais as raízes) foi deixado a secar durante 3 semanas. Este procedimento garante a consolidação da maturação dos esporos (Quilambo 2000). De cada vaso foi retirada uma pequena fracção de raízes para se determinar o nível de colonização por fungos micorrizicos, segundo o método de Ambler & Young (1977) descrito adiante.

### 5.2.2 PROPAGAÇÃO DAS ESTACAS

Estacas de *Ipomoea pes-caprae* e *Carpobrotus dimidiata* foram cortadas e plantadas em covas de cerca de 20 cm de profundidade para analisar o efeito da aplicação do inóculo de endomicorrizas no seu crescimento. As estacas foram divididas em dois grupos; cada grupo foi constituído por 50 estacas. As estacas do grupo 1 foram plantadas em covas onde foi aplicado o inóculo de esporos de endomicorrizas produzido previamente; e as estacas do grupo 2 serviram de controlo. O inóculo foi depositado sobre o solo arenoso (Hayman, 1987, citado por Abbott *et al.*; 1994; Diest, 1987) usado para preencher as covas e que serviu de meio de crescimento das plantas. O mesmo solo foi usado para cobrir a parte das estacas que ficou enterrada. Cada estaca ficou com duas gemas laterais enterradas no solo, duas gemas livres do solo e dois folíolos no seu ápice. O inóculo foi aplicado numa proporção correspondente a 10% em relação ao resto do solo que foi usado para

preencher as covas. Este solo foi colhido numa duna, junto da praia da Costa do sol, Cidade de Maputo.

O plantio das estacas foi feito segundo o modelo experimental "delineamento completamente casualizado", em que cada tratamento tem a probabilidade igual de ser destinado para qualquer unidade experimental (neste caso as covas) na área de estudo (Little & Hills, 1978).

As condições de crescimento incluíram uma rega com água da torneira em dias alternados. A temperatura média ( °C) do ar durante o período de crescimento foi de  $19.51 \pm 0.54$  de manhã,  $21.81 \pm 0.94$  ao meio dia e  $22.65 \pm 0.76$  à tarde; a radiação fotossintética activa (PAR) média, que é o número de micromoles de fótons interceptados por unidade de área por tempo ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) foi de  $57.66 \pm 3.85$  de manhã,  $51.34 \pm 2.86$  ao meio dia e  $44.66 \pm 2.83$  à tarde.

### **5.2.3. Plano de colheita**

Foram feitas três colheitas a partir de agosto de 2004 e o intervalo de tempo de uma colheita para outra foi de 3 semanas. A primeira colheita (em Agosto) foi feita 12 semanas após o plantio das estacas, a segunda (em Setembro) e a terceira (Outubro) foram feitas 15 e 18 semanas respectivamente após o plantio das estacas. Em cada colheita foram analisadas 15 plantas com inóculo e 15 plantas sem inóculo.

## **6. Parâmetros medidos e calculados**

### **6.1. Nível de colonização das raízes por fungos micorrizicos.**

Com água corrente separou-se a areia aderente às raízes e uma pequena parte foi retirada para a determinação do nível de colonização por fungos micorrizicos e a parte restante serviu para determinação dos pesos fresco e seco. A determinação do nível de colonização das raízes por fungos micorrizicos foi feita segundo o método de Ambler e Young (1977), que consiste em:

- Alcalinização das raízes em tubos de ensaio com hidróxido de potássio a 10% (P/V) durante 10 a 30 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$ .

- Decantação, que é a separação das raízes do KOH, e sua lavagem por duas vezes com água da torneira;
- Acidificação com HCl a 1% (P/V) durante 10 a 30 minutos a 90°C;
- Lavagem com água da torneira depois do período indicado;
- Coloração com azul de tripano em glicerol ácido a 0.05% (P/V), a 90°C durante 10 a 30 minutos;
- Aquecimento em glicerol ácido (sem tripano) em 15 minutos a 90°C;
- Corte das raízes em segmentos curtos de 1 cm de comprimento.

O glicerol ácido é o meio de montagem usado para a observação dos segmentos das raízes. A intensidade de infecção (%M) de cada segmento de raiz por fungos micorrizicos foi determinada através da observação microscópica, atribuindo-se valores de 1 a 5 conforme a infecção do córtex de cada segmento de raiz segundo o indicado a baixo,

$$\%M = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / N$$

%M – é a intensidade de infecção

$n_5$  – número de segmentos de raiz com mais de 95% do seu córtex infectado;

$n_4$  – número de segmentos de raiz com mais de 70% do seu córtex infectado;

$n_3$  – número de segmentos de raiz com mais de 30% do seu córtex infectado;

$n_2$  – número de segmentos de raiz com mais de 5% do seu córtex infectado;

$n_1$  – número de segmentos de raiz com uma infecção a baixo de 1%;

N – número total de segmentos de raízes a serem observados

A frequência de colonização (% de peças de raiz colonizadas ) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%F = 100(N - n_0) / N$$

N = número de segmentos de 1 cm de raiz observados

$n_0$  = número de segmentos de 1 cm de raiz micorrizados

## 6.2. Crescimento das plantas:

### 1) Caule

- O peso fresco foi medido através duma balança eléctrica, imediatamente após a colheita e o peso seco, 48 horas depois da secagem numa estufa a 80°C.

### 2) Folhas

- Procedeu-se a contagem directa do número das folhas e medição da área foliar, usando o instrumento de medição Delta-T Divices (Cambridge-England).
- O peso fresco foi determinado através duma balança eléctrica, imediatamente após a colheita e o peso seco, 48 horas depois da secagem numa estufa a 80°C.

### 3) Raízes

- Procedeu-se a contagem do número de raízes, à medição, com auxílio de uma régua, do comprimento máximo de raiz; à medição do peso fresco, com auxílio de uma balança eléctrica, imediatamente após a colheita e o peso seco, 48 horas depois da secagem numa estufa a 80°C.

#### 6.2.1. Cálculo de parâmetros de crescimento derivados:

A área específica da folha (AEFo), foi calculada de acordo com Lambers e Porter (1992), citados por Martins (1999), como a razão da área da folha pelo peso seco da folha, em cm<sup>2</sup>/g

$$AEFo = AFo/PSFo$$

Onde: AFo é a área da folha em cm<sup>2</sup>

PSFo é o peso seco da folha em g

A razão da área da folha (RAFo) segundo Teixeira e Ricardo (1983), citados por Martins (1999) foi calculada como o quociente entre a superfície foliar e o peso seco total da planta.

$$RAFo = AFo/PST$$

Onde: PST é peso seco total

A razão do peso seco da raiz (RPSR), como razão do peso seco da raiz por peso seco total da planta (Teixeira e Ricardo, 1983), citados por Martins (1999), foi calculada pela fórmula:

$$RPSR = PSR/PST$$

Onde: PSR é peso seco da raiz

A razão do peso seco da folha (RPSFo), como sendo o peso seco da folha por peso seco total da planta (Atwell *et al.*, 1999), foi calculada pela fórmula:

$$RPSFo = PSFo/PST$$

A razão do peso seco do caule (RPSC), como sendo peso seco do caule por peso seco total (Teixeira e Ricardo, 1983), citados por Martins (1999), foi calculada pela fórmula:

$$RPSC = PSC/PST$$

Onde: PSC é o peso seco do caule

A percentagem da matéria seca da planta (%Mat.S), foi calculada com base na seguinte fórmula (Fritz & Noggle, 1977):

$$\%Mat.S = (PST/PFT)*100$$

onde: PFT é o peso fresco total

PST é o peso seco total

O peso específico da folha (PEFo) foi determinado segundo Atwell *et al.* (1999) como sendo:

$$PEFo = PSFo/AFo$$

Onde PSFo é o peso seco das folhas.

AFo é a área foliar

## 7. Análise estatística dos resultados

Foi usado o teste t-student (Fowler & Cohen, 1996) para comparar as médias dos parâmetros de crescimento, nível de colonização e frequência de colonização por fungos micorrízicos entre as plantas inoculadas e as de controlo. Os parâmetros de crescimento comparados foram:

- Número de raízes (NR)
- Comprimento máximo de raiz (CoR)
- Peso seco da raiz (PSR)
- Razão do peso seco da raiz ( RPSR)
- Peso seco do caule (PSC)
- Razão do peso seco do caule (RPSC)
- Número de folhas (NFo)
- Peso seco das folhas ( PSFo )
- Área foliar (AFo)
- Área específica das folhas (AEFo)
- Peso específico das folhas (PEFo)
- Razão da área foliar (RAFo)
- Razão do peso da folha (RPSFo)
- Peso fresco total (PFT)
- Peso seco total da planta ( PST)
- Percentagem de matéria seca vegetal (%Mat. S)

- A relação entre o nível de infecção (percentagem ou intensidade de colonização) das raízes e a acumulação da matéria seca (PST) da *Carpobrotus dimidiata* foi feita com base no teste de correlação linear (Fowler & Cohen, 1996).

## 8. Resultados

### 8.1 Taxas de sobrevivência e capacidade de regeneração das estacas

Houve diferença nas proporções de sobrevivência entre plantas de *Carpobrotus dimidiata* e *Ipomoea pes-caprae*. Em *Carpobrotus dimidiata* a sobrevivência foi de 97 % em relação ao número inicial de estacas (100 estacas). Três estacas (não inoculadas) desta espécie não tiveram a capacidade de formar raízes e murcharam até a sexta semana. Todas as estacas de *Ipomoea pes-caprae* não formaram raízes e morreram até a sexta semana. Houve formação de pequenas folhas e pequenas flores em 6 plantas de *Ipomoea pes-caprae* mas não conseguiram sobreviver até a data da primeira colheita (12 semanas após o plantio das estacas) (Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de sobrevivência e capacidade de regeneração (formação de raízes, folhas ou flores) das estacas de *Ipomoea pes-caprae* e *Carpobrotus dimidiata*. O número de raízes e de folhas referentes a *Carpobrotus dimidiata* representam os valores mínimos de raízes ou folhas encontrados ao longo da experiência.

	Nro e % estacas que regeneraram	Nro de raízes por planta	Nro de folhas por planta	Nro de flores por planta
<i>I. pes-caprae</i>	6 (6%)	0	2	2
<i>C. dimidiata</i>	97 (97%)	≥ 6	≥ 2	0

As estacas de *Ipomoea pes-caprae*, inoculadas e não inoculadas, sobreviveram só até à sexta semana da experiência e apenas plantas inoculadas formaram folhas e flores.

## 8.2 Efeito da inoculação na percentagem de colonização das raízes por fungos micorrizicos

A colheita foi feita de 3 (três) em 3 (três) semanas durante 6 semanas. Na primeira colheita verificaram-se níveis de colonização relativamente baixos tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas (Figura 1). A análise estatística revelou não haver diferenças significativas no nível de colonização das plantas tratadas com inóculo de fungos micorrizicos e as plantas não tratadas. O nível de colonização aumentou ao longo do tempo, mas diferenças significativas entre plantas com inóculo e plantas sem inóculo verificaram-se apenas na terceira colheita (seis semanas após o início da colheita).

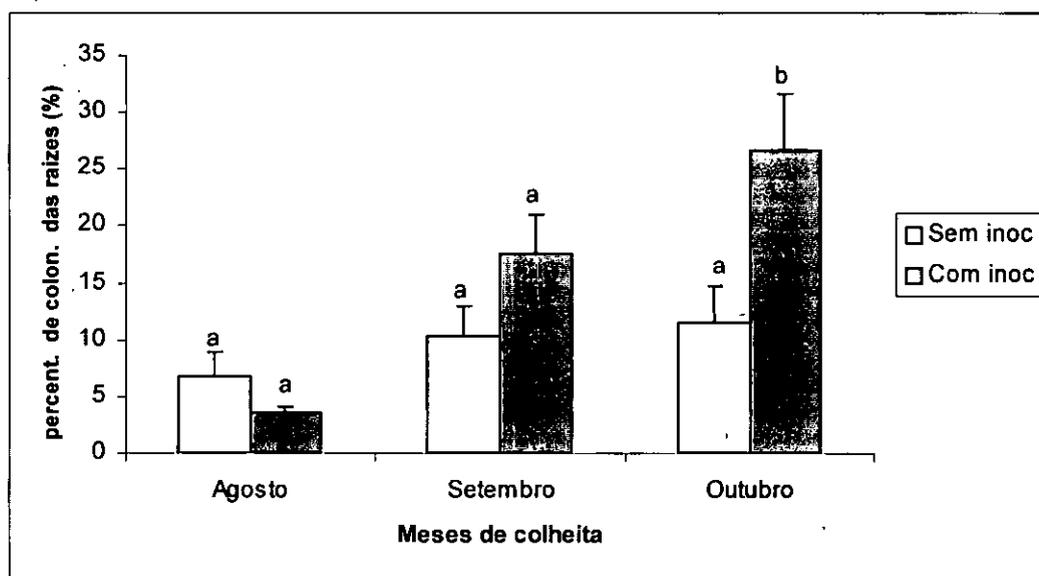


Fig. 1. Efeito da inoculação na percentagem de colonização das raízes de *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A figura mostra que o nível de colonização das plantas inoculadas aumentou muito ao longo dos meses sobretudo até a segunda colheita (três semanas depois da primeira colheita). Durante este período o nível de colonização em plantas inoculadas aumentou 5 vezes e em plantas sem inóculo apenas 1.5 vezes em relação à primeira colheita.

### 8.3 Efeito da inoculação na frequência de colonização das raízes das plantas por fungos micorrizicos.

A frequência de colonização das plantas com inóculo não foi estatisticamente diferente da frequência de colonização das plantas sem inóculo nas três colheitas a  $P < 0.05$  (Figura 2). A frequência de colonização das raízes aumentou consideravelmente ao longo do tempo tanto nas plantas inoculadas como nas plantas sem inóculo.

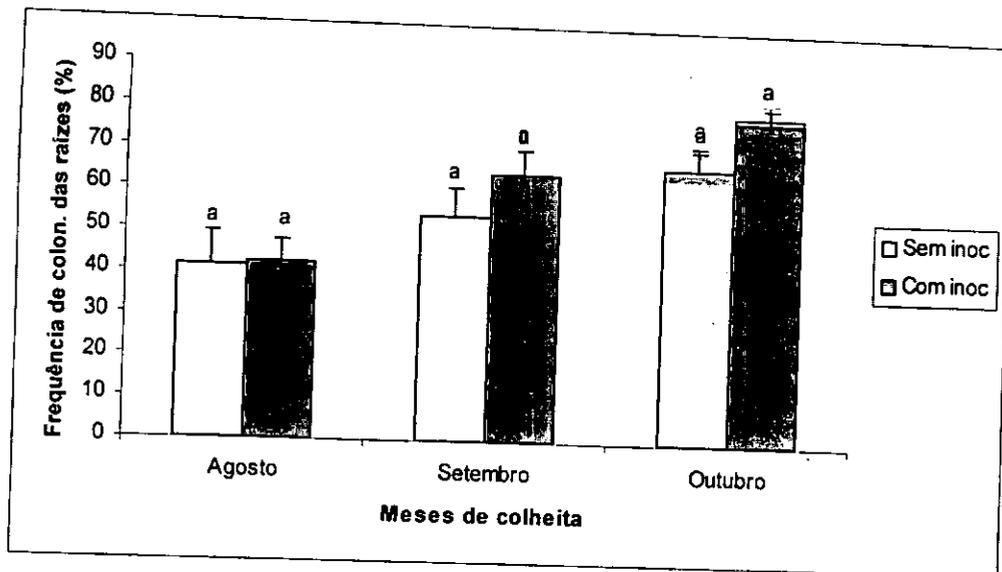


Fig. 2. Efeito da inoculação na frequência de colonização de raízes de *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A figura mostra ainda que mesmo na primeira colheita a frequência de colonização das raízes foi elevada e esta continuou a aumentar até à última colheita. Contudo, este aumento não resultou em diferenças estatisticamente significativas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas.

#### 8.4 Efeito da inoculação no peso fresco total da planta

A colheita foi feita de três em três semanas. Nas três colheitas houve diferenças significativas entre o peso fresco total de plantas com inóculo e peso fresco total de plantas sem inóculo (Figura 3).

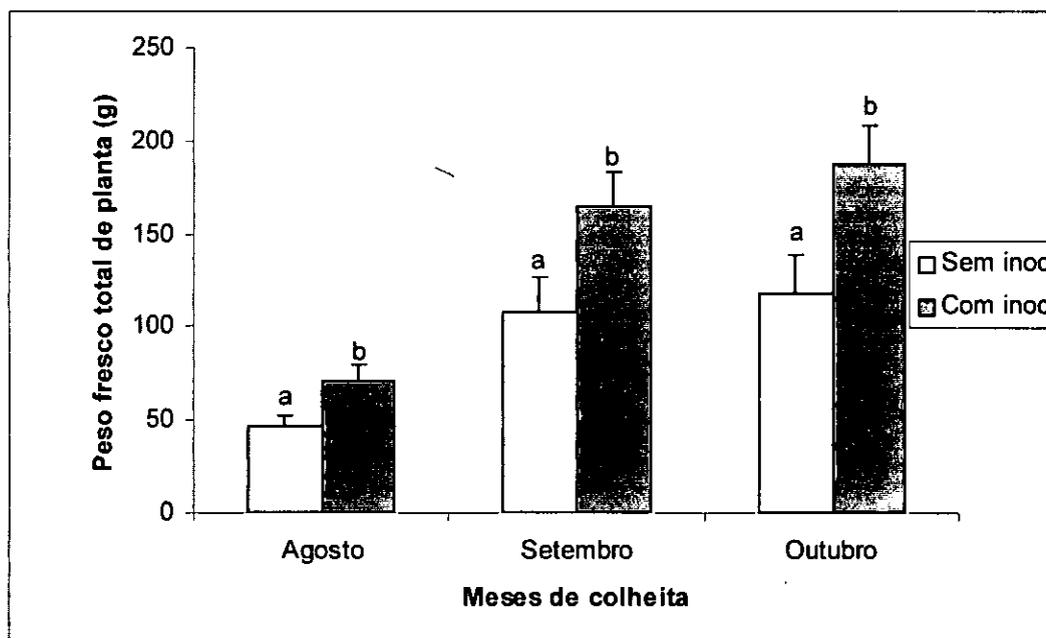


Fig. 3. Efeito da inoculação no peso fresco total da planta em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

O peso fresco total das plantas mostrou um aumento expressivo até à segunda colheita tanto nas plantas inoculadas como nas não inoculadas. Durante este período o peso fresco total (em g) aumentou mais que o dobro em relação a primeira a colheita, pois passou de  $47.309 \pm 5.59$  para  $107.92 \pm 19.05$  em plantas sem inóculo e de  $71.261 \pm 7.92$  para  $165.28 \pm 17.93$  em plantas com inóculo. Até a terceira colheita o aumento do peso fresco total foi de  $107.92 \pm 19.05$  para  $117.48 \pm 21.13$  em plantas sem inóculo e de  $165.28 \pm 17.93$  para  $188.32 \pm 20.27$  em plantas inoculadas.

### 8.5 Efeito da inoculação no peso seco total da planta

A medição do peso seco total das plantas foi feita após 48 horas de secagem numa estufa a 80°C. Nas três colheitas houve diferenças significativas entre o peso seco total de plantas com inóculo e peso seco total de plantas sem inóculo (Figura 4).

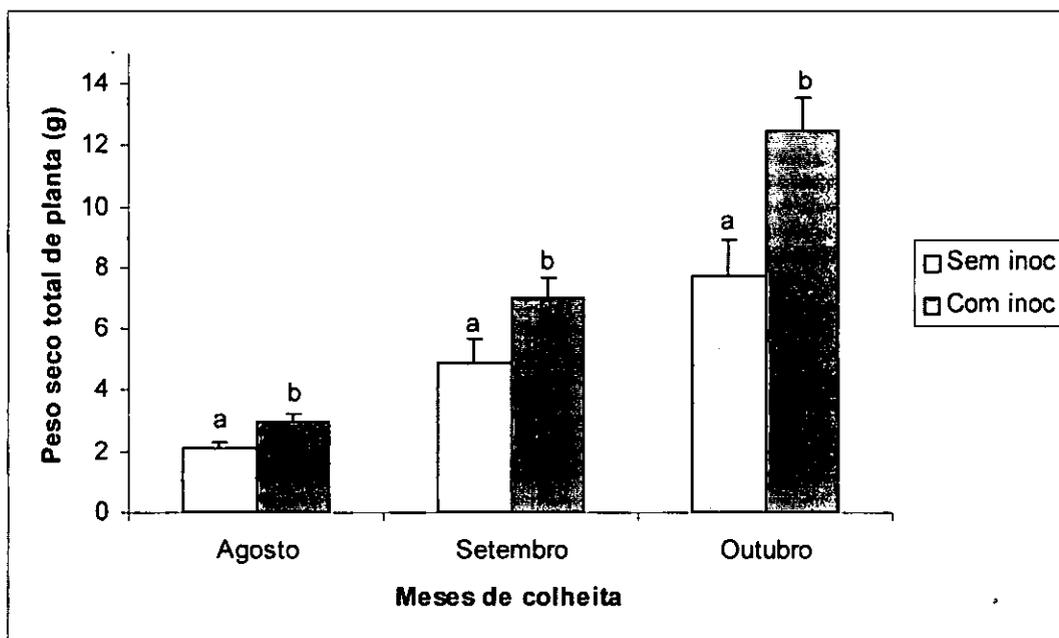


Fig. 4. Efeito da inoculação no peso seco total da planta em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

Até à segunda colheita o peso seco total da planta (em g) aumentou cerca de duas vezes em relação à primeira colheita, tendo passado de  $2.1041 \pm 0.2$  para  $4.9051 \pm 0.75$  em plantas sem inóculo e de  $2.953 \pm 0.26$  para  $7.0271 \pm 0.62$  em plantas com inóculo. Este aumento foi ainda maior na terceira colheita embora não tenha havido duplicação como no período anterior. Assim, o peso seco total das plantas com inóculo foi 40% mais elevado que plantas sem inóculo na primeira colheita, 43% na segunda colheita e 61% na última colheita.

### 8.6 Efeito da inoculação na percentagem de matéria seca

Não houve diferenças significativas em termos de percentagem de matéria seca vegetal entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas nas três colheitas. Verificou-se também que a percentagem de matéria seca variou pouco até à segunda colheita tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas; somente na terceira colheita os valores da percentagem da matéria seca aumentaram consideravelmente (Figura 5).

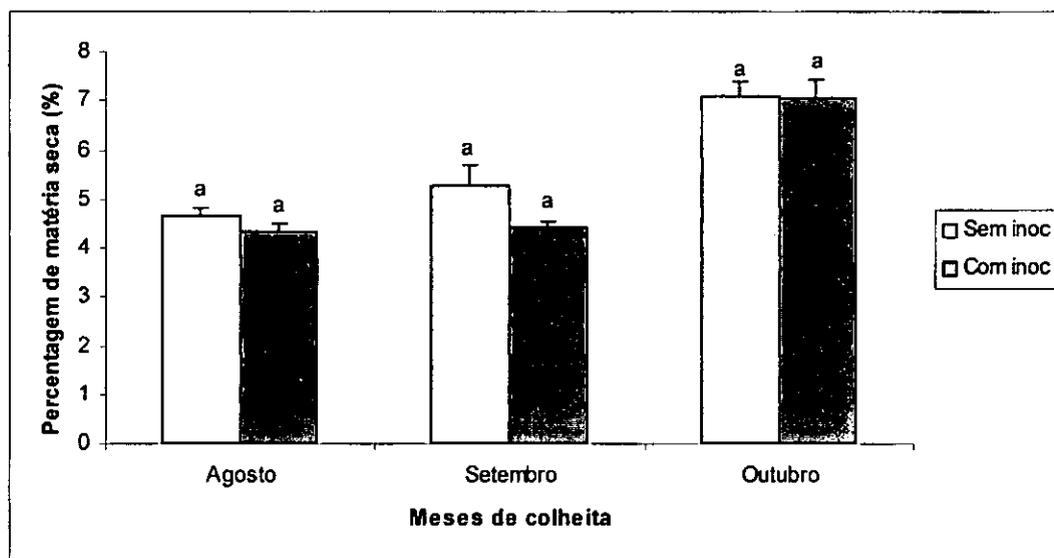


Fig. 5. Efeito da inoculação na percentagem de matéria seca vegetal em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

Nas primeiras duas colheitas as plantas inoculadas mostraram uma tendência de terem baixa percentagem de matéria seca, vindo a aumentar na terceira colheita.

### 8.7 Efeito da inoculação no número de raízes

O número de raízes das plantas com inóculo não mostrou diferenças significativas em relação ao número de raízes nas plantas sem inóculo até à segunda colheita. Na terceira colheita houve diferença significativa e as plantas com inóculo tiveram a maior média do número de raízes por planta (Figura 6).

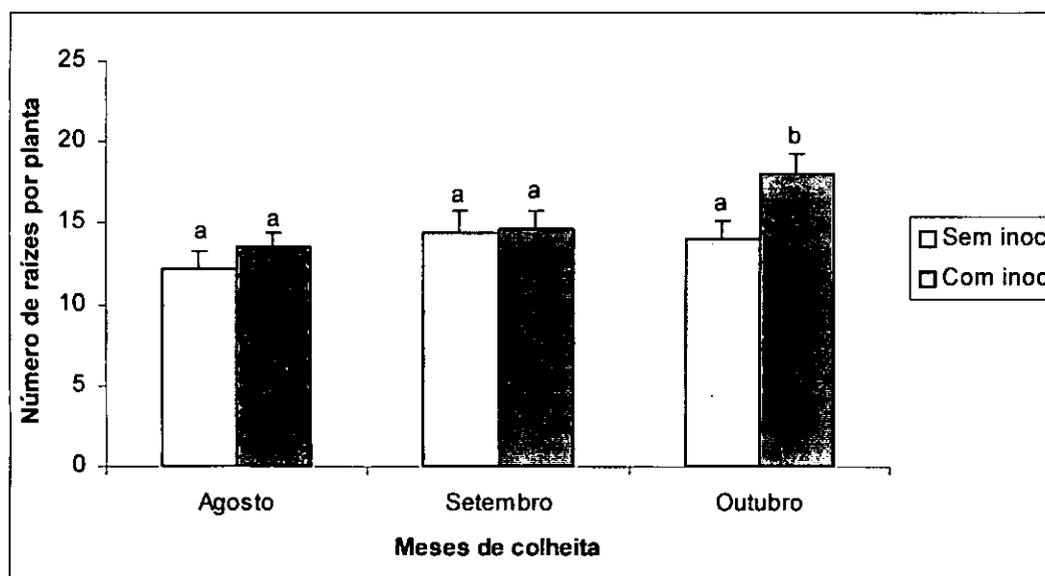


Fig. 6. Efeito da inoculação no número de raízes por planta em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A figura mostra que o número de raízes de plantas não inoculadas aumentou ligeiramente até a segunda colheita e manteve-se estacionário até a terceira colheita, ao contrário das plantas inoculadas em que se notou um aumento significativo.

### 8.8 Efeito da inoculação no comprimento máximo da raiz

Nas duas primeiras colheitas não se verificaram diferenças significativas entre o comprimento máximo da raiz das plantas com inóculo e plantas sem inóculo, mas a terceira colheita mostrou diferenças significativas em que as plantas com inóculo tiveram a maior média do comprimento máximo da raiz por planta (Figura 7).

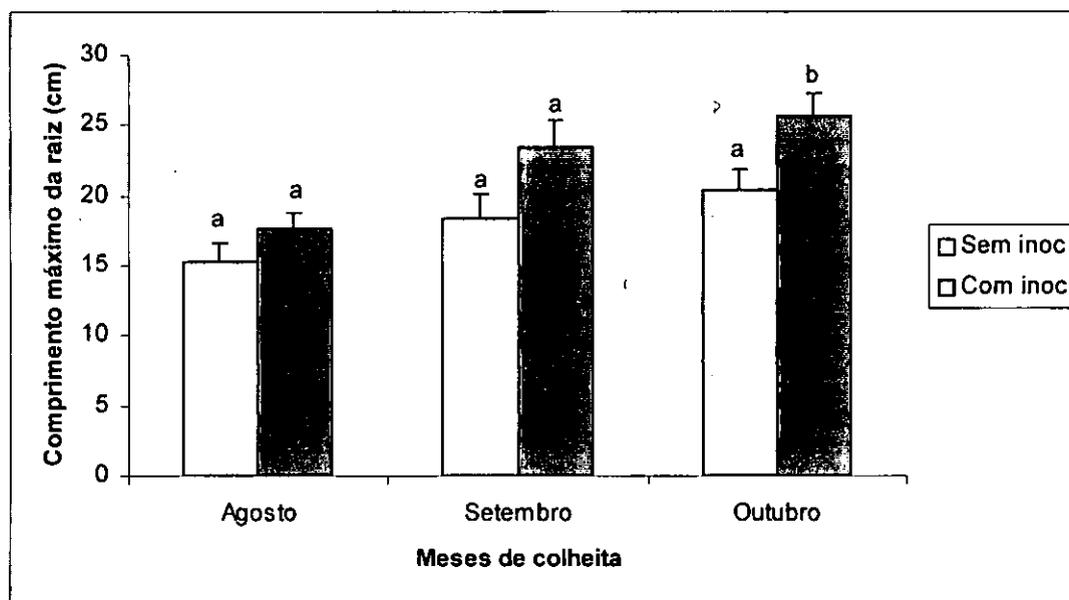


Fig. 7. Efeito da inoculação no comprimento máximo da raiz em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A figura mostra que o comprimento máximo da raiz das plantas não inoculadas aumentou ligeiramente ao longo do tempo contudo nas plantas inoculadas se notou um aumento considerável.

### 8.9 Efeito da inoculação no peso seco da raiz

Nas duas primeiras colheitas não houve diferenças estatisticamente significativas nos pesos secos da raiz das plantas inoculadas e plantas não inoculadas (Figura 8). Na terceira colheita verificaram-se diferenças significativas e as plantas com inóculo é que tiveram o maior valor do peso seco da raiz.

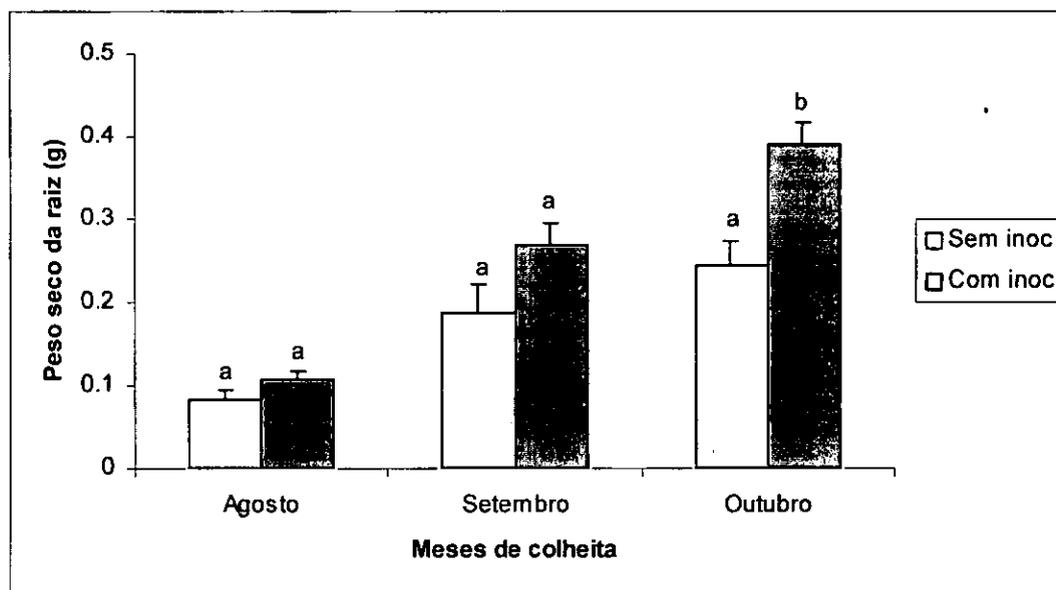


Fig. 8. Efeito da inoculação no peso seco da raiz em gramas (g).

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

Apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas nas duas primeiras colheitas, na segunda colheita verificou-se uma tendência de as plantas com inóculo terem o peso seco da raiz 30% maior que plantas sem inóculo.

### 8.10 Efeito da inoculação na razão do peso seco da raiz

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a razão do peso seco da raiz de plantas inoculadas e a razão do peso seco da raiz de plantas sem inóculo nas três colheitas (Figura 9).

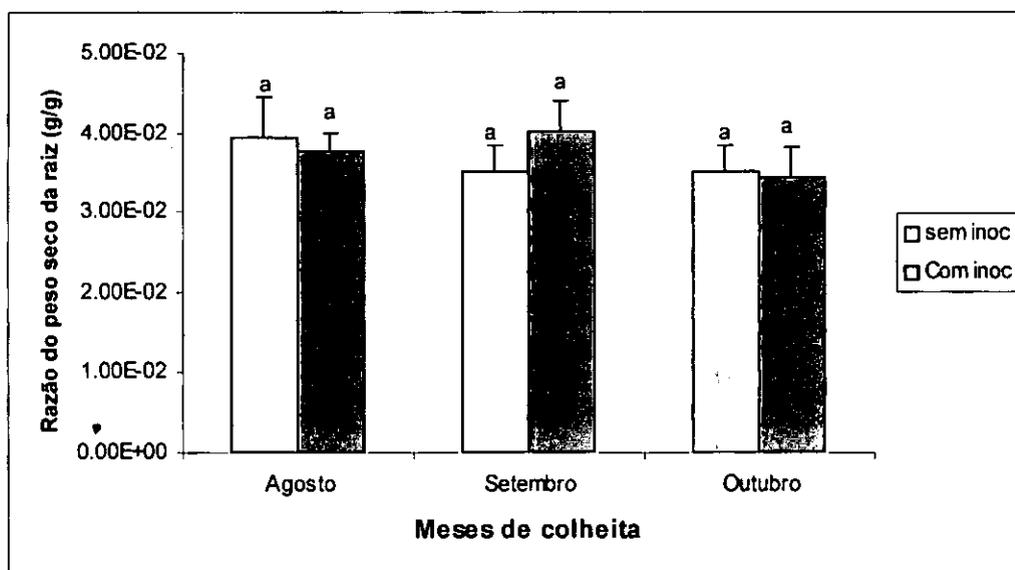


Fig. 9. Efeito da inoculação na Razão do peso seco de raiz (g/g) em *Carpobrotus dimidiata*

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

De uma forma geral a razão do peso seco da raiz teve pequena variação com o tempo tanto em plantas inoculadas como nas não inoculadas. A figura mostra também que os valores da razão do peso seco da raiz foram muito pequenos em todas colheitas estando todos à volta de 0.04 (4% em relação ao peso seco total das plantas).

### 8.11 Efeito da inoculação no peso seco do caule

Na primeira colheita não se verificaram diferenças significativas entre o peso seco do caule das plantas inoculadas e plantas sem inóculo. Mas da segunda colheita em diante as plantas com inóculo tiveram o maior peso de caule (Figura 10).

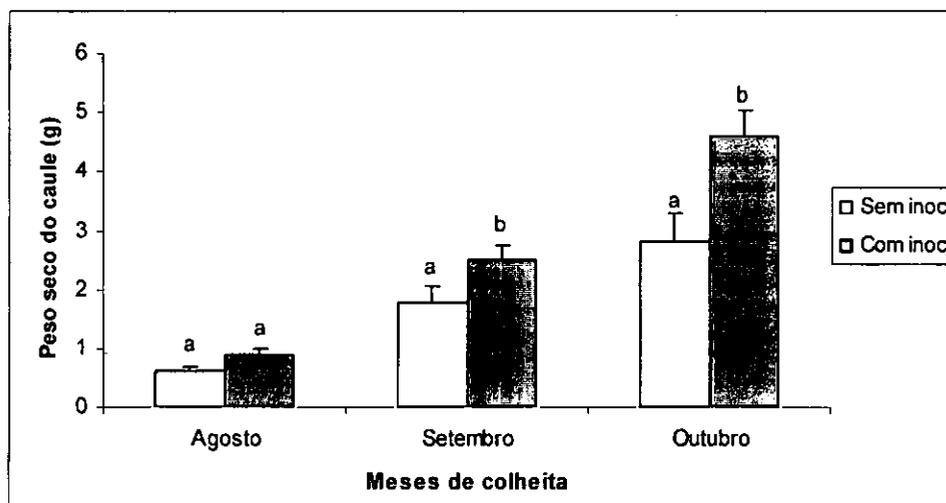


Fig. 10. Efeito da inoculação no peso seco do caule em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

Apesar de as diferenças serem significativas a partir da segunda colheita, foi na terceira colheita que esta diferença foi mais marcante. O peso seco do caule das plantas com inóculo nesta colheita foi 98% superior ao das plantas não inoculadas, ao contrastando com os 40% na segunda colheita.

### 8.12 Efeito da inoculação na razão do peso seco do caule

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a razão do peso seco do caule das plantas com inóculo e a razão do peso seco do caule das plantas sem inóculo nas três colheitas (Figura 11).

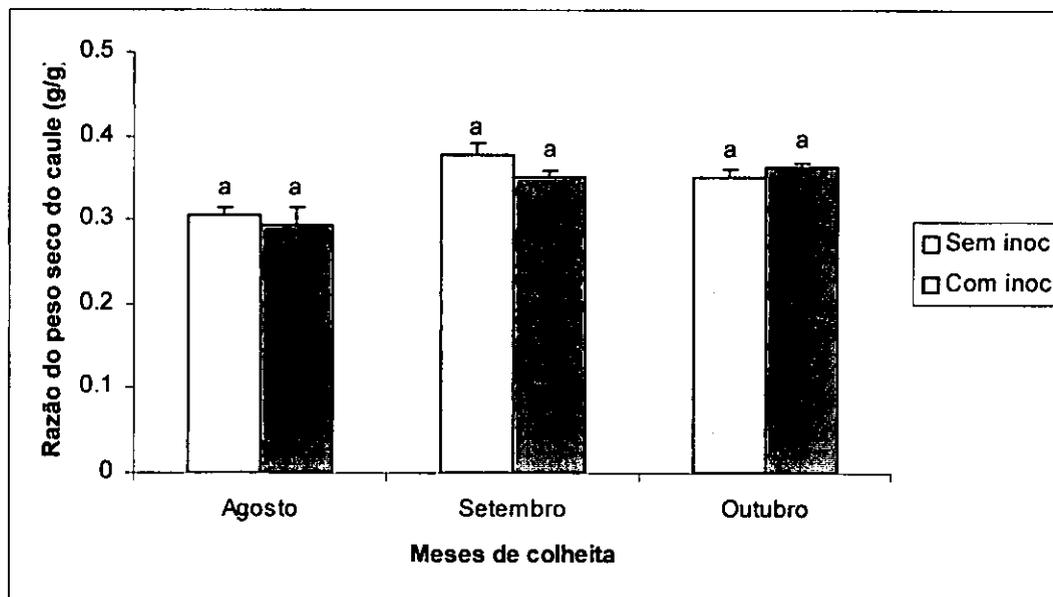


Fig. 11. Efeito da inoculação na razão do peso seco do caule em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

De uma forma geral houve uma tendência de aumento da razão do peso seco do caule em todas colheitas. A figura mostra que na primeira colheita a razão do peso seco do caule esteve a cerca de 0.3 (o caule representava 30% do peso seco total da planta) enquanto que nas últimas duas colheitas as proporções subiram para perto de 0.35 (35% em relação ao peso seco total da planta)

### 8.13 Efeito da inoculação no número de folhas por planta

Houve diferenças estatisticamente significativas no número de folhas nas três colheitas entre as plantas sem inóculo e plantas com inóculo (Figura 12).

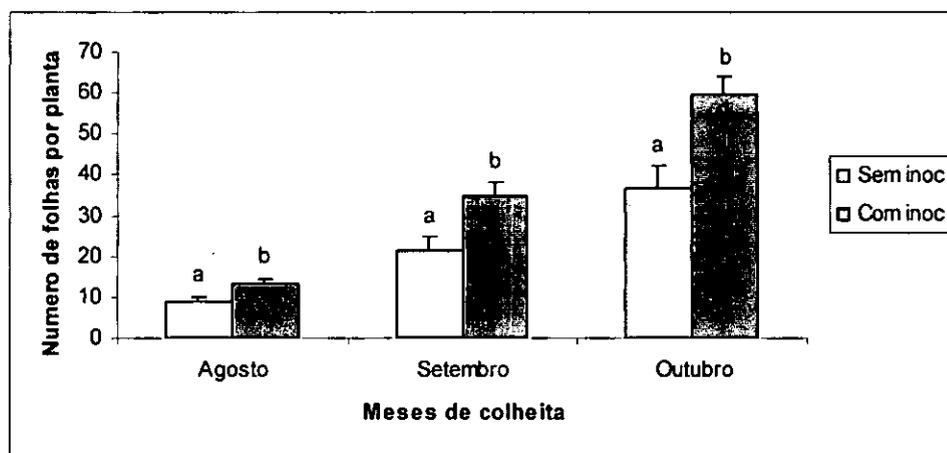


Fig. 12. Efeito da inoculação no número de folhas por planta em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

O número de folhas por cada planta mostrou um aumento significativo tanto nas plantas inoculadas como nas não inoculadas sobretudo até a segunda colheita em que se verificou um aumento em mais de 100% em relação aos números obtidos na primeira colheita.

### 8.14 Efeito da inoculação na área foliar

Na primeira colheita não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de área foliar ( $\text{cm}^2$ ) entre plantas com inóculo e plantas sem inóculo. Só nas colheitas de Setembro e Outubro é que se verificaram diferenças, em que as plantas com inóculo tiveram as maiores médias de área foliar (Figura 13).

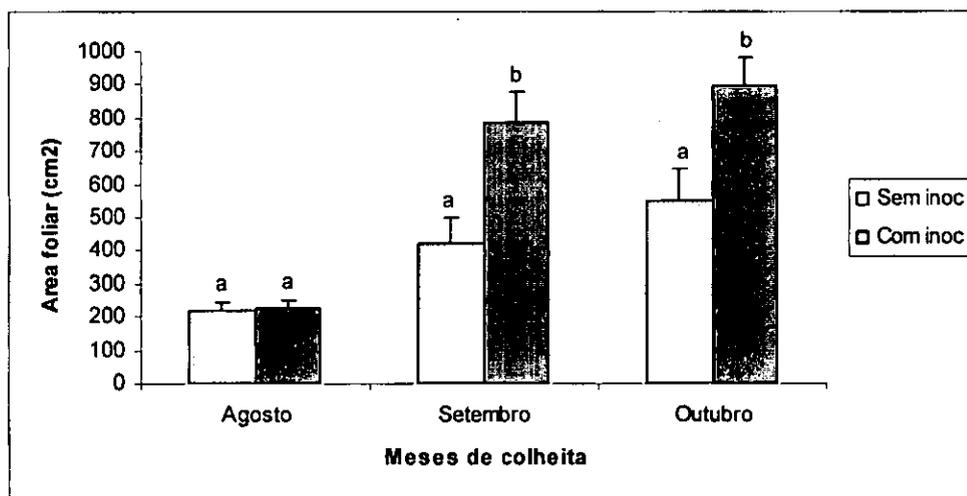


Fig. 13. Efeito da inoculação na área foliar em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A área foliar aumentou consideravelmente até a segunda colheita. Durante este período verificou-se uma triplicação da área foliar em plantas inoculadas e uma duplicação em plantas não inoculadas. A figura também mostra uma grande diferença na área foliar nas duas últimas colheitas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas ao contrário do que se verificou na primeira colheita.

### 8.15 Efeito da inoculação no peso seco da folha

As plantas com inóculo tiveram os maiores pesos secos das folhas do que as plantas sem inóculo nas três colheitas (Figura 14).

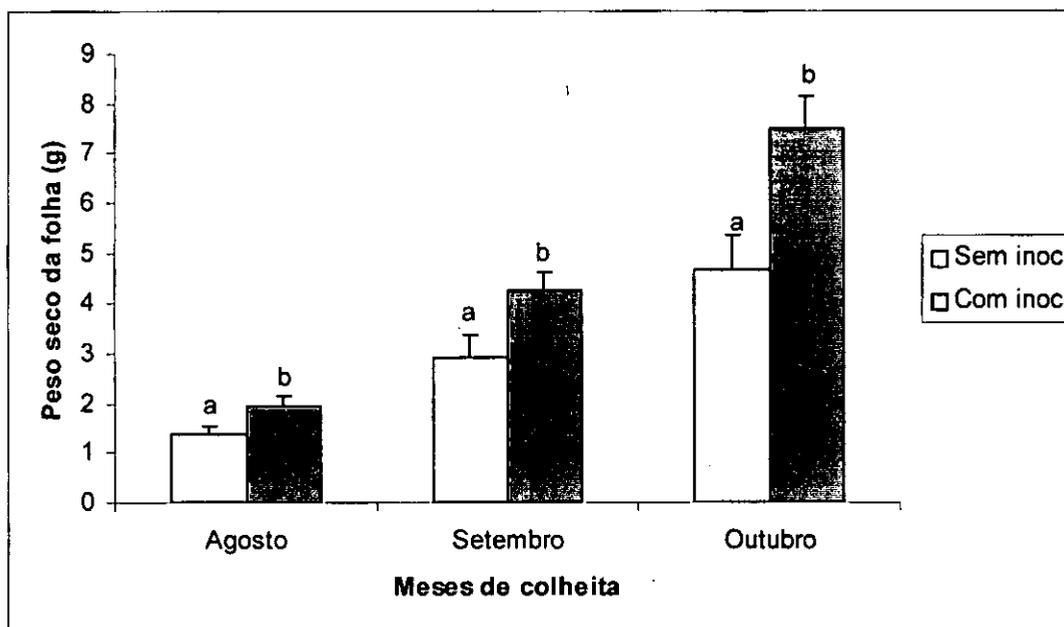


Fig. 14. Efeito da inoculação no peso seco da folha em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

Apesar de em todas as colheitas o aumento do peso seco da folha ter sido significativo, foi na terceira colheita onde este aumento em plantas inoculadas foi mais pronunciado representando 60% em relação as plantas não inoculadas, em contraste dos 40% na primeira colheita e 45% na segunda colheita.

### 8. 16 Efeito da inoculação na razão da área da folha

Na primeira colheita as plantas sem inóculo tiveram a maior média da razão de área da folha ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ); enquanto que na segunda colheita as plantas com inóculo é que tiveram o maior valor médio da razão da área da folha, não havendo diferenças estatisticamente significativas na terceira colheita (Figura 15).

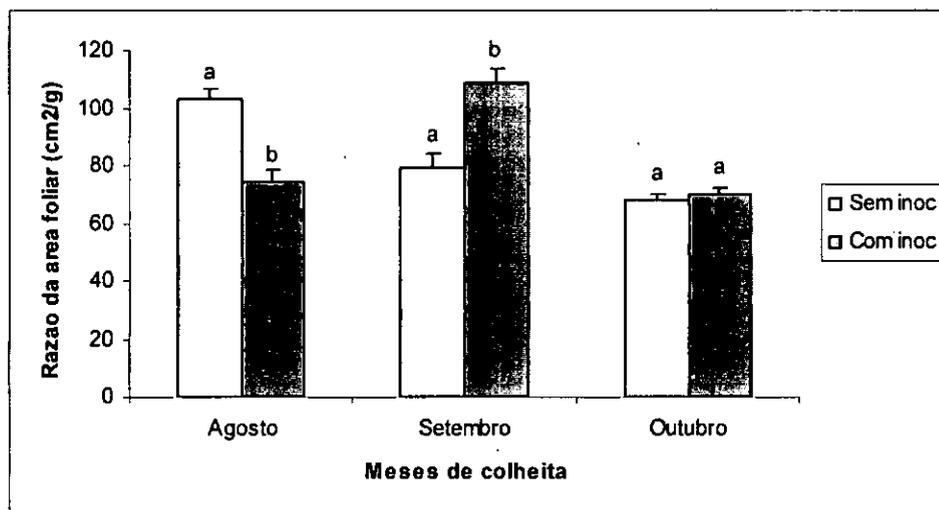


Fig. 15. Efeito da inoculação na razão da área foliar em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A figura mostra ainda que a razão da área foliar das plantas sem inóculo diminuiu com o tempo enquanto em plantas com inóculo houve um aumento até a segunda colheita e depois uma redução até a terceira colheita.

### 8.17 Efeito da inoculação na área específica da folha

A área específica da folha de plantas sem inóculo foi maior do que nas plantas com inóculo na primeira colheita. Na segunda colheita as plantas com inóculo é que tiveram a maior média de área específica da folha e, na terceira colheita não houve diferenças estatisticamente significativas (Figura 16).

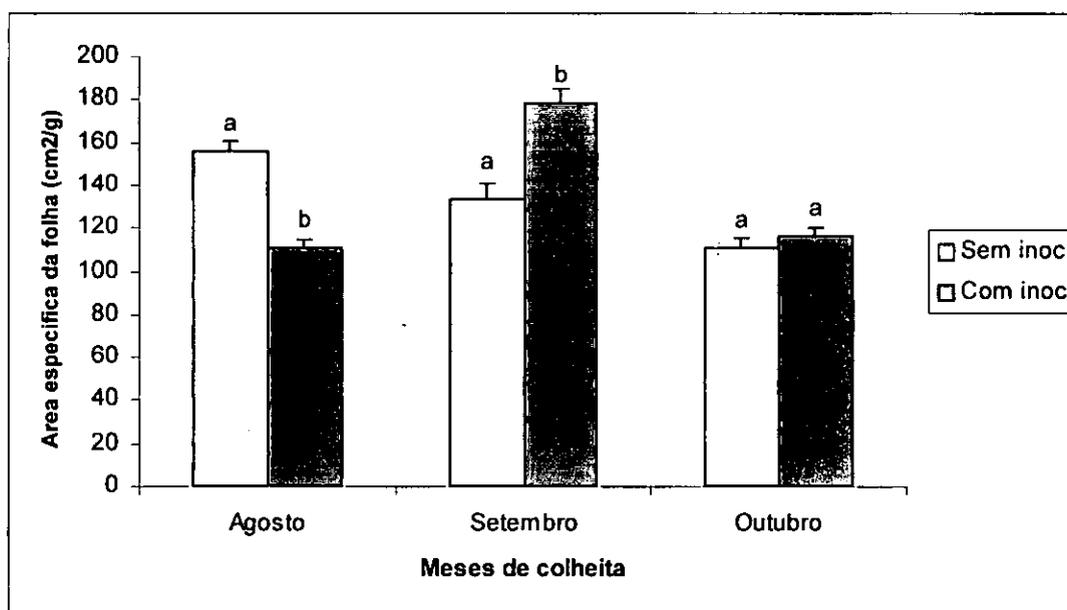


Fig. 16. Efeito da inoculação na área específica da folha em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

A área específica da folha das plantas sem inóculo diminuiu com o tempo enquanto em plantas com inóculo houve um aumento até a segunda colheita e depois uma fase de redução até a terceira colheita.

### 8.18 Efeito da inoculação no peso específico da folha

Na primeira colheita plantas com inóculo tiveram o maior peso específico que plantas sem inóculo. Na segunda colheita folhas de plantas sem inóculo tiveram o maior peso específico. Enquanto que na terceira colheita não houve diferenças estatisticamente significativas no peso específico da folha (Figura 17).

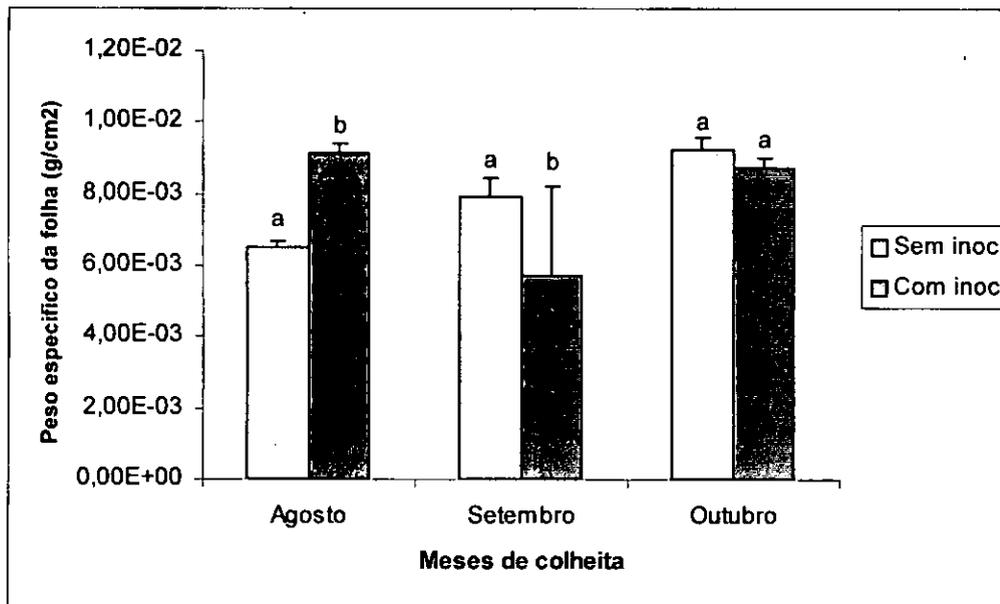


Fig. 17. Efeito da inoculação no peso específico da folha ( $\text{g/cm}^2$ ) em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

O peso específico da folha de plantas sem inóculo aumentou com o tempo enquanto que em plantas com inóculo houve uma diminuição até a segunda colheita e depois seguiu-se uma fase de aumento até a terceira colheita.

### 8.19 Efeito da inoculação na razão do peso seco da folha

A razão do peso seco da folha não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas nas três colheitas (Figura 18).

Houve diminuição da razão do peso seco da folha com o tempo.

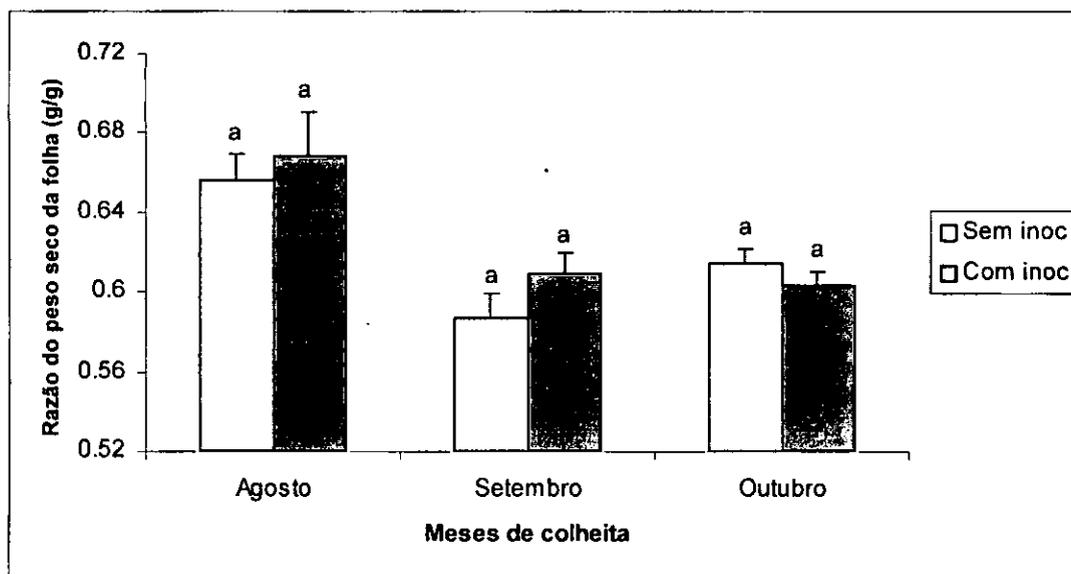


Fig. 18. Efeito da inoculação na razão do peso seco da folha em *Carpobrotus dimidiata*.

Os dados referem-se à média de 15 plantas  $\pm$  erro da média, analisadas por colheita. Em cada colheita letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas a  $P < 0.05$ , com o teste t-student.

De um modo geral houve uma diminuição na razão do peso seco da folha tanto em plantas inoculadas como nas não inoculadas de valores acima de 0.65 (o peso seco das folhas correspondendo acima de 65% do peso seco total da planta) na primeira colheita para valores perto de 0.6 (60% do peso seco total da planta).

### 8.20 Correlação entre a intensidade de infecção e o peso seco total de planta.

Na primeira colheita não se verificou correlação significativa entre a intensidade de colonização do córtex das raízes por fungos micorrizicos e a matéria seca vegetal (PST) tanto nas plantas sem inóculo ( $P = 0.27$ ;  $r^2 = 0.09$ ) como naquelas com inóculo ( $P = 0.10$ ;  $r^2 = 0.19$ ). Também não foi encontrada correlação significativa na segunda colheita entre os parâmetros acima descritos em plantas sem inóculo ( $P = 0.85$ ;  $r^2 = 0.003$ ) assim como em plantas inoculadas ( $P = 0.56$ ;  $r^2 = 0.027$ ). Na terceira colheita verificou-se uma correlação positiva significativa entre a intensidade de colonização e peso seco total das plantas não inoculadas ( $P = 0.045$ ;  $r^2 = 0.27$ ) (Figura 19) facto que não se verificou em plantas com inóculo ( $P = 0.59$ ;  $r^2 = 0.023$ ).

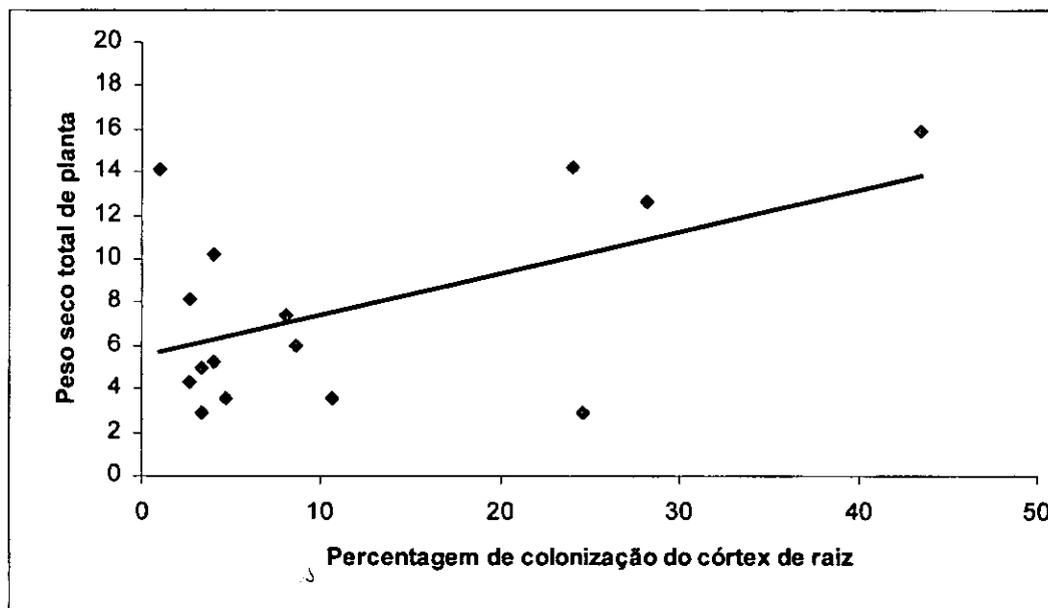


Figura 19 . Correlação entre a percentagem de colonização e o peso seco total da planta em *Carpobrotus dimidiata*. A figura é referente aos resultados da terceira colheita de plantas não inoculadas.

A equação da recta é  $y = 0.1903x + 5.5332$ . O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) é 0.27.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 Taxas de sobrevivência e capacidade de regeneração das estacas

As estacas de *Carpobrotus dimidiata* tiveram a capacidade de formar raízes ao contrário de estacas de *Ipomoea pes-caprae* que murcharam sem ter formado raízes (Tabela 1) apesar de a técnica de propagação aplicada ter sido a mesma. As raízes são fundamentais na absorção de nutrientes que garantem a sobrevivência e regeneração das estacas (Hartman, 1997)

Por outro lado, em algumas espécies a estação na qual as estacas formam raízes pode afectar o processo de iniciação das mesmas, dias longos ou iluminação continua são geralmente mais eficientes que dias curtos (Carpenter & Maekawn, 1991), embora noutras espécies o fotoperíodo não tenha nenhuma influência. Outros autores indicam que altas temperaturas e valores de radiação altos também promovem a formação de raízes. O plantio das estacas foi feito durante o inverno (Junho) e a temperatura média (em °C) do ar durante o período de crescimento foi de  $19.51 \pm 0.54$  de manhã,  $21.81 \pm 0.94$  ao meio dia e  $22.65 \pm 0.76$  à tarde. Estes valores de temperatura estão abaixo do intervalo considerado óptimo por Hartman (1997) para muitas espécies herbáceas, que varia de 23 a 27°C.

As estacas de *Ipomoea pes-caprae* apesar de não terem formado raízes formaram folhas e flores (Tabela 1), indicando que esta espécie pode ser de fotoperíodo curto tendo em conta que a propagação foi feita em pleno inverno. A floração é um fenómeno complexo e pode influenciar negativamente a formação de raízes. Bach (1992) citado por Hartman (1997) constatou que estacas da herbácea dália (*Dahlia pinnata*.) contendo rebentos florais foram mais difíceis em formar raízes do que estacas só com botões vegetativos. Na Rododendron (*Rodhodendron ferrugineum*), por outro lado, a remoção de botões florais aumentou o enraizamento. Este facto tem sido interpretado como o resultado da eliminação da fonte de competição para os nutrientes necessários à formação de raízes exercida pelos botões florais (Roberts 1965, citado por Hartman 1997). Enquanto isso, a taxa de sobrevivência em

*Carpobrotus dimidiata* foi muito maior (Tabela 1) e houve formação de mais raízes e folhas (Figuras 6 e 12) possivelmente por não se ter verificado a formação de flores.

### **9. 2 Efeito da inoculação na percentagem de colonização das raízes por fungos micorrizicos**

O transplante das estacas foi feito com estacas sem raízes, e até à primeira colheita (12 semanas depois do plantio), as raízes formadas a partir da parte subterrânea das estacas da *Carpobrotus dimidiata* já tinham sido colonizadas por fungos micorrizicos (Figura 1). Este resultado mostra que houve compatibilidade entre os fungos micorrizicos e a planta uma vez que a penetração da hifa que dá origem aos arbúsculos e vesículas é o primeiro sinal morfológico da compatibilidade entre a planta e o fungo (Garriock *et al.*, 1989).

A ausência de diferenças significativas nos níveis de colonização que se verificaram nas duas primeiras colheitas pode ser uma indicação de que os propágulos de fungos nativos do solo extraído na duna tiveram a mesma capacidade de germinar, formar hifas e penetrar nas raízes do hospedeiro que os propágulos do inóculo. A percentagem de colonização das raízes por fungos micorrizicos aumentou ao longo dos meses tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas (Figura 1). Na última colheita as plantas com inóculo tiveram um nível de colonização maior que plantas sem inóculo (Figura 1). As possíveis causas que podem ter determinado a maior infectividade dos fungos do inóculo são a abundância das hifas e esporos produzidos a partir das hifas parentais, tolerância a factores edáficos, taxa de crescimento das hifas e capacidade de dispersão das hifas dentro da raiz e capacidade do fungo no uso de substratos de carbono das raízes. Segundo Abbott *et al.* (1994), o nível de colonização das raízes por cada fungo micorrizico dentro de um solo pode mudar ao longo do tempo devido às propriedades acima mencionadas que podem influenciar a ocorrência e sua função.

O primeiro requisito que é exigido para que um fungo ou fungos sejam aplicados para promover o crescimento de plantas em locais onde os nutrientes são o factor limitante é a sua infectividade, taxa e extensão de formação e o segundo é a sua eficiência (capacidade em promover o crescimento da planta) (Abbott *et al.*, 1994).

### 9.3 Efeito da inoculação no peso seco total da planta

O peso seco total de plantas com inóculo foi maior que em plantas sem inóculo desde o início (Figura 4), embora a diferença nos níveis de colonização das raízes por fungos micorrízicos tenha-se verificado apenas em Outubro (Figura 1). O primeiro passo em qualquer programa de inoculação de fungos micorrízicos consiste em identificar locais que são susceptíveis em responder á inoculação. Inicialmente isto envolve a identificação dos factores que limitam o crescimento das plantas no solo e determinar se os fungos micorrízicos podem aliviar tais restrições de crescimento.

A areia que serviu de meio de crescimento para as plantas devia ter propágulos de fungos nativos tal como a maioria dos solos. Nestas circunstâncias a decisão para introduzir fungos micorrízicos poderá também depender da eficiência destes fungos nativos (isto é, a sua habilidade em beneficiar o crescimento das plantas) quando comparado com possível inoculação de fungos. Onde os fungos nativos têm uma baixa capacidade de colonização e são ineficientes, inoculação com fungos micorrízicos eficientes pode aumentar o crescimento das plantas (Sieverding, 1991). Se os fungos micorrízicos nativos tiverem uma baixa capacidade de colonização (proporção da raiz colonizada num certo tempo) mas mostram ser eficientes quando a colonização das raízes aumenta, então o uso de práticas de manejo para aumentar a abundância de população de fungos pode ser mais apropriada (Sieverding, 1991).

Os propágulos do inóculo usado revelaram ter uma capacidade maior em contribuir para a formação da matéria seca vegetal devido a sua maior eficiência na absorção, transporte e entrega de nutrientes às plantas mesmo não havendo diferenças significativas nos níveis de colonização entre plantas inoculadas e não inoculadas (Figuras 1 e 4). O facto de a inoculação ter resultado no aumento do peso seco total da planta em *Carpobrotus dimidiata* pode ser uma indicação de que o solo recolhido das dunas tivesse quantidades limitadas de nutrientes embora não se possua dados sobre as características gerais do mesmo solo. Os fungos micorrízicos aumentam o crescimento das plantas em locais com escassez de nutrientes, especialmente o

fósforo, de acordo com as necessidades nutricionais das espécies de plantas em causa (Abbott *et al.*, 1994).

Não houve diferenças significativas entre a percentagem de matéria seca vegetal das plantas inoculadas e plantas não inoculadas nas três colheitas (Figura 5), embora se tenha verificado diferenças significativas nos pesos fresco e seco totais (Figuras 3 e 4). Esta é uma indicação de que não houve diferenças significativas em termos de conteúdo de água dos tecidos. É de salientar que tanto plantas com inóculo como plantas sem inóculo foram regadas com a mesma regularidade e mesmas quantidades de água o que terá permitido que elas não tivessem falta de água. Segundo Hock & Varma (1998) os fungos micorrízicos influenciam as relações hídricas em plantas que crescem em condições de falta de água. O aumento da percentagem da matéria seca que se observou (Fig. 5) pode ser interpretado como sendo o resultado do aumento de material de reserva que ocorre nas plantas durante o seu crescimento (Atwell *et al.*, 1999).

#### **9.4 Efeito da inoculação no desenvolvimento da raiz**

Foram encontradas diferenças significativas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas no que respeita aos parâmetros que descrevem o desenvolvimento do sistema radicular nomeadamente número de raízes (Figura 6), comprimento máximo da raiz (Figura 7) e peso seco da raiz (Figura 8). Mas ao contrário das outras partes da planta (caule e folhas), só na terceira colheita é que tais diferenças foram observadas. Isto mostra que em fases iniciais do ciclo de vida da *Carpobrotus dimidiata* a maior parte da matéria vegetal é alocada para a parte aérea da planta para a formação e crescimento das folhas que são os principais órgãos onde se realiza a fotossíntese, processo fundamental para a manutenção da relação simbiótica. Os fungos usam cerca de 20% do carbono total fixado pela planta (Smith & Read, 1997) que serve para o crescimento de hifas extra e intraradiciais e para a respiração que suporta o seu crescimento e manutenção (Smith & Read, 1997).

Apesar das diferenças significativas encontradas em relação ao peso seco da raiz, comprimento máximo e número de raízes, a razão do peso da raiz (proporção do peso da raiz em relação ao peso total da planta), manteve-se abaixo dos valores de

razão do peso seco de caule e folhas (tabela 3) tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas. Este resultado mostra que na raiz há pouca acumulação da biomassa vegetal em plantas micorrizadas, havendo deste modo o favorecimento da parte aérea da planta (Chanway & Holl, 1990, citados por Machava (1999)).

#### **9.5 Efeito da inoculação no desenvolvimento do caule.**

As plantas com inóculo tiveram o maior peso seco de caule a partir da segunda colheita (Figura 10). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Soedarjo & Habte (não publicados) citados por Hock & Varma (1998). Eles constataram que o peso seco do caule de *Leucaena leucocephala* com inóculo de fungos endomicorrizicos era maior que em plantas não inoculadas.

Também se constatou que a razão do peso seco do caule aumentou com o tempo ao contrário do que se verificou com a razão do peso seco da raiz (onde não houve variação) e da folha (com uma diminuição). Isto pode significar que com o tempo passa a existir uma redistribuição da biomassa vegetal favorecendo principalmente o caule. Este aumento na razão do peso seco do caule também foi constatado nas plantas sem inóculo (Fig.11). Isto pode ser interpretado como o resultado da acção dos fungos micorrizicos na absorção de nutrientes principalmente o fósforo. Segundo Atwell *et al.* (1999) plantas com suprimento adequado de fósforo tem um melhor desenvolvimento do caule.

#### **9.6 Efeito da inoculação no desenvolvimento da folha**

As plantas com inóculo tiveram o maior número de folhas (Figura 12), o maior peso seco (Figura 14) desde a primeira colheita e maior área foliar a partir da segunda colheita (Figura 13). Este resultado pode ser consequência da absorção de mais nutrientes conseguida por plantas inoculadas o que permitiu maior desenvolvimento das suas folhas do que as plantas não inoculadas. A expansão das folhas é particularmente sensível ao fornecimento de nutrientes (especialmente Nitrogénio, Fósforo, Potássio e Magnésio) devido especialmente à necessidade da expansão/alargamento das células para a síntese de novos materiais e geração do turgor. O sinal mais notório causado pela deficiência do Nitrogénio é a redução do

tamanho das folhas, enquanto que o impacto da deficiência do Fósforo é mais evidente na redução do número de folhas (Atwell *et al.*, 1999).

As plantas inoculadas tiveram a maior biomassa vegetal resultante de uma grande superfície foliar que proporcionou uma captação eficiente de luz solar e absorção do CO<sub>2</sub>. Estes dois factores em conjunto com os nutrientes são os pré-requisitos para o crescimento das plantas. A matéria vegetal resultante da actividade fotossintética foi redistribuída para as partes da planta (caule e raízes), o que fez com que houvesse diferenças significativas nos pesos secos de caule e nos parâmetros de crescimento de raízes.

Na primeira colheita não houve diferenças significativas entre a área foliar de plantas inoculadas e plantas não inoculadas (Figura. 13). Mas o período entre Agosto e Setembro foi caracterizado por um aumento muito acentuado na área foliar em plantas inoculadas tendo-se notado a partir da segunda colheita diferenças significativas em termos de área foliar. Este aumento da área foliar coincidiu com o período em que se verificou também um aumento no nível de colonização das raízes por fungos micorrízicos (Figura 1) o que pode ter resultado no aumento da absorção de nutrientes fundamentais para o desenvolvimento das folhas (Atwell *et al.*, 1999).

A forma como a área foliar mudou ao longo do tempo influenciou a variação de outros parâmetros que descrevem o crescimento das folhas nomeadamente a razão da área da folha (Figura 15); a área específica da folha (Figura 16) e o peso específico da folha, o inverso da área específica (Figura 17).

Na primeira colheita não houve diferenças significativas na área foliar entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas (Figura 13); o que levou a que plantas sem inóculo tivessem o maior valor de razão de área foliar pois foi nestas onde se verificou o menor peso seco total de planta (Figura 15). Por outro lado, elas tiveram também a maior área específica (Figura 16) por terem tido o menor peso seco da folha e finalmente, tiveram o menor peso específico (Figura 17). Até à segunda colheita, em que a área foliar das plantas com inóculo foi maior que a das plantas sem inóculo, as plantas inoculadas tiveram o maior valor de razão da área foliar, maior área específica (e conseqüentemente menor peso específico). O aumento da área foliar permite a absorção de grandes quantidades de nutrientes, permite a

formação e acumulação de grandes quantidades de matéria vegetal nas folhas, caule e nas raízes. Isto terá levado a que a razão da área foliar e a área específica baixassem e o peso específico aumentasse ao ponto de na última colheita não se verificarem diferenças significativas em relação a estes parâmetros entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas.

Não foram encontradas diferenças significativas na razão do peso seco da folha entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas nas três colheitas (Figura 18), assim como em relação a razão do peso seco da raiz e a razão do peso seco do caule entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas (Figuras 9 e 11). Segundo Atwell *et al.* (1999) a distribuição da biomassa vegetal nos diferentes órgãos da planta (raiz, caule e folhas) esta sob forte controlo genético e pode sofrer variações se o organismo da planta for submetido a condições extremas do ambiente. A diminuição da razão do peso seco da folha que se verificou (Fig. 18) é um fenómeno que ocorre geralmente nas plantas e é um aspecto próprio do crescimento, pois a medida que a idade da planta aumenta, há uma acumulação crescente da biomassa vegetal no caule e nas raízes. Segundo Atwell *et al.* (1999), a redistribuição da biomassa vegetal, das folhas para as outras partes da planta, ocorre depois de as folhas atingirem um nível de crescimento elevado, podendo esta ser a razão que fez com que só a partir da segunda colheita é que a razão do peso seco da folhas baixou (Figura 18).

Segundo as figuras 6, 7 e 8 as plantas com inoculo até a terceira colheita tiveram o número de raízes, o comprimento máximo de raízes e o peso seco da raiz maiores que plantas não inoculadas. Este pode ser o resultado do aumento da área foliar e consequente produção e redistribuição da matéria vegetal que também afectou as raízes. Estas características favorecem o crescimento das plantas das dunas, pois segundo McLachlan & Brown (1994), as plantas das dunas requerem adaptações especiais para a sua sobrevivência. Elas precisam de um sistema radicular bem desenvolvido para absorver bem e rapidamente a água da chuva e em alguns casos raízes profundas podem absorver água que se encontra a grandes profundidades.

### 9.7 Correlação entre a percentagem de colonização e acumulação da matéria seca vegetal

Foi encontrada correlação positiva significativa entre a percentagem de colonização por fungos micorrizicos e a acumulação da matéria seca vegetal (PST) na última colheita e em plantas não inoculadas, situação que não se verificou em plantas inoculadas. Nas restantes colheitas não foi encontrada qualquer correlação positiva. Abbott *et al.*, (1994) consideraram que nem todos os fungos micorrizicos contribuem igualmente para absorção de nutrientes e crescimento da planta e que raízes podem ser colonizadas por uma variedade de fungos que não contribuem para a melhoria na absorção de nutrientes e outras vantagens resultantes da colonização. Nas relações simbióticas com envolvimento de fungos micorrizicos, o crescimento dos parceiros é influenciado pelo genótipo do hospedeiro, pela espécie e ecotipo do fungo, e pelo solo, mas não é necessariamente relacionado pela percentagem de colonização da raiz (Vierheilind & Ocampo (1991) citados por Abbott *et al.* (1994)).

Num determinado nível de infecção, a eficiência de absorção de nutrientes pode ser afectada pelos parâmetros de troca de nutrientes na interface celular raiz-fungo (arbúsculo), e a extensão, viabilidade e capacidade de transporte da hifa externa. O funcionamento dos fungos micorrizicos tem sido estudado geralmente através da comparação do crescimento de plantas colonizadas por fungos nativos (sem inoculação) e o crescimento de plantas inoculadas (Abbott *et al.*, 1994).

Thompson (1992) citado por Abbott *et al.* 1994, concluiu nos seus estudos que quando as raízes das plantas estão colonizadas predominantemente por uma espécie de fungo pode haver uma correlação evidente entre o nível de colonização das raízes e a acumulação da matéria vegetal. Isto está de acordo com os resultados obtidos nesta experiência pois uma correlação positiva foi observada em plantas não inoculadas (figura 19), o que dá ideia de que a areia extraída na duna tinha propágulos maioritariamente da mesma espécie.

## 10. Conclusões

1. A inoculação aumenta o nível de colonização das raízes de *Carpobrotus dimidiata* por fungos micorrízicos.
2. A inoculação aumenta o crescimento vegetativo da *Carpobrotus dimidiata* em termos de:
  - a) aumento da área foliar e do número de folhas em *Carpobrotus dimidiata*.
  - b) aumento do peso seco da folha, caule, raiz e do peso seco total da planta em *Carpobrotus dimidiata*.
  - c) aumento do comprimento máximo de raiz e do número de raízes por planta em *Carpobrotus dimidiata*.
3. Neste trabalho não foi feita a análise da inoculação no estabelecimento da *Ipomoea pes-caprae*, pois as estacas desta planta não formaram raízes e murcharam prematuramente.

### 11.Recomendações

- Recomenda-se o uso de *Carpobrotus dimidiata* em planos de restauração das dunas pois esta espécie responde à inoculação com fungos micorrízicos.
- Para o estudo da influência dos fungos micorrízicos no crescimento vegetativo da *Carpobrotus dimidiata* e *Ipomoea pes-caprae* recomenda-se um estudo comparativo que inclua também um solo esterilizado.
- Recomenda-se a realização de ensaios de propagação de estacas da *Ipomoea Pes-caprae* que incluam a remoção de botões florais para se analisar o seu papel na regeneração das respectivas estacas.
- Recomenda-se o transplante da *Ipomoea Pes-caprae* numa outra época de fotoperíodo longo (verão).
- Recomenda-se para os próximos trabalhos que a colheita das plantas se faça três semanas depois do plantio das estacas e se prolongue até a fase reprodutiva para se compreender desde cedo, e até a fase generativa, a alteração no nível de colonização por fungos micorrízicos e a sua implicação no desenvolvimento das plantas.
- Recomenda-se um estudo comparativo do processo de infecção por fungos micorrízicos e sua influência no crescimento de plantas nas próprias dunas para serem estabelecidas as diferenças e semelhanças entre os resultados obtidos fora e dentro das dunas.
- Recomenda-se um estudo da influência dos fungos no crescimento de outras espécies características das dunas de Moçambique para o conhecimento das plantas susceptíveis de responderem à inoculação.

Bibliografia

- Abbott L K; Malajczuk N; Robson A D. (1994) Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Kluwer Academic publisher. London
- Ambler J; Young K (1977) Techniques for determining Root Length Infected by Vesicular-arbuscular Mycorrhizae. University of Wisconsin Press, Madison, 812pp.
- Atlas R M; Bartha R (1987) Microbial Ecology. Fundamentals and applications. Second edition. The Benjamin/cummings publishing company, Inc. 533pp.
- Atwell B; Kriedemann P; Turnbull C (1999) Plants in Action. Adaptation in nature, Performance in cultivation. Macmillan education Australia. PTY LTD. South Yarra. 664p
- Augé R M; Schekel K A; Wample R L (1987) Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. Phytol plant 70: 175-182.
- Augé R M; Stodola A J W (1990) An apparent increase in symplastic water contributes to greater turgor in micorrhizal roots of rose plants affected by drought. New phytol 115:285- 295.
- Barea J M (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizas as modifiers of soil fertility. Adv Soil Sci 15: 2-40.
- Barea J M; Azcon R; Azcon-Aguilar C (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing system. In Norris J R; Read D J; Varma A K (eds) Methods in Microbiology vol. 24, pp 391-416.

- Bellgard S E (1992) The propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi capable of initiating VAM infection after top soil disturbance. Mycorrhiza 1: 147-152.
- Bethlenfalvay G J; Linderman R G (1992) Mycorrhizae in sustainable agriculture. Am Soc Agron Spec Publ 54.
- Bickenell S H; Mackey E M (1998) Mysterious nativity of California's sea.
- Carpenter W J; Maekawns S (1991) Substrate moisture level governs the germination of Verbena seed. Hort Science 26:1468-72.
- Castellani T T; Santos F M A (1998) Ocorrência e sobrevivência de plântulas de *Ipomoea pes-caprae* no sul do Brasil. México
- Cayrol J C (1991) Propriétés nematicides des endomycorhizés à vésicules et arbuscules. PHM Rev Hortiz 321 Décembre 33-42.
- Davies J F T; Potter J R; Linderman R G (1992) Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. J plant physiol 139: 289-294.
- Dehne H W (1992) Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115-1119.
- Diest A V (1987) Plant and soil Interfaces and Interactions. Martinus Nijhoff publishers. Boston. 370p.

- Evans D G; Miller M H (1990) The role of external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization in maize. New phytol 114: 65-71.
- Fitter A H (1988) Water relation of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and Phosphorus supply before and during drought. J Exp Bot 39; 595-603.
- Fowler J; Cohen L (1996) Practical Statistics for field Biology. 227pp.
- Fritz G J; Noggle G R (1983) Introductory plant Physiology. Second edition. Prentice – Hall, Inc., Englewood cliffs, New Jersey. 627pp.
- Garriok M L; Peterson R L; Ackerley C A (1989) Early stages in colonization of *Allium porum* (leek) roots by the VA fungi, *Glomus versiforme*. New phytol. 112, 85-92.
- Gianinazzi S (1991) Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. Agri Ecosyst Environ 35: 105-119.
- Gianinazzi-Person V; Branzanti B; Gianinazzi S (1989) In enhancement of spore germination and early hiphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by root host exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7: 243-255.
- Giovanetti M; Sbrana C; Citernesi A S; Avio L (1996) Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. New phytol 133: 65-71.

- Graham J H; Timmer L W (1984) Vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth response of rough lemon in soil and soilless media: effect of phosphorus source. J Am soc Hortic Sci 109: 118-121.
- Habte M; Soedarjo M (1995) Limitations of vesicular-arbuscular mycorrhizal activity in *Leucaena leucocephala* by Ca in an acid Mn-rich oxisol. Mycorrhiza 5: 387-394.
- Harley J L; Smith S E (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic press, London.
- Hartman H T; Kester D E; Geneve R L; Daves F T jr (1997). Plant propagation. Principles and practices. Sixth edition. New Jersey.
- Hock B; Varma A (1998) Mycorrhiza- Structure, function, molecular biology and biotechnology. Second edition. Springer –Verlag Berlin Heidelberg. 704pp.)
- Hudson H J (1992) Fungal biology. (Contemporary biology) Cambridge University press.298pp.
- Koske R E; Halvorson W L (1981) Ecological studies of vesicular-arbuscular mycorrhizae in a barrier sand dune. Can. J. Bot. 59: 1413-1422.
- Koske R E; Polson (1984) Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? Bioscience 34: 420-424.
- Koske R M; Gemma J N (1992) Fungal reaction to plants prior to mycorrhizal formation. In: Allen M J (ed) Mycorrhizal functioning, an integrative plant fungal process. pp 3-36.

- Levy Y; Krikum J (1980) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. New phytol 85: 25-31.
- Little T M; Hills F J (1978) Agricultural experimentation. Designing and Analysis. 350pp.
- Lynch J (1990) The rhizosphere. Wiley chichester, pp228.
- Machava W J (1999) O processo de infecção das raízes do feijão jugo (*Vigna subterranea* L) por fungos micorrizicos no solo arenoso do campus, e viveiros da estufa.(trab. De licenciatura). UEM Moçambique
- McLachlan A; Brown A C (1994) Ecology of Sandy Shores. Elsevier Science B. V. Amsterdam. 328p
- Malcolm R E (1983) Assessment of phosphatase activity in soils. Soil Biol Biochem 15: 403-408.
- Martins C M (1999) Análise do padrão do crescimento de duas variedades de feijão jugo (*Vigna subterranea*) em condições de stress hídrico. Trabalho de licenciatura, UEM, Maputo. 50pp
- Mengue J A (1984) Inoculon production In VA mycorrhiza. Eds. CLI Powell and D J Bagyaraj. Pp 187-203. CRC Press, Florida.
- Mosse B; Stribley D P; Letacon F (1981) Ecology of Mycorrhizae. Adv Microb Ecol 5: 137-210.
- Paul E A; Clark F E (1996) Soil Microbiology and Biochemistry. Second edition Academic Press London. 340pp.

- Porter W M; Robson A D; Abbot L K (1987) Factors controlling the distribution of mycorrhizal fungi in relation to soil pH. J Appl Ecol. 24: 663-672.
- Quilambo O A (2000) Functioning of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under nutrient deficiency and drought stress in relation to symbiotic associations. PhD thesis. Printed by Van Denderen B.V., Groningen. 168pp.
- Ranwell D S (1972) Ecology of salt marshes and sand dunes. Chapman and Hall, London.
- Raven P H; Evert R F; Eichhorn S E (1992) Biologia Vegetal. 5ª edição, Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. 726pp.
- Richards B N (1987) The Microbiology of terrestrial Ecosystems. Soil microorganisms. Longman Group UK Limited. 399pp
- Schinner F; Ohlinger R; Kandeler E; Margesin R (1995) Methods in soil Biology. Springer -Verlag Heidelberg 426pp.
- Schuepp H; Bodmer M (1991) Complex responses of VA-mycorrhizae to xenobiotic substances. Toxicol Environ chem. 30; 193-199.
- Sieverding E (1991) Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in tropical Agrossystem. Federal republic of Germany. 371p
- Singh K; Varma A K (1988) Mycorrhizal fungi stimulate legume growth and root nodulation in dry arid soil. I. Effect of dual infection of Rhizobium and VAM endomycorrhizal spores on tropical legume Bengal gram (*Cicer arietinum*). In Varma A; Karim K; Mukerji K G; Tilak K V B R; Raj J (eds) proc Mycorrhizal Worksh. IDRC, Quebec, Canada pp. 356-371.

- Singh K; Kumar D; Subburao N S; Varma A K (1988) Mycorrhizal fungi stimulate legume growth and root in dry arid soils. II. Effect of dual infection of Rhizobium and VAM endomycorrhizal spores on soybean (*Glycine max* merril). In Varma A; Karim K; Mukerji K G; Tilak K V B R; Raj J (eds) proc Mycorrhizal Worksh. IDRC, Quebec, Canada pp 372-392.
- Smith S E; Read D J (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Second edition. Academic Press, Toronto. 605
- Smith S E; Smith F A (1990) Structure an function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. 144pp. New phytol 114: 1-38.
- Soedarjo M; Habte M (1995) Mycorrhizal and nonmycorrhizal host growth in response to changes in pH and P concentrations in maganiferous oxisol .Mycorrhiza 5: 337-345.
- Speir T W; Ross D J (1978) Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns R G (ed) soil enzymes. Academic press, London, pp 197-250.
- Stahl P D; Williams S E; Christensen M (1988) Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. New phytol 110: 347-353.
- St John T V; Hays R I; Reid C P P (1983) Influence of volatile compound on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Trans Br Mycol soc 81: 153-154.
- Van Kessel C; Singleton P W; Hoben H J (1985) Enhanced nitrogen-transfer from a soybean to maize by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Plant phytol 79: 562-563.

- Varma A (1979) Vesicular –arbuscular mycorrhiza and nodulation in soybean. Folia Microbiol 24: 501-503.
- Watrud L S; Heithaus J J; Jaworski E G (1978) Geotropism in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarica*. Mycology 70: 449-452.

## ANEXOS

*Carpobrotus dimidiata*

Anexo 1

Classificação taxonómica

*Carpobrotus dimidiata* é uma dicotiledónea pertencente a:

Ordem: Centrospermae

Família: Aizoaceae

Género: *Carpobrotus*

Espécie: *Carpobrotus dimidiata*

O género *Carpobrotus* contém 12 espécies de plantas herbáceas que crescem na costa pacífica do continente americano, no Sul do continente africano e no Sudeste da Austrália. Estas espécies podem ser usadas para a estabilização de areias susceptíveis a erosão e colonizam rapidamente áreas perturbadas onde a disponibilidade da água é limitada. Elas foram introduzidas e naturalizadas em muitas regiões costeiras do mundo.

De forma geral, o género *Carpobrotus* é formado por plantas rastejantes com folhas triangulares, suculentas e perenes. O caule é longo e forma raízes nos nós.

*Carpobrotus dimidiata* é uma herbácea perene com caule cinzento. As folhas são de superfície lisa; com lâmina de secção transversal triangular, de comprimento que varia de 4 a 7 cm e largura de 0.5 a 1.2 cm. Inflorescência com um pedicelo de 10 a 50 mm de comprimento. O diâmetro da flor varia de 3 a 5 cm. Os lobos do cálice são de secção transversal triangular e com um comprimento que varia de 10 a 20 mm; as pétalas são brancas, podendo ser tri ou tetradinâmicas, aproximadamente papilosas e um comprimento que varia de 4 a 7 mm; as anteras são amarelas; o comprimento do estigma varia de 2 a 3 mm, sendo elas mais curtas que os estames e papilosas adaxialmente. Os frutos são verdes ou amarelos, ovais ou subglobosos; o número de sementes varia de 200 a 350 (Bicknell & Mackey, 1998).

*Ipomoea pes-caprae*

Anexo 2

Classificação taxonómica

*Ipomoea pes-caprae* é uma dicotiledónea pertencente a,

Ordem: Tubiflorae

Família: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea*

Espécie: *Ipomoea pes-caprae*

*Ipomoea pes-caprae* é uma espécie pioneira das dunas costeiras de regiões tropicais e subtropicais. É uma espécie que mostra, além de uma elevada produção de sementes, uma dispersão eficaz marinha (Castellani & Santos, 1998).

*Ipomoea pes-caprae* é uma herbácea perene, com superfície da planta lisa. Tem o caule prostrado, às vezes encurvado, com enraizamento nos nós. A folha tem pecíolo que varia de 2 a 10 cm de comprimento; lâmina da folha pode ser ovada, elíptica, circular, reniforme ou mais ou menos quadrada à oblonga, com 3.5 a 9 cm de comprimento e 3 a 10 cm de largura, muito espessa, abaxialmente biglandular, base geralmente cunciforme, truncada, ou ligeiramente cordiforme, margem inteira, ápice emarginado ou profundamente bilobado, mucronulada.

As flores possuem pedúnculo consistente, variando de 4 a 14 cm de comprimento; brácteas prematuramente caducas. Pedicelo com 2 a 2.5 cm de comprimento. Sépalas desiguais, mais ou menos fibrosas, lisas, ápice obtuso, mucronulado; as duas mais externas de forma ovada à elíptica, com 5 a 8 mm de comprimento, sendo as mais largas; as três mais internas são aproximadamente circulares e côncavas, com 7 a 11 cm de comprimento. A corola é vermelha, com um centro mais escuro, afunilada, com 4 a 5 cm de comprimento. O ovário é liso. O estigma é bilobado. A cápsula é mais ou menos esférica, lisa e fibrosa. As sementes são pretas (Bicknell & Mackey, 1998).

Dados obtidos na primeira colheita<sup>1</sup>

VARIABLE *	VALID N	MEAN	MINIMUM	MAXIMUM	VARIANCE	STD.DEV.	STANDARD ERROR
CoR1	15	15,3333	9,0000	25,0000	24,131	4,91233	1,26836
NR1	15	12,2000	6,0000	19,0000	18,029	4,24601	1,09631
NFo1	15	8,9333	4,0000	18,0000	13,638	3,69298	0,95352
PFR1	15	0,2434	0,0500	0,5640	0,020	0,13981	0,03610
PSR1	15	0,0832	0,0163	0,1698	0,002	0,04404	0,01137
Pco1	15	6,7700	0,0000	22,7500	67,094	8,19111	2,11493
Frco1	15	41,3333	0,0000	100,0000	1012,381	31,81793	8,21536
PFFo1	15	38,7644	9,2300	80,1240	341,511	18,48001	4,77152
PSFo1	15	1,3954	0,4365	2,4434	0,300	0,54768	0,14141
AFo1	15	220,8453	56,2480	448,6460	9839,266	99,19308	25,61154
PFC1	15	8,3017	3,2090	17,0580	14,166	3,76379	0,97181
PSC1	15	0,6254	0,3181	1,1517	0,050	0,22289	0,05755
PFT1	15	47,3095	12,4890	97,6700	469,136	21,65955	5,59247
PST1	15	2,1041	0,7709	3,7565	0,604	0,77738	0,20072
AEFo1	15	156,0728	128,8614	183,6155	322,601	17,96108	4,63753
RAFo1	15	102,8158	72,9641	120,1944	223,284	14,94270	3,85819
RPSR1	15	0,0395	0,0189	0,0911	0,000	0,01866	0,00482
RPSFo1	15	0,6564	0,5662	0,7247	0,003	0,05034	0,01300
RPSC1	15	0,3041	0,2394	0,4126	0,002	0,04619	0,01193
PEFo1	15	0,0065	0,0054	0,0078	0,000	0,00077	0,00020
%MAT.S1	15	4,6459	3,8461	6,1726	0,466	0,68253	0,17623
CoR11	15	17,6333	11,5000	28,0000	21,338	4,61932	1,19270
NR11	15	13,5333	7,0000	19,0000	11,981	3,46135	0,89372
NFo11	15	13,3333	8,0000	22,0000	21,524	4,63938	1,19788
PFR11	15	0,2892	0,1690	0,5050	0,009	0,09456	0,02442
PSR11	15	0,1082	0,0605	0,1907	0,001	0,03826	0,00988
Pco11	15	3,4713	0,1500	8,3000	6,642	2,57720	0,66543
Frco11	15	42,4820	0,5700	70,0000	415,934	20,39446	5,26583
PFFo11	15	57,5597	26,6090	105,8390	633,278	25,16502	6,49758
PSFo11	15	1,9661	1,1135	3,1838	0,437	0,66094	0,17065
AFo11	15	224,8487	103,2090	409,7030	9812,740	99,05928	25,57700
PFC11	15	13,4125	5,5800	25,3400	33,722	5,80705	1,49937
PSC11	15	0,8788	0,0163	1,6022	0,165	0,40584	0,10479
PFT11	15	71,2615	32,3990	131,4180	941,088	30,67716	7,92081
PST11	15	2,9530	1,6577	4,9371	1,010	1,00499	0,25949
AEFo11	15	111,2336	90,6057	136,9694	181,547	13,47394	3,47896
RAFo11	15	74,6266	58,1525	117,9073	230,209	15,17264	3,91756
RPSR11	15	0,0376	0,0215	0,0568	0,000	0,00907	0,00234
RPSFo11	15	0,6684	0,5687	0,9583	0,007	0,08534	0,02203
RPSC11	15	0,2940	0,0068	0,3959	0,007	0,08541	0,02205
PEFo11	15	0,0091	0,0073	0,0110	0,000	0,00108	0,00028
%MAT.S11	15	4,3330	2,7529	5,1165	0,402	0,63421	0,16375

\* índice " 1" significa dado referente à segunda colheita de plantas não inoculadas e índice "11" de plantas inoculadas.

Dados obtidos na segunda colheita

VARIABLE*	VALID N	MEAN	MINIMUM	MAXIMUM	VARIANCE	STD.DEV.	STANDARD ERROR
CoR2	15	18,4000	9,0000	28,000	45,5	6,7485	1,74247
NR2	15	14,4000	8,0000	26,000	29,3	5,4090	1,39659
NFo2	15	21,3333	2,0000	48,000	169,7	13,0256	3,36320
PFR2	15	0,4758	0,0275	1,002	0,1	0,3257	0,08410
PSR2	15	0,1881	0,0154	0,379	0,0	0,1266	0,03270
Pco2	15	10,2217	0,0000	42,300	113,9	10,6733	2,75584
Fco2	15	53,8150	0,0000	80,000	717,8	26,7910	6,91741
PFFo2	15	80,8191	4,6666	188,024	3021,7	54,9703	14,19326
PSFo2	15	2,9371	0,3823	6,238	3,0	1,7238	0,44509
AFo2	15	422,9860	28,6000	998,700	84361,9	290,4512	74,99416
PFC2	15	26,6289	3,5869	67,012	348,2	18,6603	4,81807
PSC2	15	1,7798	0,3905	4,146	1,1	1,0548	0,27234
PFT2	15	107,9238	8,2810	256,038	5446,2	73,7984	19,05467
PST2	15	4,9051	0,8322	10,763	8,3	2,8875	0,74554
AEFo2	15	133,4933	74,8104	174,323	895,5	29,9249	7,72658
RAFo2	15	79,0395	33,9950	106,898	405,1	20,1281	5,19706
RPSR2	15	0,0351	0,0124	0,053	0,0	0,0123	0,00318
RPSFo2	15	0,5870	0,4544	0,627	0,0	0,0485	0,01252
RPSC2	15	0,3778	0,3196	0,527	0,0	0,0532	0,01375
PEFo2	15	0,0079	0,0057	0,013	0,0	0,0020	0,00053
%MATS2	15	5,2736	3,8363	10,159	2,8	1,6692	0,43098
CoR22	15	23,4667	15,0000	43,000	54,6	7,3860	1,90705
NR22	15	14,7333	7,0000	22,000	15,5	3,9364	1,01637
NFo22	15	34,8000	14,0000	68,000	178,2	13,3481	3,44646
PFR22	15	0,6803	0,2638	1,254	0,1	0,2600	0,06712
PSR22	15	0,2687	0,1426	0,447	0,0	0,0999	0,02581
Pco22	15	17,5129	0,8500	44,750	174,8	13,2212	3,41369
Fco22	15	64,0000	15,0000	90,000	475,7	21,8109	5,63154
PFFo22	15	128,4312	52,4963	259,798	2955,2	54,3619	14,03619
PSFo22	15	4,2725	1,9498	7,208	2,0	1,4069	0,36327
AFo22	15	788,0887	295,2000	1540,730	128157,2	357,9905	92,43275
PFC22	15	36,1640	18,5252	80,779	261,4	16,1689	4,17478
PSC22	15	2,4860	1,3273	5,180	1,0	0,9971	0,25744
PFT22	15	165,2755	71,8282	341,325	4824,7	69,4604	17,93460
PST22	15	7,0271	3,5222	12,707	5,8	2,4004	0,61978
AEFo22	15	177,9717	146,0659	220,016	666,8	25,8218	6,66717
RAFo22	15	108,6955	81,1325	143,535	344,1	18,5487	4,78926
RPSR22	15	0,0402	0,0198	0,070	0,0	0,0147	0,00381
RPSFo22	15	0,6095	0,5531	0,665	0,0	0,0371	0,00958
RPSC22	15	0,3503	0,3052	0,408	0,0	0,0312	0,00805
PEFo22	15	0,0389	0,0233	0,059	0,0	0,0095	0,00246
%MATS22	15	4,3941	3,5585	5,153	0,3	0,5506	0,14217

\* índice " 2" significa dado referente à segunda colheita de plantas não inoculadas e índice "22" de plantas inoculadas.

Dados obtidos na terceira colheita

VARIABLE*	VALID N	MEAN	MINIMUM	MAXIMUM	VARIANCE	STD.DEV.	STANDARD ERROR
CoR3	15	20,3333	13,0000	32,000	35,2	5,9362	1,53271
NR3	15	14,0667	8,0000	24,000	17,8	4,2167	1,08876
NFo3	15	36,8667	12,0000	74,000	464,7	21,5568	5,56594
PFR3	15	0,5387	0,1736	1,202	0,1	0,2657	0,06861
PSR3	15	0,2431	0,0862	0,485	0,0	0,1168	0,03015
Pco3	15	11,5595	1,0000	43,500	157,6	12,5545	3,24155
Fco3	15	65,9883	25,0000	90,000	396,6	19,9146	5,14192
PFFo3	15	86,7840	25,0826	201,340	3632,4	60,2693	15,56147
PSFo3	15	4,6809	1,7903	9,323	7,1	2,6553	0,68561
AFo3	15	549,6180	146,3100	1320,700	146229,8	382,4000	98,73525
PFC3	15	30,1590	7,2043	66,658	465,2	21,5692	5,56915
PSC3	15	2,8092	0,7976	6,199	3,3	1,8213	0,47026
PFT3	15	117,4817	32,8738	268,650	6696,2	81,8303	21,12848
PST3	15	7,7332	2,8602	15,903	20,8	4,5608	1,17760
AEFo3	15	110,6626	81,7237	155,796	327,9	18,1068	4,67515
RAFo3	15	67,7249	51,1538	93,375	98,1	9,9052	2,55751
RPSR3	15	0,0351	0,0188	0,061	0,0	0,0129	0,00333
RPSFo3	15	0,6141	0,5692	0,688	0,0	0,0298	0,00770
RPSC3	15	0,3508	0,2746	0,412	0,0	0,0374	0,00965
PEFo3	15	0,0092	0,0064	0,012	0,0	0,0014	0,00037
%MATS3	15	7,0971	5,2648	8,767	1,2	1,0918	0,28189
CoR33	15	25,5667	16,0000	36,000	39,0	6,2418	1,61161
NR33	15	18,0667	7,0000	25,000	22,9	4,7879	1,23623
NFo33	15	59,3333	30,0000	93,000	311,1	17,6379	4,55408
PFR33	15	0,8767	0,4101	1,196	0,1	0,2536	0,06547
PSR33	15	0,3904	0,2086	0,518	0,0	0,1030	0,02659
Pco33	15	26,6167	3,7000	73,750	380,6	19,5078	5,03690
Fco 33	15	78,4000	60,0000	100,000	200,7	14,1664	3,65774
PFFo33	15	139,3472	37,6045	224,905	3190,0	56,4804	14,58318
PSFo33	15	7,5194	3,5054	11,796	6,0	2,4403	0,63009
AFo33	15	894,3107	311,4600	1459,100	116334,0	341,0778	88,06590
PFC33	15	48,0928	14,0937	84,978	489,6	22,1258	5,71286
PSC33	15	4,5779	2,1492	7,289	3,0	1,7335	0,44760
PFT33	15	188,3167	52,8156	310,469	6162,9	78,5041	20,26966
PST33	15	12,4877	6,3165	19,329	17,3	4,1563	1,07314
AEFo33	15	116,6050	88,8515	139,762	224,1	14,9711	3,86553
RAFo33	15	70,3144	49,3090	83,252	76,8	8,7623	2,26242
RPSR33	15	0,0343	0,0126	0,080	0,0	0,0150	0,00387
RPSFo33	15	0,6037	0,5537	0,652	0,0	0,0276	0,00712
RPSC33	15	0,3619	0,3199	0,416	0,0	0,0253	0,00652
PEFo33	15	0,0087	0,0072	0,011	0,0	0,0012	0,00031
%MATS33	15	7,0363	5,7962	11,960	2,2	1,4917	0,38515

\* índice "3" significa dados dado referente à terceira colheita de plantas não inoculadas e índice "33" de plantas inoculadas.

Test t-student  
Primeira colheita

Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	P Variances
CoR1 vs. CoR11	15,3333	17,6333	-1,3210	28	0,197183	4,91233	4,61932	1,130886E+00	0,821221
NR1 vs. NR11	12,2000	13,5333	-0,9427	28	0,353918	4,24601	3,46135	1,504769E+00	0,454198
NFo1 vs. NFo11	8,9333	13,3333	-2,8738	28	0,007656	3,69298	4,63938	1,578212E+00	0,403706
PSR1 vs. PSR11	0,0832	0,1082	-1,6548	28	0,109136	0,04404	0,03826	1,325007E+00	0,605617
Pco1 vs. Pco11	6,7700	3,4713	1,4878	28	0,147981	8,19111	2,57720	1,010155E+01	0,000101
Frc01 vs. Frc011	41,3333	42,4820	-0,1177	28	0,907135	31,81793	20,39446	2,433994E+00	0,107529
PSFo1 vs. PSFo11	1,3954	1,9661	-2,5747	28	0,015610	0,54768	0,66094	1,456345E+00	0,490897
AFo1 vs. AFo11	220,8453	224,8487	-0,1106	28	0,912721	99,19308	99,05928	1,002703E+00	0,996042
PSC1 vs. PSC11	0,6254	0,8788	-1,8841	28	0,069963	0,22289	0,40584	3,315326E+00	0,836219
PFT1 vs. PFT11	47,3095	71,2615	-2,4703	28	0,019858	21,65955	30,67716	2,006003E+00	0,205158
PST1 vs. PST11	2,1041	2,9530	-2,5876	28	0,015147	0,77738	1,00499	1,671304E+00	0,347805
AEFo1 vs. AEFo11	156,0728	111,2336	7,7344	28	0,000000	17,96108	13,47394	1,776953E+00	0,293944
RAFo1 vs. RAFo11	102,8158	74,6266	5,1268	28	0,000020	14,94270	15,17264	1,031013E+00	0,955241
RPSR1 vs. RPSR11	0,0395	0,0376	0,3626	28	0,719629	0,01866	0,00907	4,231955E+00	0,010774
RPSFo1 vs. PSFo11	0,6564	1,9661	-7,6524	28	0,000000	0,05034	0,66094	1,724057E+02	0,000000
RPSC1 vs. RPSC11	0,3041	0,2940	0,4014	28	0,691170	0,04619	0,08541	3,419160E+00	0,028174
PEFo1 vs. PEFo11	0,0065	0,0091	-7,6451	28	0,000000	0,00077	0,00108	1,944587E+00	0,225741
%MAT.S1 vs. %MAT.S11	4,6459	4,3330	1,3008	28	0,203941	0,68253	0,63421	1,158163E+00	0,787371

Test t-student  
Segunda colheita

Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	P Variances
CoR2 vs. CoR22	18,4000	23,4667	-1,9614	28	0,059848	6,7485	7,3860	1,197825E+00	0,740262
NR2 vs. NR22	14,4000	14,7333	-0,1930	28	0,848366	5,4090	3,9364	1,888138E+00	0,246612
NFo2 vs. NFo22	21,3333	34,8000	-2,7965	28	0,009232	13,0256	13,3481	1,050126E+00	0,928382
PSR2 vs. PSR22	0,1881	0,2687	-1,9331	28	0,063389	0,1266	0,0999	1,605808E+00	0,386237
Pco2 vs. Pco22	10,2217	17,5129	-1,6619	28	0,107686	10,6733	13,2212	1,534406E+00	0,433099
Fco2 vs. Fco22	53,8150	64,0000	-1,1418	28	0,263198	26,7910	21,8109	1,508804E+00	0,451266
PSFo2 vs. PSFo22	2,9371	4,2725	-2,3244	28	0,027582	1,7238	1,4069	1,501198E+00	0,456809
AFo2 vs. AFo22	422,9860	788,0887	-3,0673	28	0,004752	290,4512	357,9905	1,519137E+00	0,443844
PSC2 vs. PSC22	1,7798	2,4860	-2,11906	28	0,043087	1,0548	0,9971	1,119096E+00	0,032138
PFT2 vs. PFT22	107,9238	165,2755	-2,1917	28	0,036879	73,7984	69,4604	1,128807E+00	0,823849
PST2 vs. PST22	4,9051	7,0271	-2,1887	28	0,037117	2,8875	2,4004	1,446990E+00	0,498318
AEFo2 vs. AEFo22	133,4933	177,9717	-4,3583	28	0,000160	29,9249	25,8218	1,343048E+00	0,588461
RAFo2 vs. RAFo22	79,0395	108,6955	-4,1962	28	0,000248	20,1281	18,5487	1,177547E+00	0,764036
RPSR2 vs. RPSR22	0,0351	0,0402	-1,0247	28	0,314287	0,0123	0,0147	1,433087E+00	0,509550
RPSFo2 vs. RPSFo22	0,5870	0,6095	-1,4262	28	0,164868	0,0485	0,0371	1,707171E+00	0,328452
RPSC2 vs. RPSC22	0,3778	0,3503	1,7305	28	0,094543	0,0532	0,0312	2,916064E+00	0,054418
PEFo2 vs. PEFo22	0,0079	0,0389	-12,2933	28	0,000000	0,0020	0,0095	2,170954E+01	0,000001
MATS2 vs. MATS22	5,2736	4,3941	1,9380	28	0,062769	1,6692	0,5506	9,189594E+00	0,000176

Test t-student  
Terceira colheita

Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	P Variances
CoR3 vs. CoR33	20,3333	25,5667	-2,3530	28	0,025877	5,9362	6,2418	1,105608E+00	0,853650
NR3 vs. NR33	14,0667	18,0667	-2,4282	28	0,021852	4,2167	4,7879	1,289234E+00	0,641028
NFo3 vs. NFo33	36,8667	59,3333	-3,1240	28	0,004124	21,5568	17,6379	1,493739E+00	0,462310
PSR3 vs. PSR33	0,2431	0,3904	-3,6642	28	0,001026	0,1168	0,1030	1,286049E+00	0,644272
Pco3 vs. Pco33	11,5595	26,6167	-2,5138	28	0,017972	12,5545	19,5078	2,414466E+00	0,110654
Fco3 vs. Fco 33	65,9883	78,4000	-1,9669	28	0,059172	19,9146	14,1664	1,976178E+00	0,214890
PSFo3 vs. PSFo33	4,6809	7,5194	-3,0483	28	0,004983	2,6553	2,4403	1,183973E+00	0,756431
AFo3 vs. AFo33	549,6180	894,3107	-2,6053	28	0,014534	382,4000	341,0778	1,256982E+00	0,674582
PSC3 vs. PSC33	2,8092	4,5779	-2,7243	28	0,010976	1,8213	1,7335	1,103802E+00	0,856005
PFT3 vs. PFT33	117,4817	188,3167	-2,4193	28	0,022297	81,8303	78,5041	1,086534E+00	0,878793
PST3 vs. PST33	7,7332	12,4877	-2,9841	28	0,005842	4,5608	4,1563	1,204155E+00	0,732974
AEFo3 vs. AEFo33	110,6626	116,6050	-0,9796	28	0,335674	18,1068	14,9711	1,462762E+00	0,485871
RAFo3 vs. RAFo33	67,7249	70,3144	-0,7584	28	0,454567	9,9052	8,7623	1,277870E+00	0,652672
RPSR3 vs. RPSR33	0,0351	0,0343	0,1535	28	0,879092	0,0129	0,0150	1,351673E+00	0,580422
RPSFo3 vs. RPSFo33	0,6141	0,6037	0,9894	28	0,330935	0,0298	0,0276	1,169712E+00	0,773396
RPSC3 vs. RPSC33	0,3508	0,3619	-0,9582	28	0,346182	0,0374	0,0253	2,187385E+00	0,155320
PEFo3 vs. PEFo33	0,0092	0,0087	1,1071	28	0,277669	0,0014	0,0012	1,410269E+00	0,528521
MATS3 vs. MATS33	7,0971	7,0363	0,1274	28	0,899551	1,0918	1,4917	1,866784E+00	0,255034

## Anexo 9

Correlação entre a percentagem de colonização por fungos (X) e o peso seco total da planta (Y)

Var. X & Var. Y	Mean	Std.Dv.	r(X,Y)	r <sup>2</sup>	t	p	N	Constant dep: Y	Slope dep: X	Constant dep: Y	Slope dep: X
Pco1	6,77000	8,19111									
PST1	2,10410	0,77738	-0,301993	0,091200	-1,14218	0,273981	15	2,29813	-0,028661	13,46533	-3,18204
Pco11	3,47133	2,57720									
PST11	2,95299	1,00499	0,439860	0,193477	1,76595	0,100863	15	2,35757	0,171525	0,14042	1,12798
Pco2	10,22167	10,67333									
PST2	4,90510	2,88748	-0,053661	0,002879	-0,19376	0,849362	15	5,05349	-0,014517	11,19460	-0,19835
Pco22	17,51293	13,22117									
PST22	7,02713	2,40041	-0,163482	0,026726	-0,59748	0,560451	15	7,54694	-0,029681	23,84041	-0,90044
Pco3	11,55947	12,55447									
PST3	7,73323	4,56083	0,523896	0,274467	2,21763	0,045015	15	5,53320	0,190323	0,40728	1,44211
Pco33	26,61667	19,50783									
PST33	12,48767	4,15626	-0,151681	0,023007	-0,55330	0,589450	15	13,34783	-0,032317	35,50702	-0,71193

- <sup>1</sup> CoR – comprimento máximo da raiz (cm)  
 NR - número da raízes por planta  
 NFO - número de folhas por planta  
 PFR— peso fresco da raiz (g)  
 PSR— peso seco da raiz (g)  
 Pco - percentagem de colonização (%)  
 Fco — frequência de colonização (%)  
 PFFo - peso fresco da folha (g)  
 PSF- peso seco da folha (g)  
 AFO - área foliar (cm<sup>2</sup>)  
 PFC - peso fresco do caule (g)  
 PSC - peso seco do caule (g)  
 PFT- peso fresco total (g)  
 PST- peso seco total (g)  
 AEFo – á específica da folha (cm<sup>2</sup>/g)  
 RAFo – razão da área foliar (cm<sup>2</sup>/g)  
 RPSR – razão do peso seco da raiz (g/g)  
 RPSFo – razão do peso seco da folha (g/g)  
 RPSC – razão do peso seco do caule (g/g)  
 PEFo – peso específico da folha (g/cm<sup>2</sup>)  
 %MATS – percentagem de matéria seca (%)

