

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E FLAVONOIDES TOTAIS EM  
*Calendula officinalis* L. EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM  
MICORRIZAS ARBUSCULARES E DOSES DE FÓSFORO

**LETÍCIA CELIA HEITOR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2013

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E FLAVONOIDES TOTAIS EM  
*Calendula officinalis* L. EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM  
MICORRIZAS ARBUSCULARES E DOSES DE FÓSFORO

**LETÍCIA CELIA HEITOR**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 088/2013

Heitor, Letícia Celia

Crescimento, nutrição e flavonoides totais em *Calendula officinalis* L. em resposta a inoculação com micorrizas arbusculares e doses de fósforo / Letícia Celia Heitor. – 2013.

56 f.

Orientador: Marco Antonio Martins

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 46 – 53.

1. Planta medicinal 2. *Gigaspora margarita* 3. *Glomus clarum* 4. Calêndula I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD –

631.4

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E FLAVONOIDES TOTAIS EM  
*Calendula officinalis* L. EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM  
MICORRIZAS ARBUSCULARES E DOSES DE FÓSFORO

**LETÍCIA CELIA HEITOR**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 4 de Julho de 2013.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Marta Simone Mendonça Freitas (Dsc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (Dsc., Produção Vegetal) - UVV

---

Cláudia Lopes Prins (Dsc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D. Microbiologia do Solo) – UENF  
Orientador

Em memória da minha inesquecível avó Maria,  
À minha mãe Aparecida Celia  
Dedico...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida e por todas as bênçãos derramadas durante todos os momentos que precisei;

À minha mãe Aparecida Celia Heitor pelo amor, incentivo à educação e confiança;

A toda a minha família pela bondade e ajuda durante os melhores e piores momentos da minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), que possibilita a formação de qualidade de seus alunos, e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa;

Ao Prof. Orientador Marco Antônio pela oportunidade em desenvolver este trabalho;

À Pfof<sup>a</sup>. Marta Simone pela coorientação, amizade, compreensão e valiosos conselhos durante a elaboração deste trabalho;

Aos técnicos do LSOL/CCTA Andréia Francisca, Kátia e Ederaldo pelo suporte na condução e análises do experimento;

Ao técnico do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Senhor José Acácio pela cooperação com as análises de nutrientes;

Aos funcionários de apoio ao campo Sr. Zélio e Romualdo pelas coletas de solo e apoio durante o experimento;

A todos os meus amigos e colegas do laboratório de Microbiologia do Solo e de Nutrição Mineral de Plantas que ajudaram na condução e análises do

experimento, Késsia, Fernando, Vanessa, Sumaya, Wagner, Dâmaris e Cláudia,  
que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho;  
.Aos amigos Jocarla, Fernanda, Jeferson, Marlon e Francemir pelos bons  
momentos de estudo e agradável convívio durante as disciplinas;  
A todos que, direta e indiretamente, colaboraram com a elaboração deste  
trabalho...

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS .....   | vii |
| LISTA DE FIGURAS .....   | ix  |
| RESUMO.....  | x   |
| ABSTRACT.....  | xii |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                   | 4   |
| 2.1. Calêndula.....  | 4   |
| 2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....                | 6   |
| 2.3. Adubação fosfatada e FMAs.....                              | 9   |
| 2.4. Compostos fenólicos.....                                    | 11  |
| 2.5. Fungos micorrízicos na produção de compostos fenólicos..... | 13  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                       | 16  |
| 3.1. Delineamento experimental .....                             | 16  |
| 3.2. Preparo do substrato .....                                  | 16  |
| 3.3. Multiplicação dos inóculos de FMAs .....                    | 17  |
| 3.4. Produção das mudas de Calêndula .....                       | 18  |
| 3.5. Colheita e variáveis analisadas.....                        | 18  |
| 3.5.1. Avaliação da massa fresca e seca .....                    | 19  |
| 3.5.2. Análise de nutrientes na parte aérea .....                | 20  |
| 3.5.3. Porcentagem de colonização micorrízica .....              | 20  |
| 3.5.4. Análise de flavonoides totais .....                       | 21  |



|   |    |
|---|----|
| 3.6. Análises estatísticas .....  | 21 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 23 |
| 4.1. Crescimento e produção de capítulos florais em plantas de Calêndula..... | 23 |
| 4.2. Porcentagem de colonização micorrízica .....                             | 33 |
| 4.3. Conteúdos de N, P, K, Ca e Mg na massa seca da parte aérea .....         | 35 |
| 4.4. Teor de flavonoides totais .....   | 41 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES .....  | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 46 |
| APÊNDICE.....   | 54 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação dos Glomeromycota segundo Órdens, Famílias, Gêneros e números de espécies descritas por gêneros (AMF-Taxonomy e Phylogeny, 2009).....  | 7  |
| Tabela 2: Altura das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e das doses de P no substrato, aos 85 dias após a semeadura.....                           | 24 |
| Tabela 3: Massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e adubação fosfatada .....          | 24 |
| Tabela 4: Massa seca da raiz (MSR) das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e das doses de P aplicadas ao substrato aos 85 dias após a semeadura... | 28 |
| Tabela 5: Número de capítulos florais de calêndula, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e das doses de P ao substrato .....   | 30 |
| Tabela 6: Massa seca de capítulos florais das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e das doses de P no substrato .....                               | 31 |
| Tabela 7: Colonização micorrízica em plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e adubação fosfatada.....                     | 33 |

|   |    |
|---|----|
| Tabela 8: Conteúdo de N, K e Mg na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada .....                       | 36 |
| Tabela 9: Conteúdo de P ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada .....   | 38 |
| Tabela 10: Conteúdo de Ca ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada ..... | 40 |
| Tabela 11: Teor de flavonoides totais nos capítulos florais da calêndula em função dos fungos micorrízicos arbusculares e das doses de P no substrato.....  | 41 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Esquema simplificado das rotas biossintéticas para a produção de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides..... | 12 |
|--|----|

## RESUMO

Heitor, Leticia Celia. Eng. Agrônoma, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2013. Crescimento, nutrição e flavonoides totais em *Calendula officinalis* L. em resposta a inoculação com micorrizas arbusculares e doses de fósforo. Orientador: Prof. Marco Antonio Martins. Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Marta Simone Mendonça Freitas.

Conduziu-se um experimento em casa de vegetação com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e doses de fósforo sobre o crescimento, a produção de capítulos florais, o conteúdo de nutrientes na parte aérea e o teor de flavonoides totais nas flores de *Calendula officinalis* L. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial de 3 x 2, sendo três tratamentos microbiológicos: *Glomus clarum* (Nicolson & Schenck), *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) e controle (sem fungo) e duas doses de fósforo 0 e 50 mg dm<sup>-3</sup>, com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por dois vasos de plástico com capacidade para 6 dm<sup>3</sup> de solo cada, contendo duas plantas por vaso. As plantas foram produzidas a partir de sementes em vasos de 6 dm<sup>-3</sup>, contendo como substrato uma mistura de solo e areia na proporção de 1:1(v/v), esterilizado em autoclave por duas vezes a 121°C. Aos 85 dias após a semeadura as plantas foram coletadas e avaliadas altura, massa seca da parte aérea e da raiz, número, diâmetro e massa seca dos capítulos florais, porcentagem de colonização micorrízica, acúmulo de N, P, K, Ca e Mg na parte aérea das plantas e teor de

flavonoides totais nas flores. Verificou-se que a inoculação das plantas de calêndula com a espécie *Gigaspora margarita* proporcionou aumentos no crescimento e na produção de capítulos florais em baixa disponibilidade de P no substrato. A espécie *G. margarita*, proporcionou aumento significativo na absorção e acúmulo de N e K na parte aérea das plantas de calêndula, independente da adubação fosfatada. O conteúdo de P e Ca foi influenciado significativamente pelas espécies de FMAs e adubação fosfatada, destacando-se a presença de *Gigaspora margarita* na ausência de adubação fosfatada em proporcionar maior acúmulo de P. A adubação fosfatada reduziu os teores de flavonoides totais, nos capítulos florais das plantas de calêndula cultivadas sem FMA e aumentou significativamente com a inoculação por *Gigaspora margarita*.

## ABSTRACT

Heitor, Letícia Celia. Agronomist, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2013. Growth, nutrition and total flavonoids in *Calendula officinalis* L. in response to mycorrhizal inoculation and phosphorus levels. Advisor: Prof. Marco Antonio Martins. Coadvisor: Prof<sup>a</sup>. Marta Simone Mendonça Freitas.

An experiment, under greenhouse conditions, was carried out to evaluate the effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and phosphorus levels on growth, production of capitula, nutrient contents in shoot and total flavonoid content in *Calendula officinalis* L flowers. The experiment was carried out in a randomized complete 3x2 factorial block design, with three microbiological treatments: *Glomus clarum* (Nicolson & Schenck), *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) and control (without fungus) and two phosphorus levels, 0 and 50 mg dm<sup>-3</sup>, with four replications. The experimental unit consisted of two plastic pots, each with a capacity of 6 dm<sup>3</sup> of soil, containing two plants per pot. The plants were grown from seeds in pots of 6 dm<sup>3</sup> containing as substrate soil and sand mixture the ratio of 1:1 (v/v) sterile by autoclaving twice to 121° C. 85 days after sowing, the plants were collected and the height, dry matter of shoot and root, number, diameter and dry matter of capitula, percentage of root colonization, accumulation of N, P, K, Ca and Mg in the shoots and total flavonoid content in the flowers were evaluated. It was observed that the inoculation of marigold plants with the *Gigaspora margarita* species provide increases in the growth and production of

capitula, in low availability of P levels in the substrate. The *Gigaspora margarita* species provide significant increases in the absorption and accumulation of N and K in shoots of marigold plants, independent of phosphate fertilizer. The content of P and Ca was significantly influenced by the AMF and phosphate fertilizer, highlighted the presence of *Gigaspora margarita* in the absence of phosphate fertilizer to provide greater accumulation of P. Phosphorus fertilization decreased the concentration of total flavonoid in capitula of marigold plants grown without AMF and significantly increased by inoculation with *Gigaspora margarita*.



## 1. INTRODUÇÃO

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) é uma planta que apresenta importância econômica tanto na indústria medicinal, alimentícia e cosmética como no setor ornamental. Seu extrato pode ser utilizado em alimentos, como fonte de corante natural e na confecção de cremes, xampus e sabonetes (Parente et al., 2002; Luz et al., 2001). Como constituinte de compostos fitoterápicos, tem grande potencial na produção de medicamentos, especialmente por estar contida na lista das espécies medicinais de interesse ao Ministério da Saúde para uso no SUS (Ministério da Saúde, 2009). É utilizada no tratamento de diversas enfermidades apresentando ação antimicrobiana, anti-inflamatória, bactericida, antitumoral, diurético, analgésico, cicatrizante e antisséptica (Parente et al., 2009; Parente et al., 2002; Scalco, 2009).

Os compostos considerados fitoterápicos na calêndula são extraídos das folhas, inflorescências (capítulos florais) ou sementes (Fritsche et al., 1999), porém as flores são as partes mais utilizadas e também as mais estudadas. Delas podem ser obtidos, o óleo essencial (até 0,3%), os princípios amargos (calendulina e calendina), carotenoides (Azzaz et al., 2007), glicosídeos, triterpenos, saponinas, ácido calêndico e flavonoides (Luz et al., 2001; Bauer, 2010), representados na grande maioria pelos compostos de quercetina e rutina, também usados como marcadores para aferir a qualidade da matéria-prima (Rodrigues et al., 2004).

O grande interesse em pesquisas relacionadas à otimização da produção de princípios ativos derivados de plantas medicinais e o investimento das

indústrias vêm crescendo nos últimos anos (Manganotti., 2011; Bortolo et al., 2009; Borella et al., 2011). Apesar de o Brasil se destacar na produção de alguns princípios ativos, como por exemplo, na produção de óleos essenciais, de acordo com Manganotti. (2011), o país sofre de problemas crônicos com a falta de padronização da qualidade e alta variabilidade na concentração das substâncias bioativas. Nesse sentido, o desenvolvimento de técnicas para a otimização da capacidade produtiva, de princípios ativos de plantas medicinais em quantidade e qualidade é de grande importância.

A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é uma alternativa à produção de metabólitos secundários, pois os microrganismos são capazes de formar micélio externo à raiz e explorar maior volume de solo onde, anteriormente, o sistema radicular não conseguiria atuar. Podendo assim favorecer maior absorção de nutrientes, como o fósforo (P) e maiores estímulos ao crescimento e síntese de princípios ativos (Moreira e Siqueira, 2006, Freitas et al., 2004).

O P é um nutriente essencial para o metabolismo vegetal, pois participa da síntese de moléculas essenciais à sobrevivência das plantas, como ácidos nucleicos, ATP e membranas plasmáticas (Taiz e Zeiger, 2004). Para a *Calendula officinales* L., Barboza et al. (2009) concluíram que a máxima produção de capítulos florais ocorreu na dose de 10,73 mg dm<sup>-3</sup> de P, associado a 6,70 g dm<sup>-3</sup> de cama-de-frango. Moreira et al. (2005), trabalhando com vasos de 3,5 L observaram que a massa fresca de capítulos florais de calêndula é influenciada apenas pelas doses de P, sendo máxima (4,70 g vaso<sup>-1</sup>) com a utilização de 118,63 mg vaso<sup>-1</sup> de P.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos trabalhos, demonstrando a importância dos FMAs na absorção de nutrientes e/ou na produção de compostos do metabolismo secundário, em diversas espécies de plantas medicinais, como por exemplo, em raízes de *Chlorophytum borivillianum* (Dave et al., 2011) e *Passiflora edulis* (Soares et al., 2005), na parte aérea de *Wedelia chinensis* (Nisha e Rajeshkumar, 2010) e de *Mentha arvensis* (Freitas et al., 2004), e ainda na parte aérea e raízes de *Salvia officinalis* L. (Nell et al., 2009) e *Trifolium repens* (Ponce et al., 2004). Porém, a contribuição das diferentes espécies de FMAs na absorção de fósforo e na produção de metabólitos secundários é variada. Por

isso, a importância de estudos que correlacionem diferentes espécies de FMAs na composição química e produção de princípios ativos em plantas medicinais.

Dessa forma, o cultivo de plantas medicinais para a padronização das concentrações de princípios ativos, associados à inoculação micorrízica e adubação fosfatada, torna-se necessário devido ao seu enorme potencial para a produção de fármacos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com FMAs sobre o crescimento, a produção de capítulos florais, o acúmulo de nutrientes e flavonoides totais em plantas de *Calendula officinalis* L.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Calêndula

A Calêndula (*Calendula officinalis* L.), também conhecida como malmequer, maravilha, malmequer-dos-jardins, é uma planta herbácea anual, pertencente à família Asteraceae. Seu nome genérico deriva do latim *calendae*, que significa primeiro dia do mês, pois na Antiga Roma, esta planta sempre se encontrava com flor aberta no primeiro dia do mês (Luz et al., 2001; Vieira et al., 2006).

Diferentes origens são mencionadas para a calêndula, como por exemplo, o Egito (Luz et al., 2001), e a região Mediterrânea (Rodrigues et al., 2004; Vieira et al., 2006; Parente et al., 2002) mas, a certeza é que ela é cultivada desde o século XII, sendo amplamente distribuída por todo o mundo, e aclimatada no Brasil (Araújo et al., 2009).

Entre as características morfológicas, a calêndula possui raízes fasciculadas, caule anguloso, curto e sólido, com uma variação de 30 a 60 cm de altura. Folhas grossas, ligeiramente dentadas, alternas, lanceoladas com pelos glandulares em todas as faces. Nos extremos do caule encontram-se os capítulos florais, de coloração que pode variar de amarelo claro a fortemente alaranjado, reunidos em inflorescências, cujo diâmetro varia entre 3 a 6 cm, onde são formadas as flores liguladas e férteis nas margens e tubulares e estéreis no centro (Luz et al., 2001; Centeno, 2004).

Devido às suas propriedades químicas e morfológicas, a utilização da calêndula é bastante variada. Ela tem importância econômica tanto na indústria medicinal, alimentícia e cosmética como no setor ornamental. Seu extrato pode ser utilizado em alimentos, como fonte de corante natural, e na confecção de cremes, xampus e sabonetes. Além disso, apresenta ação antimicrobiana, anti-inflamatória, bactericida, antitumoral, diurético, analgésico, antisséptica e cicatrizante de tecido cutâneo (Parente et al., 2009; Parente et al., 2002; Scalco, 2009; Luz et al., 2001; Hussain et al., 2012).

O Ministério da Saúde divulgou, em fevereiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Uma lista com 71 espécies, entre elas, a *Calendula officinalis* L., cujo objetivo é de “orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença” (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/>).

Os compostos considerados fitoterápicos são extraídos das folhas, inflorescências (capítulos florais) ou sementes (Fritsche et al., 1999), porém as flores são as partes mais utilizadas e também as mais estudadas. Delas podem ser obtidos o óleo essencial (até 0,3%), os princípios amargos (calendulina e calendina), o carotenoide (luteína), os glicosídeos, os triterpenos, os flavonoides, as saponinas e o ácido calêndico (Luz et al., 2001; Azzaz et al., 2007 e Bauer, 2010).

Com os avanços farmacológicos, químicos e industriais muitos destes compostos sofreram modificações na forma de uso, passando alguns deles, a ser sintetizados artificialmente mantendo isoladas as substâncias ativas (Manganotti, 2011). No entanto, o custo e o tempo de produção de um medicamento sintético pode ser 10 vezes maior que um medicamento derivado de produtos naturais a base de plantas medicinais (Souza e Miranda, 2013).

A cada ano que passa o interesse é maior em pesquisas relacionadas à otimização da produção de princípios ativos derivados de plantas medicinais. Estudos realizados por Bortolo et al. (2009) demonstraram que os maiores valores de florescimento, tanto em número, quanto em massa seca de flores (15,4 g planta<sup>-1</sup>), além do maior rendimento de flavonoides (0,072 g planta<sup>-1</sup>), ocorreram quando as plantas não receberam irrigação. Segundo Borella et al. (2011), o teor

de flavonoides dos capítulos florais da calêndula pode chegar a valores de até 0,79%, através da utilização conjunta de adubação química (100 kg de N ha<sup>-1</sup> + 50 kg de P ha<sup>-1</sup>) + cobertura morta de grama seca (*Paspalum notatum*). Araujo et al. (2009) também obtiveram altos teores de flavonoides totais (0,70%), nos tratamentos que receberam cobertura morta e aplicação de 59 t ha<sup>-1</sup> de composto orgânico. Ou seja, através da manipulação do ambiente de cultivo pode-se produzir grande número de matérias-primas, cruciais para a obtenção de princípios ativos.

Diante dos estudos apresentados é possível observar a grande potencialidade da espécie, em atingir valores de princípios ativos superiores, ao mínimo exigido (0,40%) pela Farmacopeia Brasileira, para a comercialização como droga vegetal. No entanto, Pacheco (2007) relatou que a grande maioria da matéria-prima vegetal proveniente de plantas de calêndula apresenta teor de flavonoides entre 0,05 e 0,1%. Desta forma, uma droga que apresente mais de 0,1% de flavonoides pode ser considerada como sendo de qualidade.

Sendo assim, estudos direcionados à produção de calêndula em nível comercial visando maior rendimento, em quantidade e qualidade, de princípios ativos é de extrema importância, para a adequação dos plantios e produção de insumos fitoterápicos de interesse ao SUS.

## **2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)**

Para descrever as associações entre raízes da maioria das plantas vasculares e alguns fungos do solo, o termo micorriza foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885, originando-se da combinação de duas palavras, uma do Grego miKés, que significa fungo, e outra do Latim rhiza, que significa raiz. Essas associações são de ocorrência generalizada na maioria das espécies vegetais e estima-se que cerca de 25000 espécies são capazes de formar micorrizas, sendo dessa forma caracterizadas como regra e não como exceção na natureza (Moreira e Siqueira, 2006).

Com base nos diferentes fungos envolvidos e nas estruturas formadas pelas combinações entre raízes e microrganismos, as associações são classificadas em sete diferentes grupos: Arbuscular, Ectomicorriza,

Ectendomicorriza, Arbutoide, Monotropoide, Ericoide e Orquidoide. Dentre essas micorrizas, a associação do tipo arbuscular tem ocorrência generalizada em mais de 80% das plantas vasculares (Moreira e Siqueira, 2006; Peterson et al., 2004).

De acordo com a classificação atual os FMAs são divididos em onze famílias, dezessete gêneros e duzentas e vinte e nove espécies (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos Glomeromycota segundo Ordens, Famílias, Gêneros e números de espécies descritas por gêneros (AMF-Taxonomy e Phylogeny, 2009)

| <b>Filo Glomeromycota</b>    |                      |                 |                       |            |
|------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|------------|
| <b>Classe Glomeromycetes</b> |                      |                 |                       |            |
| <b>Órdem</b>                 | <b>Família</b>       | <b>Gênero</b>   | <b>Nº de espécies</b> |            |
| Glomerales                   | Glomeraceae          | Glomus          | 77                    |            |
|                              |                      | Funneliformis   | 11                    |            |
|                              |                      | Rizophagus      | 9                     |            |
|                              |                      | Sclerocystis    | 10                    |            |
| Diversisporales              | Claroideoglomeraceae | Claroideoglomus | 6                     |            |
|                              |                      | Gigasporaceae   | 8                     |            |
|                              | Gigasporaceae        | Gigaspora       | 28                    |            |
|                              |                      | Scutellospora   | 11                    |            |
|                              |                      | Racocetra       | 37                    |            |
|                              | Acaulosporaceae      | Acaulospora     | 3                     |            |
|                              | Entrophosporaceae    | Entrophospora   | 7                     |            |
|                              | Pacisporaceae        | Pacispora       | 6                     |            |
| Diversisporaceae             | Diversispora         | 1               |                       |            |
| Otopora                      | 3                    | 1               |                       |            |
| Paraglomerales               | Paraglomeraceae      | Paraglomus      | 3                     |            |
| Archaeosporales              | Geosiphonaceae       | Geosiphon       | 1                     |            |
|                              | Ambisporaceae        | Ambispora       | 9                     |            |
|                              | Archaeosporaceae     | Archaeospora    | 2                     |            |
| <b>Total:</b>                | <b>4</b>             | <b>11</b>       | <b>17</b>             | <b>229</b> |

Os FMAs são considerados biotróficos obrigatórios, pois apenas completam o seu ciclo de vida se estiverem associados às raízes de plantas hospedeiras. Estas plantas lhes fornecem fotoassimilados resultantes do processo fotossintético, ocasionando um estabelecimento mútuo entre ambos, permitindo-lhes melhor absorção de nutrientes do solo (Marshener e Dell, 1994).

Durante o processo de colonização podem ser formadas estruturas inter e intracelularmente na região do córtex radicular, como as vesículas, consideradas

fontes de reservas, os esporos, responsáveis pela disseminação e sobrevivência dos microrganismos, e os arbúsculos, considerados como estruturas características dos FMAs (Siqueira et al., 2002).

O início da colonização é caracterizado pelo crescimento de uma hifa infectiva a partir de um esporo germinado, segmento de raiz ou de hifa no solo, com a formação posterior de arbúsculos, hifas e/ou vesículas (Bago et al., 2000). Não se conhece o mecanismo exato pelo qual os esporos são ativados a germinar, mas sabe-se que sua simples extração do solo via úmida é suficiente para desencadear a germinação (Moreira e Siqueira, 2006). Contudo, a presença de exsudados de raízes como, por exemplo, os flavonoides ou de compostos voláteis, como o CO<sub>2</sub>, pode estimular a germinação dos esporos e a ramificação das hifas que estão próximas às raízes do hospedeiro indicando a sensibilidade dos FMAs aos compostos presentes na rizosfera (Bécard e Piche, 1989; Harrison, 2005; Steinkellner et al., 2007).

Um dos principais benefícios dos FMAs às plantas hospedeiras está associado com a absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, devido à formação de micélio externo em torno das raízes, além da zona de absorção radicular (Lima et al., 2011; Anjos et al., 2005). Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido publicados correlacionando a inoculação com os FMAs à composição mineral de algumas plantas medicinais, como, por exemplo, *Chlorophytum borivillianum* (Dave et al., 2011), *Wedelia chinensis* (Nisha e Rajeshkumar, 2010) e *Mentha arvensis* (Freitas et al., 2006).

Incrementos ao crescimento, conteúdo de clorofila e proteína total foram observados por Karthikeyan et al. (2009), em quatro espécies de plantas medicinais inoculadas com *Glomus fasciculatum* quando comparadas ao tratamento controle. Segundo os mesmos autores, o aumento no conteúdo de clorofila foi observado devido à maior absorção de fósforo e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética das plantas. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), solos com baixa disponibilidade de P tendem a apresentar maior colonização micorrízica, seguida por estímulos ao crescimento da planta.

Além dos benefícios relacionados à nutrição das plantas, os FMAs ainda podem promover a redução do ataque de patógenos, maior resistência ao déficit hídrico e tolerância às condições de estresses e maior estabilidade de agregados



dos solos (Costa et al., 2010; Bortolo et al., 2009; Borges et al., 2007; Cavalcante et al., 2001; Nóbrega et al., 2001; Latef, 2011).

### 2.3. Adubação fosfatada e FMAs

O fósforo (P) é um elemento essencial para o metabolismo vegetal, desempenhando importante função nos processos de respiração e fotossíntese. Ele está presente em componentes estruturais das células como nos fosfolipídios de membrana, nas moléculas de ácidos nucleicos e também em componentes metabólitos de transferência e armazenamento de energia, como ATP (Taiz e Zeiger, 2004).

Em termos quantitativos o fósforo é o nutriente menos exigido pelas plantas (Batista et al., 2011; Prado et al., 2005; Carvalho et al., 2002), porém o que mais limita a produção agrícola. A concentração de P na solução do solo, geralmente é baixa devido à sua imobilização em decorrência das fortes interações que apresenta com os constituintes do solo, pois a grande maioria dele encontra-se adsorvido na superfície dos colóides ou precipitado com fosfato de cálcio, ferro e alumínio (Moreira e Siqueira, 2006). Além disso, a maior parte do P no solo se move até as raízes do vegetal por difusão, dificultando ainda mais a absorção do nutriente pela planta (Grant et al., 2001).

Barboza et al. (2009) estudando a produção de biomassa da *Calendula officinales* L., utilizando doses crescentes de P (variando de 2,15 a 40,8 mg dm<sup>-3</sup>) e de cama de aviário (variando de 0,5 a 9,5 g dm<sup>-3</sup>), observaram que a maior produção de massa fresca de capítulos florais (5,529 g dm<sup>-3</sup>) ocorreu na dose de 10,91 mg dm<sup>-3</sup> de P, associado a 6,63 g kg<sup>-1</sup> de cama-de-frango. Moreira et al. (2005), trabalhando com vasos de 3,5 dm<sup>3</sup> observaram que a massa fresca de capítulos florais de calêndula é influenciada apenas pelas doses de P, sendo máxima (4,70 g vaso<sup>-1</sup>) com a utilização de 118,63 mg vaso<sup>-1</sup> de P. Ou seja, o fósforo além de ser um nutriente que limita as produções agrícolas, também possui grande importância para a produção de flores de calêndula.

Estudos documentados na literatura nacional e internacional indicam que, a absorção dos nutrientes disponíveis nos solos é altamente favorecida pela presença de microrganismos. A contribuição dos FMAs à planta hospedeira está

associada especialmente, à absorção de fósforo (Nisha e Rajeshkumar, 2010; Ponce et al., 2004; Freitas et al, 2004; Smith e Read, 2008).

Várias hipóteses já foram propostas para explicar a regulação do P no desenvolvimento da micorriza. O fósforo pode afetar a exsudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição dos FMAs, ou a sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização (kiriacheck et al., 2009).

A determinação de uma dose ideal de P para maximizar a produção ou a resposta das plantas micorrizadas é de extrema importância, pois as variações das exigências nutricionais de cada espécie podem afetar o processo de colonização e esporulação micorrízica. Geralmente, os maiores benefícios da inoculação com FMAs tendem a ser superiores nas menores doses de P no solo. Em condições adequadas de fertilidade, a inoculação causa aumento nos custos de produção e a atuação dos fungos pode ser inibida (kiriachek et al., 2009; Smith e Read, 2008), pois os benefícios das associações micorrízicas são reduzidos em condições de elevada fertilidade e favorecidos pela baixa fertilidade.

Anjos et al. (2005) observaram que o crescimento máximo de mudas de maracujazeiro doce, quando inoculadas com FMAs, ocorreu nas menores doses de P do solo (15,24 e 16,81 mg dm<sup>-3</sup>). Freitas et al. (2006), avaliando a inoculação de FMAs e doses de P em plantas de menta, observaram que nos tratamentos sem a adubação fosfatada (6 mg dm<sup>-3</sup>) obtiveram-se as maiores porcentagens de colonização micorrízica, correspondendo aos valores de 69 e 81%, para os tratamentos com *Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*, respectivamente, os quais proporcionaram maiores produções de massa fresca e seca da parte aérea. Segundo Smith e Read (2008), em solos com baixa disponibilidade de P a maior colonização micorrízica geralmente é seguida por estímulos no crescimento da planta.

Verificar qual espécie fúngica e qual a concentração de fósforo promove melhores resultados em determinada planta são essenciais, pois esta associação é de baixa especificidade (Smith e Read, 2008). Por isso a necessidade de se avaliar diferentes FMAs em uma mesma espécie, sob diferentes condições ambientais.

Tejavathi et al. (2011) estudando o efeito da associação micorrízica em plantas de *Andrographis paniculata* Nees, micropropagadas ou não, obtiveram uma correlação positiva entre a colonização micorrízica, e todos os parâmetros morfológicos avaliados, como por exemplo a produção de biomassa fresca da parte aérea. Neste estudo, as diferenças foram de até 15,7 g no valor de biomassa, entre as plantas micropropagadas e inoculadas com *Glomus fasciculatum* e as plantas controle, não micropropagadas, aos cinco meses de idade.

Testando a interação FMAs e plantas de alcachofra, Ceccarelli et al. (2010) não encontraram diferenças significativas para a maioria das características avaliadas, tanto nas plantas micorrizadas, quanto nas plantas controle. Porém, com uma única exceção para o peso das flores de alcachofra, que apresentaram incrementos de até 90% nas plantas inoculadas com uma mistura de *Glomus*, no primeiro ano de cultivo em campo aberto, em relação às plantas não inoculadas. Freitas et al. (2004) demonstraram a eficiência da espécie de *Glomus clarum* na produção de massa seca da parte aérea das plantas de carqueja, na ausência de adubação, com incrementos equivalentes ao tratamento adubado e inoculado com a mesma espécie.

Trabalhando com cinco espécies de plantas medicinais Karagiannidis et al. (2012) verificaram incrementos significativos no crescimento e teor de nutrientes da parte aérea nas plantas inoculadas com *Glomus lamellosum*, cultivadas com baixas quantidades de P no substrato, em relação às plantas controle. Entretanto, Binet et al. (2011) avaliando o efeito de FMAs em plantas de Artemisia, obtiveram reduções significativas na massa seca radicular das plantas inoculadas quando comparadas às plantas controle.

#### **2.4. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias orgânicas, que contêm no mínimo, um anel aromático com pelo menos um hidrogênio substituído por um ou mais grupamentos de hidroxila. No entanto, é um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico, por apresentar grande diversidade de estruturas, simples e complexas (Taiz e Zeiger, 2004).

Estes compostos podem ser formados por duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico, a partir dos carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato, que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A biossíntese da maioria dos fenóis vegetais é realizada pela rota do ácido chiquímico, que recebe este nome devido ao ácido que é formado pela junção de dois metabólitos da glicólise, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (Crozier et al., 2006) (Figura 1).

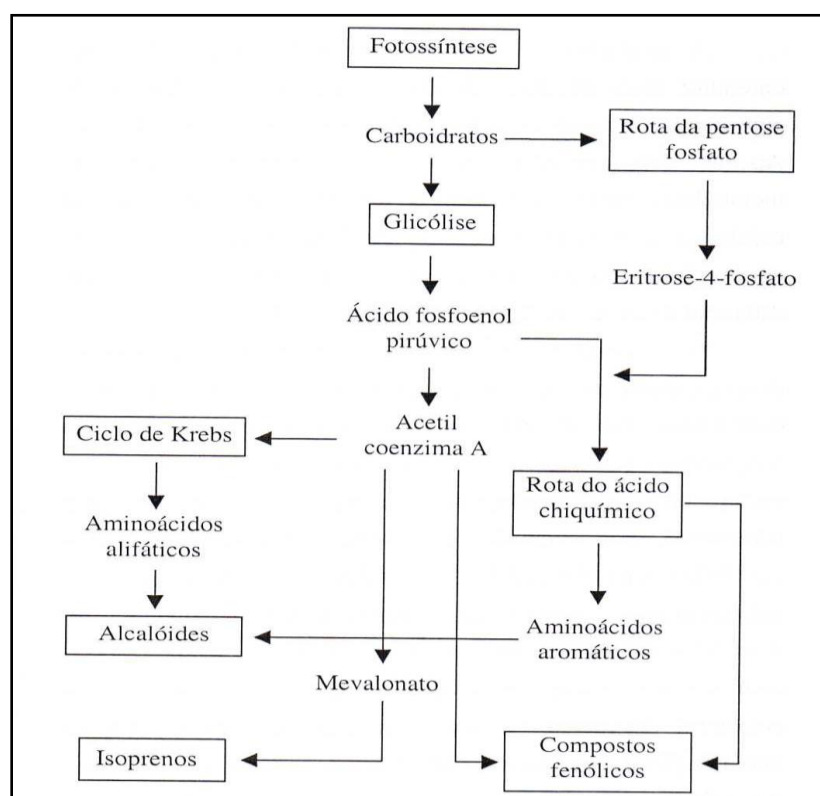


Figura 1: Esquema simplificado das rotas biossintéticas para a produção de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Castro et al., 2004).

Entre os constituintes químicos potencialmente ativos da calêndula estão os óleos essenciais, as saponinas, os flavonoides, os carotenoides, as mucilagens, as resinas e o princípio amargo (Luz et al., 2001, Bauer, 2010). Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, representados na grande maioria pelos compostos quercetina e rutina, também

usados como marcadores para aferir a qualidade da matéria-prima (Rodrigues et al., 2004).

Estruturalmente, os flavonoides possuem uma unidade básica com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ), que inclui dois anéis aromáticos ligados entre si por um fragmento de três carbonos (Crozier et al., 2006). Eles têm função importante no desenvolvimento de sabor, odor e pigmentos em diversas frutas e vegetais, na proteção contra luz ultravioleta, interação simbiótica ou patogênica entre plantas e microrganismos, e na interação entre plantas parasíticas (Costa et al., 2010; Harrisom, 2005; Taiz Zeiger, 2004).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas estão amplamente distribuídos pelo reino vegetal, pelos microrganismos ou fazendo parte do metabolismo animal, através da ingestão de substâncias via alimentação (Crozier et al., 2006). Estes compostos são capazes de sequestrar as espécies reativas de oxigênio, contribuindo com a manutenção da saúde e retardamento dos processos naturais oxidativos ocorridos no corpo (Dave et al., 2011; Nell et al., 2009). Além de sua atividade antioxidante direta, estudos ainda demonstram ação antimicrobiana, anti-inflamatória, bactericida, antitumoral, diurético, analgésico, cicatrizante e antisséptica (Parente et al., 2009; Scalco, 2009; Parente et al., 2002; Luz et al., 2001).

O fato de o metabolismo, especialmente a biossíntese de princípios ativos, ser controlada e influenciada pelo código genético, os compostos químicos podem sofrer modificações decorrentes das interações ambientais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Pesquisas relacionadas a fatores que influenciam nas variações desses princípios, visando à otimização da produtividade de compostos bioativos são essenciais, pois a qualidade do produto final está relacionada à quantidade de princípios ativos produzidos.

## **2.5. Fungos micorrízicos na produção de compostos fenólicos**

Para a produção de plantas medicinais é necessário o conhecimento e o estabelecimento de práticas agrônômicas, que estimulem o crescimento e o vigor das plantas, sem comprometer a qualidade, e a quantidade de princípio ativo produzido. Já que um dos fatores relacionados à comercialização da matéria-

prima, como droga vegetal é a concentração de princípio ativo presente no material.

Os compostos resultantes do metabolismo secundário, especialmente os fenólicos podem sofrer interações decorrentes das condições ambientais presentes no local de crescimento do vegetal. (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Dentre os fatores do ambiente, a inoculação por FMAs merece destaque, pois a presença ou não de determinado inóculo, pode interferir no crescimento, produção de biomassa, composição química do vegetal, além da quantidade de princípio ativo produzido.

Estudos realizados visando correlacionar os fatores ambientais que influenciam na produção de metabólitos têm demonstrado uma relação positiva entre diferentes espécies de FMAs e as plantas medicinais, permitindo-lhes melhor absorção de nutrientes, bem como de crescimento e síntese de compostos bioativos (Tejavathi et al., 2011; Rasouli-Sadaghiani et al., 2010).

Reconhecidamente a colonização micorrízica das raízes por FMAs dá-se em diferentes etapas, onde cada uma delas é caracterizada por mudanças morfológicas e fisiológicas ocorridas no hospedeiro. Estas mudanças fisiológicas são caracterizadas pela ativação de diversas rotas metabólicas, levando ao acúmulo de vários compostos resultantes do metabolismo secundário, como, por exemplo, os compostos fenólicos, especialmente do grupo dos flavonoides (Carlsen et al., 2008).

Além dos benefícios proporcionados pelos microrganismos na síntese de compostos fenólicos, entre as diferentes espécies de vegetais cultivadas em condições variadas do ambiente (Costa et al., 2010; Harrisom, 2005; Taiz e Zeiger, 2004), eles ainda têm a capacidade de potencializar o valor nutricional e medicinal das plantas para o consumo humano (Parente et al., 2009; Hussain et al., 2012).

Nos últimos anos diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aumentar o rendimento de compostos fenólicos em plantas medicinais, através da inoculação com FMAs. Tejavathi et al. (2011) observaram aumento máximo de polifenóis totais nas raízes ( $485.40 \pm 0.89 \mu\text{g g}^{-1}$ ) das plantas de *Andrographis paniculata* Nees, micropropagadas e inoculadas com *Glomus fasciculatum*, em relação à quantidade apresentada no caule ( $469.50 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e nas folhas

( $459.60 \pm 0.76 \mu\text{g g}^{-1}$ ), das plantas submetidas ao mesmo tratamento. Araim et al. (2009) observaram incrementos na massa seca e na concentração dos compostos fenólicos tanto nas raízes, quanto na parte aérea das plantas de *Echinacea purpúrea*, inoculadas com *Glomus intraradices*. Sendo de 200 e 67%, superior para os teores de compostos apresentados na raiz, e na parte área, respectivamente, em relação às plantas não micorrizadas.

No entanto, pode-se observar que dependendo da espécie de fungo envolvida, respostas variadas podem ser apresentadas pelos FMAs. Nell et al. (2009), demonstraram em folhas de *Salvia officinales* L., que as concentrações de polifenóis totais foram similares, tanto nas plantas controle (sem FMA), quanto naquelas inoculadas com *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*. Ceccarelli et al. (2010) estudando a influência de diferentes espécies de FMAs, sobre a produção de compostos bioativos em plantas de alcachofra, observaram que o teor de fenóis totais nos tratamentos inoculados com *Glomus intraradices* e a mistura das espécies de *Glomus* (*G. mosseae* + *G. intraradices*), apresentaram valores superiores aos obtidos pelas plantas submetidas à inoculação com *Glomus mosseae*. Freitas et al. (2004) verificaram que o maior teor de fenóis totais, nas plantas de carqueja ocorreu por meio da inoculação com *Glomus etunicatum*. Por isso a importância de se avaliar diferentes FMAs em uma mesma espécie de planta.

Estudos demonstram que a utilização dos FMAs associados às raízes de plantas medicinais, não contribuem apenas para um aumento na produção de compostos fenólicos, mas também para a produção de óleos essenciais (Binet et al., 2011; Rasouli-Sadaghiani et al., 2010; Freitas et al., 2004), sesquiterpenos (Kapoor et al., 2007), saponinas (Dave et al., (2011), e carotenoides (Sharma, et al., 2008), entre outros (Nell et al., 2009; Zubek et al., 2012).

Dessa forma, a produção melhor controlada das plantas torna-se cada vez mais necessária, já que a qualidade de uma planta medicinal está diretamente relacionada à quantidade de princípio ativo. Deve-se ressaltar ainda que estudos para a otimização da produção, por meio da inoculação por FMAs são de grande interesse para os produtores e também para as indústrias, visando assim, maior produção de compostos quimicamente ativos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes, RJ (Latitude = 21°19'23"; Longitude = 41°10'40" W; Altitude = 14m), no período de 24/05/2012 a 17/08/2012. Durante a condução do experimento, no interior da casa de vegetação, os valores diários de temperatura máxima variaram de 27,0 a 40,0°C, com média das máximas igual a 34,4°C e temperatura mínima de 13,7 a 21,5°C, com média das mínimas igual a 18,0°C.

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados (DBC), com um arranjo fatorial de 3 x 2, sendo três tratamentos microbiológicos: *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita* e controle (sem fungo) e duas doses de fósforo 0 e 50 mg dm<sup>-3</sup>, com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por dois vasos de plástico contendo 6 dm<sup>3</sup> de solo cada e duas plantas por vaso.

#### 3.2. Preparo do substrato

O solo destinado ao preparo do inóculo dos FMAs e para o experimento foi classificado como Latossolo Amarelo, predominantemente argisolo, coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia na proporção de 1:1 (v:v) e esterilizado em autoclave por 2 vezes, a uma



temperatura de 121°C por 1 hora, com a finalidade de eliminação dos fungos nativos.

Após a autoclavagem foi realizada a análise química do substrato que apresentou as seguintes características químicas: pH (H<sub>2</sub>O) = 5,9; S-SO<sub>4</sub> = 2 mg dm<sup>-3</sup>; P = 13 mg dm<sup>-3</sup>; K = 2,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 10,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg = 6,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al = 0,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 12,3 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Na = 0,9 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; MO = 12,07 g dm<sup>-3</sup>; CTC = 31,90 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 19,60 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V = 61%; Fe = 147,69 mg dm<sup>-3</sup>; Cu = 0,48 mg dm<sup>-3</sup>; Zn = 4,17 mg dm<sup>-3</sup>; Mn = 25,27 mg dm<sup>-3</sup>; B = 0,23 mg dm<sup>-3</sup>.

Ao substrato foram adicionadas duas doses de P (0 e 50 mg dm<sup>-3</sup>), utilizando-se como fonte NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Os teores de K foram elevados para 120 mg dm<sup>-3</sup>, utilizando-se como fonte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O substrato foi mantido incubado por 34 dias, devidamente molhado. Após esse período foram realizadas extrações de P (Mehlich-1), obtendo-se 12,5 e 36,5 mg dm<sup>-3</sup> de P, respectivamente, em relação às doses de 0 e 50 mg dm<sup>-3</sup>. Após 34 e 65 dias do plantio aplicou-se uma dose de 20 mg dm<sup>-3</sup> de N em todos os tratamentos, utilizando-se como fonte nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>).

### 3.3. Multiplicação dos inóculos de FMAs

As espécies de FMAs testadas (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) foram provenientes do Banco de Inóculo do Setor de Microbiologia da UENF, do Laboratório de Solo.

Para multiplicação do inóculo, foram semeadas em vasos com capacidade de 5 Kg de substrato esterilizado, sementes de milho (*Zea mayz*), desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 15 minutos, posteriormente lavadas com água esterilizada, por quatro vezes consecutivas. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de 31 dias para a multiplicação dos fungos. Sequencialmente, as partes aéreas foram cortadas e os vasos lacrados com sacos de papel pardo, mantidos sem irrigação por um mês, para facilitar a esporulação dos fungos. Após esse período, a mistura do solo contendo raízes colonizadas e esporos dos FMAs foram

utilizados como inóculo, sendo conservados em câmara fria a 4°C até a execução do experimento.

Para a inoculação das mudas de calêndula foram adicionados 120 cm<sup>3</sup> do inóculo de cada espécie. A aplicação foi realizada entre 2 a 3 cm abaixo da superfície do substrato, em vasos de plástico contendo 6 dm<sup>3</sup> de substrato.

### **3.4. Produção das mudas de Calêndula**

Foram utilizadas como material propagativo, sementes comerciais de calêndula (*Calendula officinalis* L., cv. Bonina Dobrada Sortida – Isla Pak). As sementes foram tratadas para a quebra de dormência utilizando-se a metodologia descrita pela Regra para Análise de Sementes (2009), que consistia em colocá-las em caixas gerbox contendo papel como substrato, umedecendo-se inicialmente com uma solução de 0,2% de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), em vez de água. Armazená-las em geladeira por sete dias e transferi-las para câmaras de crescimento durante 14 horas sob variação de temperatura de 20-30°C.

A semeadura foi realizada no dia 24/05/2012 em vasos plásticos contendo 6 dm<sup>3</sup> de substrato autoclavado previamente esterilizados e adubados com 0 e 50 mg dm<sup>-3</sup> de P.

Durante a semeadura foram inoculados os FMAs a partir de uma mistura de solo contendo esporos, hifas e raízes colonizadas (120 cm<sup>3</sup> vaso<sup>-1</sup> de inóculo) com *Glomus clarum* e *Gigaspora margarita* deixando-se o tratamento controle sem inoculação e sem P. Cada inóculo foi aplicado a uma profundidade aproximada de 3 cm nos vasos com os tratamentos correspondentes, sendo posteriormente semeados.

Foram realizadas irrigações diárias, utilizando-se água desionizada durante o período de condução experimental.

### **3.5. Colheita e variáveis analisadas**

Aos 43 dias após a semeadura iniciaram-se as medições de altura das plantas (determinadas a partir da região do colo até o ápice floral, com a ajuda de uma régua milimetrada), e a contagem do número de botões abertos e fechados.

A colheita dos capítulos florais foi feita manualmente com o pedúnculo o mais curto possível, sendo iniciada aos 58 dias após o semeio, com o surgimento das primeiras flores liguladas completamente desenvolvidas. Esta foi realizada semanalmente, entre 8:00 e 9:00h da manhã, quando avaliaram-se seus números, diâmetro (com um auxílio de um paquímetro digital), e as massas frescas e secas até a coleta final do experimento, quando se obteve o número total de capítulos florais colhidos.

Durante todo o tempo de condução do experimento foram quantificadas as massas frescas e secas das folhas caídas ou em senescência.

As plantas permanecerem em casa de vegetação até completarem o ciclo de produção floral de 27 dias. Após 85 dias da semeadura foi realizada a colheita. As raízes foram lavadas sequencialmente com água de torneira e desionizada, sendo as mais finas (em torno de 2 g de massa fresca) destinadas à determinação da porcentagem de colonização micorrízica. A parte aérea, os capítulos florais, os botões e as raízes restantes foram acondicionados individualmente em sacos de papel e levados à estufa de ventilação forçada.

Após a colheita, foram quantificados, as massas fresca e seca, os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), o teor de flavonoides e a porcentagem de colonização micorrízica.

### **3.5.1. Avaliação da massa fresca e seca**

Os materiais colhidos, ao longo da condução do experimento e no momento da colheita, foram divididos em: parte aérea (hastes + folhas), capítulos florais e raízes. Sendo posteriormente pesados em balança digital, para a determinação das massas fresca e seca.

Os capítulos florais foram colocados em sacos de papel "Kraft" e levados à estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de 40°C até obtenção do peso constante (Bortolo et al., 2009). O mesmo foi feito com a parte aérea e raízes, porém sob uma temperatura de secagem de 65°C, durante 72 horas, sendo, posteriormente pesados para a determinação da massa seca. Ao final do período de colheita todos os valores foram somados para compor as massas totais.

Depois de seco, os materiais obtidos foram triturados em moinho (tipo Willey), e armazenados em frascos hermeticamente fechados e devidamente identificados, onde permaneceram até o momento das análises.

### **3.5.2. Análise de nutrientes na parte aérea**

Após a determinação da massa seca, toda a parte aérea das plantas de calêndula foi triturada (com exceção das folhas caídas, ou em senescência) em moinho tipo Willey, usando peneira de 20 mesh. Em seguida, o material foi acondicionado em recipientes plásticos hermeticamente fechados.

Posteriormente o material triturado foi submetido à oxidação pela digestão sulfúrica obtendo-se um extrato, no qual se determinou o nitrogênio pelo método de Nessler (Jackson, 1965), o fósforo pelo método colorimétrico do molibdato. O potássio por espectrofotometria de emissão de chama. Os outros nutrientes Ca e Mg foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica, (Malavolta *et al.*, 1997).

### **3.5.3. Porcentagem de colonização micorrízica**

As amostras de raízes finas obtidas foram lavadas com água corrente, e armazenadas em álcool etílico 50% para posterior avaliação da porcentagem de colonização micorrízica, de acordo com a metodologia descrita por Grace e Stribley (1991) com adaptações. A marcha analítica constou das seguintes etapas: 1º passo: imersão das raízes em KOH (5%) aquecendo-as em banho-maria a 80°C por 10 minutos e posterior passagem em água destilada; 2º passo: imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcalina por 20 minutos e posterior passagem em água destilada; 3º passo: imersão em ácido clorídrico (5%) por 5 minutos; 4º passo: imersão em azul de tripano a 80°C durante 10 minutos.

Após repouso por 12h, 10 segmentos de raízes foram depositados, com o auxílio de uma pinça, sobre lâminas, onde foram adicionadas algumas gotas de glicerol ácido sobre as raízes, sendo posteriormente cobertas por uma lamínula. Para determinar a porcentagem de colonização micorrízica, os segmentos de

raízes foram levados ao microscópio óptico para a observação da presença de estruturas de FMAs

#### **3.5.4. Análise de flavonoides totais**

A dosagem de flavonoides foi realizada de acordo com Verlag (1978) modificado, utilizando-se quercetina como padrão, em solução de metanol e cloreto de alumínio.

Dois gramas de material seco e moído (flores tubulosas + liguladas + receptáculos) foram extraídos com 20 mL de solução de metanol (MeOH) 80% e aquecidos em banho-maria a 60°C, durante 10 minutos. O extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 50 mL, repetindo-se a extração do resíduo por mais duas vezes utilizando 10 mL de metanol 80% em cada vez, completando-se em seguida o volume do balão com solução de metanol 80%.

Em um tubo de ensaio, foram transferidos 5 mL de extrato, adicionando-se 10 mL de metanol 100%. A mistura foi homogeneizada e uma alíquota de 2 mL foi novamente transferida para outro tubo de ensaio, acrescentando-se 2 mL da solução de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) (5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de água destilada), e 6 mL de metanol 100%. Após repouso de 15 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro UV/visível no comprimento de onda de 420 nm, para obtenção das concentrações de flavonoides totais ( $\mu g/mL$ ).

Os dados de absorbância das amostras foram comparados com uma curva padrão, construída a partir de soluções com concentrações crescentes de quercetina. A solução padrão de quercetina foi preparada com metanol 100% em uma concentração de 20  $\mu g/mL$ . Alíquotas de 1,0 (20  $\mu g/mL$ ) a 8 mL (160  $\mu g/mL$ ), com intervalos de 1 mL serão utilizadas para a confecção da curva padrão, acrescidas de 2 mL de cloreto de alumínio e concentrações decrescentes de metanol 100% de 8 a 1 mL.

#### **3.6. Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi utilizado o Sistema de Análise Estatística SANEST, desenvolvido pelo CIAGRI (Centro de Informática na Agricultura) da Universidade de São Paulo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento e produção de capítulos florais em plantas de Calêndula

Para as variáveis, altura e massa seca da parte aérea foram verificados efeitos significativos da interação entre espécies de FMAs e doses de fósforo (Tabelas 2 e 3).

A altura média encontrada nas plantas foi de 27,3 cm, com variações entre 19,8 cm (tratamento sem FMA e sem fósforo) e 31,6 cm (tratamento sem FMA e com fósforo). Na ausência de adubação fosfatada as espécies de FMAs, *G. margarita* e *G. clarum*, proporcionaram incrementos na altura das plantas de 41 e 25%, respectivamente, em relação ao tratamento sem FMA, que apresentou a menor altura. O mesmo não foi observado com a adição de P ao substrato, em relação ao tratamento controle (Tabela 2). Estes resultados demonstram a eficiência dos FMAs em promover o crescimento das plantas em condições de baixa disponibilidade de P no solo.

Tabela 2. Altura das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e das doses de P no substrato, aos 85 dias após a semeadura

| Doses de P             | Altura (cm) |                     |                   |                  |                   |       |
|------------------------|-------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------|
|                        | FMAs        |                     |                   |                  |                   |       |
|                        | Sem FMA     | <i>G. margarita</i> | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % | Média |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 19,8 cB     | 27,9 aB             | 41                | 24,6 bB          | 25                | 24,1  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 31,6 aA     | 30,8 aA             | -3                | 29,2 aA          | -8                | 30,5  |
| IR <sub>P</sub> %      | 60          | 11                  | -                 | 19               | -                 |       |
| Média                  | 25,7        | 29,4                |                   | 26,9             |                   | 27,3  |
| C.V. (%)               | 5,44        |                     |                   |                  |                   |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Incremento relativo à inoculação com FMA [IR<sub>F</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: altura da planta inoculada e y: altura da planta controle (não inoculada)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [(IR<sub>P</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: com P e y: sem P)].

Tabela 3. Massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e adubação fosfatada

| Doses de P             | MSPA (g planta <sup>-1</sup> ) |                     |                   |                  |                   |       |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------|
|                        | FMAs                           |                     |                   |                  |                   |       |
|                        | Sem FMA                        | <i>G. margarita</i> | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % | Média |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 3,49 bB                        | 4,22 aB             | 20,92             | 4,13 aB          | 18,34             | 3,94  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 7,73 aA                        | 7,57 aA             | -2,07             | 7,27 aA          | -5,95             | 7,52  |
| IR <sub>P</sub> %      | 121,49                         | 79,38               |                   | 76,03            |                   |       |
| Média                  | 5,61                           | 5,90                |                   | 5,70             |                   | 5,73  |
| C.V. (%)               | 4,81                           |                     |                   |                  |                   |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Incremento relativo à inoculação com FMA [IR<sub>F</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: a massa da planta inoculada e y: a massa da planta controle (não inoculada)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [(IR<sub>P</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: com P e y: sem P)].

Aos 43 dias após a semeadura, quando foram iniciadas as medições de altura, as plantas que não receberam adição de P, mas foram inoculadas com FMAs, já se encontravam com uma média de 18,5 cm, ou seja, valor superior aos obtidos por Vieira et al. (2006) e Borella et al. (2011) em experimentos conduzidos sem utilização de fungos micorrízicos arbusculares. Nestes trabalhos, a altura média das plantas de calêndula aos 30 dias após o semeio foi cerca de 10,0 e 5,0 cm, respectivamente, sendo a disponibilidade de P no solo superior a 24 mg dm<sup>-3</sup>,



em ambos os estudos. Isso demonstra a capacidade dos FMAs em potencializar o crescimento das plantas, principalmente na fase inicial, onde as condições adversas do meio podem influenciar diretamente na sobrevivência e estabilidade das plantas.

Os benefícios ao crescimento promovidos pelos FMAs em plantas medicinais foram demonstrados por diversos autores. Nisha e Rajeshkumar, (2010) trabalhando com *Wedilia chinensis*, observaram efeitos significativos no comprimento da parte aérea e na raiz, com a maioria dos FMAs testados. Neste estudo, o valor máximo do comprimento da parte aérea obtido foi correspondente a 68,5 cm quando inoculados com *Glomus fasciculatum*, utilizando-se 2,7 mg Kg<sup>-1</sup> de fósforo no substrato, sendo no entanto superior ao tratamento sem fungo (52,5 cm). Rapparini et al. (2008) demonstraram em plantas de *Artemisia annua* L., variações de 29,83 ± 2,42 cm na altura das plantas inoculadas com várias espécies *Glomus* e 19,71 ± 1,09 cm nas plantas não micorrizadas, sem adição de P ao substrato em ambos os tratamentos. Da mesma maneira, Russomanno et al. (2008) obtiveram incrementos de 45,49 e 25,93%, na altura das plantas de manjerição e alecrim, respectivamente, quando inoculadas com *G. clarum* em relação ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Tejavathi et al. (2011) trabalhando com plantas de *Andrographis paniculata* Nees.

Na presença de adubação fosfatada, as espécies de FMAs testadas proporcionaram incrementos de 11 e 19 % na altura para as plantas inoculadas com *G. margarita* (30,8 cm), e *G. clarum* (29,2 cm), respectivamente em relação ao tratamento sem fósforo (Tabela 2). As médias obtidas são superiores aos valores verificados por Vieira et al. (2006) trabalhando com duas cores de capítulos florais (amarelo e laranja) de calêndula, e dois tipos de diásporos (alados e naviculares), e por Scalon Filho et al. (2011), trabalhando com plantas de calêndula submetidas a diferentes formas de aplicação de cama de frango semidecomposta. Neste estudo, a maior altura obtida pelas plantas de diásporo alado e capítulos florais amarelo foi cerca de 25,0 cm, aos 90 dias após o transplântio. Enquanto que Scalon Filho et al. (2011), obtiveram aos 86 dias após a semeadura altura em torno de 29,0 cm, sendo a máxima (29,386 cm) obtida, quando a cama de frango foi apenas incorporada ao solo.

No tratamento sem inoculação, a adição de P ao substrato proporcionou incrementos de 60% na altura das plantas de calêndula em relação ao controle (Tabela 2). Segundo Anjos et al. (2005), na ausência de FMAs há necessidade da suplementação com adubação fosfatada, para que as plantas possam responder com maior crescimento.

Para a variável massa seca da parte aérea, na ausência de adubação fosfatada, as espécies de FMAs, *G. margarita* e *G. clarum*, promoveram incrementos de 20,92 e 18,34%, respectivamente em relação ao tratamento sem fungo. O mesmo não foi observado quando as plantas micorrizadas foram submetidas à adição de P ao substrato, apresentando assim reduções de até 5,95% em relação ao tratamento sem FMA (Tabela 3).

Estes resultados demonstram a eficiência da inoculação com os FMAs em promover maior produção de massa seca na parte aérea das plantas de calêndula cultivadas sob baixas quantidades de P ( $12,5 \text{ mg dm}^{-3}$ ) no substrato. Segundo Kiriacheck et al. (2009), o fósforo pode afetar a exsudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição dos FMAs, ou a sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização. Dessa forma, os maiores benefícios da inoculação com FMAs tendem a ser superiores nas menores doses de P no solo.

Russomanno et al. (2008) estudando o efeito dos FMAs, *Glomus etunicatum* e *Glomus clarum* sobre o crescimento de plantas de alecrim e manjerição em baixas quantidades de P ( $24,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) adicionadas ao substrato, demonstraram que, a maior produção de matéria seca da parte aérea (67,16%) ocorreu quando as plantas foram inoculadas apenas com *G. clarum*. Este mesmo inóculo promoveu aumento de 51,35% na matéria seca da parte aérea, em relação às plantas não micorrizadas.

Ao avaliarem o efeito do crescimento das mudas de mamoeiro inoculadas com *G. clarum*, *G. margarita* e inóculo misto (*G. clarum* + *G. margarita*) sob duas doses de fósforo, Lima et al. (2011) observaram que o inóculo misto se destacou proporcionando maiores incrementos nas matérias secas da raiz, parte aérea e matéria seca total, independente das doses de P. Karthikeyan et al. (2009) estudando a resposta de 4 plantas medicinais (*Ocimum sanctum*, *Catharanthus roseus*, *Coleus forskholii* e *Cymbopogon flexuosus*) à inoculação por *G.*

*fasciculatum* em solo não esterilizado e sem adição de P, obtiveram efeitos significativos entre plantas inoculadas e não inoculadas. Neste estudo, a produção de massa seca da parte aérea das plantas não inoculadas apresentou reduções que variaram de 6,0 a 9,56 g planta<sup>-1</sup>, em relação às plantas micorrizadas.

As espécies de FMAs testadas na presença de adubação fosfatada proporcionaram incrementos de 79,38 e 76,03% na massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com *G. margarita* (7,57 g planta<sup>-1</sup>), e *G. clarum* (7,27 g planta<sup>-1</sup>), respectivamente, em relação ao tratamento sem fósforo (Tabela 3). Segundo Kapoor et al. (2007), mesmo com a suplementação de 30,1 g de P ao substrato, foi possível obter produção máxima de biomassa (11,6 g planta<sup>-1</sup>) nas plantas de *A. annua* quando elas foram inoculadas com *Glomus fasciculatum*.

No tratamento sem inoculação, a adição de P ao substrato proporcionou incrementos de 121,49% na massa seca da parte aérea das plantas de calêndula (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Kapoor et al. (2007). Estes autores relataram que as plantas de *Artemisia annua* L. colonizadas por *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum* apresentaram valores de massa seca da parte aérea (5,1 e 5,5 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente), superiores aos obtidos por plantas que receberam apenas a adubação fosfatada (4,0 g planta<sup>-1</sup>), porém, estes também foram superiores aos valores apresentados pelas plantas não micorrizadas (1,9 g planta<sup>-1</sup>).

Com relação à massa seca da raiz das plantas de calêndula, pode-se observar na Tabela 4, que os resultados foram influenciados pelas doses de P independente das espécies de FMAs, como também foram influenciados pelas espécies de FMAs independente das doses de P.

As plantas de calêndula inoculadas com FMAs apresentaram valores significativos, em relação ao acúmulo de matéria seca radicular, sendo superior ao controle, não micorrizado (Tabela 4).

Tabela 4. Massa seca da raiz (MSR) das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e das doses de P aplicadas ao substrato aos 85 dias após a semeadura

| FMAs                | MSR (g planta <sup>-1</sup> ) |                   | Doses de P             | MSR (g planta <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------------|
|                     |                               | IR <sub>F</sub> % |                        |                               |
| Sem FMA             | 3,75 b                        | -                 | 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 2,68 b                        |
| <i>G. margarita</i> | 4,88 a                        | 30,13             | 50 mg dm <sup>-3</sup> | 6,22 a                        |
| <i>G. clarum</i>    | 4,73 a                        | 26,13             | IR <sub>P</sub> %      | 132,09                        |
| Média               | 4,45                          |                   | Média                  | 4,45                          |
| C.V. (%)            | 15,05                         |                   | C.V. (%)               | 15,05                         |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Incremento relativo da massa seca [IR<sub>F</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: massa da planta inoculada e y: massa da planta controle (sem FMA)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [(IR<sub>P</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: com P e y: sem P)].

A inoculação com *G. margarita* e *G. clarum* proporcionou incrementos de 30,13 e 26,13%, respectivamente em relação às plantas sem fungo. A máxima produção de matéria seca da raiz foi obtida com a espécie *G. margarita* (4,88 g planta<sup>-1</sup>), porém esta não diferiu estatisticamente dos tratamentos inoculados com *G. clarum* (4,73 g planta<sup>-1</sup>).

Respostas variadas foram demonstradas por alguns autores, em diferentes espécies de plantas medicinais quanto à inoculação com FMAs e produção de massa seca radicular. Com o objetivo de estudar o efeito de três espécies de FMAs (*G. fasciculatum*, *G. intraradices*, *G. mosseae*) sobre o crescimento de tubérculos de *Chlorophytum borivilianum*, Dave et al. (2011) observaram respostas significativas na massa seca das raízes a partir dos 90 dias de cultivo, nos tratamentos submetidos à inoculação com *G. intraradices*, e *G. mosseae*, em relação às plantas inoculadas com o *G. fasciculatum* e às plantas controle (sem FMA). Resultados semelhantes foram encontrados por Karthikeyan et al. (2009), onde a diferença na massa seca radicular das plantas de *Cymbopogon flexuosus*, micorrizadas com *G. fasciculatum* foi de até 7,20 g planta<sup>-1</sup> em relação às plantas não inoculadas. Avaliando o feito da inoculação por *G. mosseae*, em plantas de *Capsicum annum* L. cultivadas em doses crescentes de cobre, Latef (2011) não obteve respostas significativas na massa seca das raízes, nos tratamentos inoculados e não inoculados por FMA na ausência de Cu. Porém, efeitos positivos da inoculação foram obtidos nos tratamentos que

receberam a maior dosagem de cobre, com massa de  $0,24 \text{ g planta}^{-1}$  superior à produção obtida no tratamento sem inoculação.

Os incrementos obtidos no presente trabalho, na massa seca radicular foram diferentes aos apresentados por Zaller et al. (2011), em plantas de *Calendula officinalis* L., Santos et al. (2011) em mudas de abacaxizeiro, Rapparini et al. (2008) em plantas de *Artemisia annua* L., e Binet et al. (2011) em três espécies de *Artemisia* (*A. umbelliformis*, *A. glacialis* e *A. genipi*), os quais verificaram que a simbiose FMA-planta não promoveu respostas significativas, ou até mesmo ocasionou uma redução de 60%, como foi mencionado por Binet et al. (2011), em relação ao controle. Isso demonstra a importância de se estudar diferentes FMAs em um número variado de espécies de vegetais, nos diversos ambientes, devido às variações de respostas entre o hospedeiro, e os microrganismos.

Com relação às doses de fósforo, a adição de  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  de P ao substrato favoreceu a produção de massa seca da raiz, apresentando incrementos de 132,09% em relação às plantas cultivadas na ausência de P (Tabela 4), o que evidencia a necessidade deste nutriente para o crescimento da calêndula.

Demonstrando a importância dos nutrientes, no crescimento e na nutrição de *Mentha piperita*, Blank et al. (2006) observaram que as menores médias de matéria seca radicular, ocorreram quando as plantas foram submetidas à omissão de P, N e S quando comparados aos tratamentos sem omissão de nutrientes. No entanto, Zaller et al. (2011) não obtiveram resultados significativos na massa seca da radicular de plantas de calêndula cultivadas na presença de  $64 \text{ mg Kg}^{-1}$  de P, FMAs e minhocas.

O P é um nutriente importante para o desenvolvimento das plantas, capaz de aumentar as produções de massas secas e frescas da parte aérea e de capítulos florais (Moreira et al., 2005). Entretanto, as exigências por este nutriente em calêndula têm sido documentadas na literatura, de forma bastante variada. Barbosa et al. (2010) não encontraram diferenças significativas na produção de capítulos florais cultivados em dois substratos (substrato formulado com solo de cerrado + esterco bovino, e substrato comercial – Plantmax para hortaliças<sup>®</sup>), contendo grandes diferenças nas concentrações de fósforo. Segundo Moreira et

al. (2005), mesmo com a maior dose de fósforo ( $36,4 \text{ mg dm}^{-3}$  de P) adicionada ao substrato, não foi possível a obtenção da produção máxima de massa seca da parte aérea, e ainda não possibilitou uma estimativa de uma dose superior, para alcançar esse objetivo. Por outro lado, autores como Barboza et al. (2009) demonstraram que a maior produção de capítulos florais ocorreu na dose de  $10,73 \text{ mg Kg}^{-1}$  de P. Leite et al. (2011) afirmaram que provavelmente a calêndula não é considerada uma cultura exigente em solos férteis.

Para as variáveis, número e massa seca de capítulos florais pode-se observar, nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, que eles foram influenciados tanto pela inoculação com os FMAs, quanto pelas doses de P.

Tabela 5. Número de capítulos florais de calêndula, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e das doses de P ao substrato

| Doses de P             | Nº de capítulos florais |                     |                   |                  |                   |       |
|------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------|
|                        | Sem FMA                 |                     | FMAs              |                  |                   |       |
|                        |                         | <i>G. margarita</i> | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % | Média |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 7,0 bB                  | 16,5 aA             | 135,71            | 13,7 aA          | 95,71             | 12,4  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 19,5 aA                 | 18,7 aA             | -4,10             | 14,0 bA          | -28,20            | 17,4  |
| IR <sub>P</sub> %      | 178,60                  | 13,33               | -                 | 2,20             | -                 |       |
| Média                  | 13,2                    | 17,6                |                   | 13,9             |                   | 14,9  |
| C.V. (%)               | 11,04                   |                     |                   |                  |                   |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Incremento relativo à inoculação com FMA [ $IR_F\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: número de flores colhidas nas plantas inoculadas e y: número de flores colhidas nas plantas controle (não inoculadas)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [ $IR_P\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: com P e y: sem P)].

Tabela 6. Massa seca de capítulos florais das plantas de calêndula em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e das doses de P no substrato

| Doses de P             | Massa seca de capítulos florais (g flor <sup>-1</sup> ) |                   |                  |                   |       |       |
|------------------------|---|-------------------|------------------|-------------------|-------|-------|
|                        | Sem fungo   | FMAs              |                  |                   |       | Média |
| <i>G. margarita</i>    |   | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % |       |       |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 0,22 bB   | 0,51 aA           | 56,86            | 0,51 aB           | 56,86 | 0,41  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 0,53 bA   | 0,56 bA           | 5,36             | 0,68 aA           | 22,06 | 0,59  |
| IR <sub>P</sub> %      | 58,49   | 8,93              | -                | 25,0              | -     |       |
| Média                  | 0,37  | 0,54              |                  | 0,59              |       | 0,50  |
| C.V. (%)               |   |                   | 9,43             |                   |       |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Incremento relativo à inoculação com FMA [ $IR_F\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: massa seca das plantas inoculadas e y: massa seca das plantas controle (não inoculadas)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [ $IR_P\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: com P e y: sem P)].

Na ausência de adubação fosfatada os incrementos promovidos pelos FMAs, *G. margarita* e *G. clarum* foram de 135,71 e 95,71%, respectivamente, para o número de capítulos florais e 56,86% para a massa seca das flores, em relação ao tratamento sem fungo. Estes resultados indicam a eficácia dos FMAs em promover maior número e massa seca de flores de calêndula, nas menores doses de P.

A associação simbiótica formada entre fungos micorrízicos arbusculares e raízes de plantas medicinais é de grande importância, pois esta simbiose pode otimizar a produção de partes específicas dos vegetais, como por exemplo a produção de folhas, flores, raízes e frutos, considerados essenciais para a síntese de compostos resultantes do metabolismo secundário. Diversos trabalhos relatados na literatura apontaram relações benéficas entre essas associações.

Tejavathi et al. (2011) trabalhando com plantas de *Andrographis paniculata* demonstraram que o número de brácteas, de flores e de frutos das plantas cultivadas a partir de sementes, foi influenciado significativamente pela inoculação com *Glomus fasciculatum*, sem adição de P ao substrato. A mistura de 4 espécies de *Glomus* (*G. geosporum*, *G. mosseae*, *G. intraradices* e *G. claroideum*) testados por Zaller et al. (2011), sobre crescimento e o desenvolvimento das plantas de *Calendula officinalis*, promoveu interações

significativas favorecendo o número de botões florais produzidos por planta, em relação aos tratamentos não micorrizados.

Estudando a influência de microrganismos e adubação fosfatada sobre a produção de terpenos em folhas de *Artemisia annua*, Rapparini et al. (2008) observaram respostas significativas, relacionadas ao maior número de folhas, nos tratamentos cultivados sem adição de P, e submetidos à inoculação com diferentes espécies de *Glomus* e de bactérias, quando comparadas às plantas controle (sem FMA). Todas as espécies de plantas medicinais (*Santolina chamaecyparissus*, *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Geranium dissectum* e *Origanum dictamnus*) testadas por Karagiannidis et al. (2012) e inoculadas com *Glomus lamellosum* foram eficientes em promover incrementos que variaram de 24,9 a 46,72%, na biomassa seca (raízes + folhas), em relação às plantas não micorrizadas, cultivadas em baixa quantidade de P no substrato ( $0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ ).

A adição de  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  de P ao substrato afetou diretamente a produção de flores, com reduções de até 28,20%, nos tratamentos inoculados com *G. clarum* (Tabela 5). Porém, este mesmo tratamento proporcionou ganhos de 22,06% na massa seca das flores, em relação aos tratamentos sem FMA, e 25,0% na massa seca das flores, em relação aos tratamentos sem fósforo (Tabela 6). Ceccarelli et al. (2010) também encontraram resultados semelhantes a este. Estes autores demonstraram em plantas de alcachofra cultivadas com  $136 \text{ mg Kg}^{-1}$  de P ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), que o peso médio das flores apresentou aumento acentuado, quando elas foram inoculadas com uma mistura de espécies de *Glomus*, com incrementos de 90 e 70%, no primeiro e segundo anos de cultivo em campo aberto, respectivamente, em comparação com as plantas não inoculadas. Latef (2011) obteve incrementos na massa seca das folhas de *Capscicum annum* L., com valores duas vezes maiores do que os apresentados no nível mais alto de Cu, quando as plantas foram inoculadas com *G. mosseae*, na presença de fósforo, em comparação aos tratamentos sem FMA.

Quanto ao diâmetro das flores, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, demonstrando assim que as espécies de FMAs e as doses de fósforo não interferem nesta variável. Resultados semelhantes foram obtidos por Zaller et al. (2011), em que o diâmetro das flores de calêndula não foi influenciado pela inoculação com uma mistura de espécies



de *Glomus* (*G. intrarices*, *G. claroideum*, *G. mosseae* e *G. geosporum*), na presença de adubação fosfatada.

#### 4.2. Porcentagem de colonização micorrízica

A porcentagem de colonização micorrízica nas raízes da calêndula foi influenciada pelas doses de P, e pelas espécies de FMAs (Tabela 7).

Tabela 7. Colonização micorrízica em plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e adubação fosfatada

| Doses de P             | FMAs (%)  |                     |                  | Média |
|------------------------|-----------|---------------------|------------------|-------|
|                        | Sem fungo | <i>G. margarita</i> | <i>G. clarum</i> |       |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 0,0 cA    | 77,5 bA             | 87,5 aA          | 55,0  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 0,0 bA    | 52,5 aB             | 57,5 aB          | 36,7  |
| Média                  | 0,0       | 65,0                | 72,5             | 45,8  |
| C.V. (%)               |           | 8,91                |                  |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

No tratamento sem adição de P, a espécie *Glomus clarum* apresentou maior porcentagem de colonização micorrízica nas raízes de calêndula (87,5%), seguida pela espécie *Gigaspora margarita* (77,5%) (Tabela 7). Estes tratamentos proporcionaram aos 85 dias após a inoculação, incrementos na massa seca da parte aérea (Tabela 3), e no número, e na massa seca de capítulos florais (Tabelas 5 e 6), em relação ao tratamento sem fungo. Segundo Smith e Read (2008), em substratos com a baixa disponibilidade de P, a maior colonização micorrízica proporciona maior crescimento das plantas. Porém, isto não foi refletido na variável altura que apresentou valor de 13,41% superior, nas plantas inoculadas com *G. margarita* quando comparado à espécie *G. clarum*. De acordo com Marschner e Dell (1994), a eficiência micorrízica está relacionada à quantidade de micélio externo formado no solo, além disso, a capacidade de colonização do hospedeiro pode variar com as diferentes espécies de FMAs, os genótipos da planta, e com as variadas condições ambientais.

Autores como Zubek et al. (2012), Dave et al. (2011), Nell et al. (2009) e Rossumanno et al. (2008) trabalhando com plantas de *Hypericum perforatum* L., *Chlorophytum borivillianum*, *Salvia officinalis*, e com plantas de *Rosmarinus officinalis* e *Ocimum Basilicum* L., respectivamente demonstraram que a eficiência da simbiose depende de baixas concentrações de P no substrato.

Em espécies medicinais, as variações das relações entre o hospedeiro e os fungos simbióticos, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente o fósforo são claramente demonstradas na literatura. Karthikeyan et al. (2009) testando a eficiência de *G. fasciculatum* em quatro espécies de plantas medicinais obtiveram valores mínimos de 58, e máximos de 85% na colonização das plantas de *Coleus forskholii* e *Catharanthus roseus*, respectivamente. Rasouli-Sadaghiani et al. (2010) encontraram maior porcentagem de colonização micorrízica nas plantas de *Ocimum basilicum* inoculadas com *G. fasciculatum* (85%), seguidas por *G. etunicatum* (50%) e *G. intraradices* (27,5%), em solo com baixa concentração de P. Já Karagiannidis et al. (2012) apresentaram associações variando de 38 a 83% na colonização radicular por *G. lamellosum*, em 5 espécies de plantas medicinais cultivadas com  $0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$  de P no substrato.

A adição de  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  de P ao substrato promoveu redução na porcentagem de colonização micorrízica de 77,5 para 52,5% e 87,5 para 57,5%, nas espécies de *G. margarita* e *G. clarum*, respectivamente (Tabela 7).

Decréscimos na colonização radicular, em plantas cultivadas sobre altas concentrações de P foram observados em muitas espécies medicinais, incluindo membros da família *Asteraceae* (Binet et al., 2011). Freitas et al. (2004) trabalhando com plantas de *Mentha arvensis* observaram reduções de 81 para 40% e de 69 para 38% nos tratamentos inoculados com *G. clarum* e *G. margarita*, respectivamente. Kapoor et al. (2007) verificaram em raízes de *Artemisia annua* que a inoculação com *G. fasciculatum* ou *G. macrocarpum* suplementados com adubação fosfatada ( $131 \text{ g de KH}_2\text{PO}_4$ ) reduziu em 51,16 e 21,57%, respectivamente a porcentagem de colonização micorrízica.

Zaller et al. (2011) estudando a atuação da mistura de diferentes espécies de *Glomus* (*G. intraradices*, *G. mosseae*, *G. claroideum* e *G. geosporum*), associadas ou não a minhocas, em plantas de calêndula demonstraram que a

inoculação não influenciou significativamente a colonização micorrízica, apresentando assim, uma média de  $22,4 \pm 3,2\%$  de colonização. Segundo os autores, o teor de P relativamente elevado ( $64 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), pode ter reduzido o efeito dos FMAs. De acordo com Kiriachek et al. (2009) o decréscimo da colonização micorrízica com o aumento das doses de P, pode ser explicado pela interferência do P na exsudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição do fungo e, ou sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização. Além disso, doses mais elevadas de P aumentam a fotossíntese e a disponibilidade de nutrientes para as raízes inibindo os propágulos dos FMAs.

#### **4.3. Conteúdos de N, P, K, Ca e Mg na massa seca da parte aérea**

Os conteúdos de N, K e Mg foliar, das plantas de calêndula foram influenciados pelos tratamentos microbiológicos independente das doses de P, como também foram influenciados pelas doses de P, independente dos tratamentos microbiológicos (Tabela 8).

Tabela 8. Conteúdo de N, K e Mg na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada

| FMAs                | N (mg planta <sup>-1</sup> ) |       | Doses de P             | N (mg planta <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------------------|-------|------------------------|------------------------------|
|                     | IR <sub>F</sub> %            |       |                        |                              |
| Sem FMA             | 81,46 b                      | -     | 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 63,85 b                      |
| <i>G. margarita</i> | 92,22 a                      | 13,21 | 50 mg dm <sup>-3</sup> | 108,68 a                     |
| <i>G. clarum</i>    | 85,14 ab                     | 4,52  | IR <sub>P</sub> %      | 70,21                        |
| Média               |                              |       | 86,27                  |                              |
| C.V. (%)            |                              |       | 6,36                   |                              |

| FMAs                | K (mg planta <sup>-1</sup> ) |       | Doses de P             | K (mg planta <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------------------|-------|------------------------|------------------------------|
|                     | IR <sub>F</sub> %            |       |                        |                              |
| Sem FMA             | 109,65 b                     | -     | 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 85,47 b                      |
| <i>G. margarita</i> | 120,87 a                     | 10,23 | 50 mg dm <sup>-3</sup> | 142,08 a                     |
| <i>G. clarum</i>    | 110,81 b                     | 1,06  | IR <sub>P</sub> %      | 66,23                        |
| Média               |                              |       | 113,78                 |                              |
| C.V. (%)            |                              |       | 5,43                   |                              |

| FMAs                | Mg (mg planta <sup>-1</sup> ) |       | Doses de P             | Mg (mg planta <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|-------------------------------|-------|------------------------|-------------------------------|
|                     | IR <sub>F</sub> %             |       |                        |                               |
| Sem FMA             | 22,34 b                       | -     | 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 18,03 b                       |
| <i>G. margarita</i> | 25,70 a                       | 15,04 | 50 mg dm <sup>-3</sup> | 30,85 a                       |
| <i>G. clarum</i>    | 25,29 a                       | 13,20 | IR <sub>P</sub> %      | 71,10                         |
| Média               |                               |       | 24,44                  |                               |
| C.V. (%)            |                               |       | 4,93                   |                               |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Incremento relativo da massa seca [ $IR_F\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: conteúdo da planta inoculada e y: conteúdo da planta controle (sem FMA)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [ $IR_P\% = 100(x-y)/y$ , sendo x: com P e y: sem P)].

A inoculação das plantas com as espécies de FMAs proporcionou conteúdos de N, K e Mg superiores ao tratamento controle, com incrementos de 13,21 e 4,52% para o N, 10,23 e 1,06% para o K, e 15,04 e 13,20% para o Mg para as espécies *G. margarita* e *G. clarum*, respectivamente, em relação às plantas cultivadas sem fungo (Tabela 8). Nesses mesmos tratamentos, na ausência de adubação fosfatada, foram observados incrementos em altura, massa seca da parte aérea e radicular, e no número e massa seca de capítulos forais (item 4.1). Esses resultados expressam a capacidade dos FMAs, especialmente da espécie *G. margarita*, em promover o aumento na absorção de N e K do solo, com resultados significativos da colonização no crescimento e na

produção de capítulos florais da calêndula, mesmo em condições de baixa disponibilidade de P no substrato.

Estudos realizados por Weber et al. (2004) em mudas de *Anacardium occidentale* L. cultivadas com baixa quantidade de P ( $3,1 \text{ mg dm}^{-3}$ ) no substrato, demonstraram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Segundo os autores, a inoculação das plantas com uma mistura de espécies exóticas de *Glomus*, proveniente do inóculo comercial Mycogold, proporcionou maiores acúmulos de N, P e K foliar e maiores produções de massa seca foliar e radicular, em relação às plantas controle (sem FMA). Ao passo que o tratamento, composto pela mistura de espécies de *Glomus etunicatum*, *Entrophospora* sp. e *Scutellospora* sp., proporcionou incrementos de 44% no conteúdo de Mg foliar na parte aérea.

Freitas et al. (2006) avaliando a influência de diferentes FMAs inoculados em plantas de *Mentha arvensis* L., cultivadas na ausência de adubação fosfatada observaram, que na parte aérea das plantas os conteúdos de N e K apresentaram valores superiores ao tratamento controle, com incrementos de até 143% para o N e 142% para o K, nos tratamentos inoculados com as espécies *G. clarum* e *G. margarita*, respectivamente. Da mesma forma, Samarão et al. (2011) demonstraram em mudas de *Annona muricata* L., a capacidade dos FMAs em potencializar o acúmulo de K na parte aérea das plantas submetidas à inoculação com *G. margarita*, *G. clarum* e inóculo nativo (*G. macrocarpum*, *G. etunicatum* e *E. colombiana*), independente do teor de fósforo presente no substrato.

Com relação às doses de fósforo, a adição de  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  de P ao substrato proporcionou incrementos significativos nos conteúdos de N, K e Mg na massa seca da parte aérea das plantas de calêndula, obtendo-se médias de 70,21; 66,23 e 71,10%, respectivamente, em relação ao tratamento sem P (Tabela 8). Esses resultados demonstram a importância da maior disponibilidade de P no substrato, para o aumento da absorção destes nutrientes pela calêndula.

O fósforo é um nutriente essencial para o metabolismo vegetal, desempenhando importantes funções nos processos de respiração e fotossíntese. Em condições adequadas de fertilidade, o P é capaz de promover maiores estímulos ao crescimento e à produção de capítulos florais (item 4.1), e ainda, maiores absorções de nutrientes do solo (Tabela 8).

Quanto ao conteúdo de fósforo no tecido das plantas de calêndula, foi observado influência significativa da interação dos FMAs com a adubação fosfatada (Tabela 9). A inoculação com os FMAs proporcionou incrementos significativos no conteúdo de P da parte aérea, em conjunto com a adição de P no substrato, obtendo-se médias de 23,46 e 22,75 mg planta<sup>-1</sup> para as espécies *G. margarita* e *G. clarum*, respectivamente.

Tabela 9. Conteúdo de P (mg planta<sup>-1</sup>) na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada

| Doses de P             | P (mg planta <sup>-1</sup> ) |                     |                   |                  |                   |       |
|------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------|
|                        | Sem fungo                    |                     | FMAs              |                  |                   |       |
|                        |                              | <i>G. margarita</i> | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % | Média |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 4,17 bB                      | 6,55 aB             | 57,07             | 5,67 abB         | 35,97             | 5,46  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 17,46 bA                     | 23,46 aA            | 34,36             | 22,75 aA         | 30,30             | 21,22 |
| IR <sub>P</sub> %      | 318,70                       | 258,18              | -                 | 301,23           | -                 |       |
| Média                  | 10,82                        | 15,00               |                   | 14,21            |                   | 13,34 |
| C.V. (%)               |                              |                     | 7,72              |                  |                   |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Incremento relativo da massa seca [IR<sub>F</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: conteúdo da planta inoculada e y: conteúdo da planta controle (sem FMA)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [(IR<sub>P</sub>% = 100(x-y)/y, sendo x: com P e y: sem P)].

As informações sobre as exigências nutricionais direcionadas às plantas medicinais, em especial à calêndula, ainda são escassas na literatura (Araújo et al. 2009). Normalmente as recomendações de adubação são feitas de maneira generalizada, e as fertilizações realizadas com base em cálculos requeridos por outras culturas que não medicinais.

Diante dos resultados apresentados na Tabela 9, pode-se observar que a utilização das espécies de FMAs foi capaz de otimizar a absorção de P do substrato, tanto na ausência de P, através da inoculação com a espécie *G. margarita*, quanto na presença de adubação fosfatada.

A potencialidade dos FMAs em favorecer a absorção de nutrientes adicionados ao solo, e proporcionar maior acúmulo destes no tecido vegetal foi demonstrada por diversos autores, em diferentes espécies de plantas medicinais,

cultivadas com baixas quantidades de fósforo no substrato. Weber et al. (2004) trabalhando com plantas de *Anacardium occidentale* L., obtiveram incrementos de 31,85% no conteúdo de P da parte aérea das plantas micorrizadas com o inóculo comercial Mycogold, em relação às plantas controle (sem FMA). Nisha et al. (2010) obtiveram incrementos de até 86% no acúmulo de P do tecido foliar, das plantas de *Wedelia chinensis* inoculadas com *Glomus fasciculatum*, em relação às plantas não micorrizadas. Nell et al. (2009) demonstraram em plantas de *Salvia officinalis* que os inóculos Symbivit, compostos por uma mistura de espécies de *Glomus* (*G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. cladoideum*, *G. microagregatum*, *G. caledonium* e *G. etunicatum*) e *G. mosseae* proporcionaram maiores acúmulos de P na parte aérea e no sistema radicular, com incrementos de até 50 e 202,5%, respectivamente, em relação ao tratamento sem FMA. Segundo Smith e Read. (2008), a eficiência de absorção de P pelas raízes de plantas micorrizadas é atribuída pela contribuição do extenso prolongamento de hifas fúngicas capazes de explorar um maior volume de solo, e favorecer maior absorção de nutrientes pouco móveis como, por exemplo, o fósforo.

A adubação fosfatada proporcionou incrementos no conteúdo de P da parte aérea da calêndula nos tratamentos submetidos à inoculação, sendo 258,18% para a espécie *G. margarita* e 301,23% para *G. clarum*, em relação ao tratamento sem P (Tabela 9). Esses resultados demonstram que o aumento da absorção de P pode estar relacionado à maior disponibilidade de fósforo na solução do solo, proporcionado pela adubação fosfatada. Ou ainda que a adição de 50 mg dm<sup>-3</sup> de P ao substrato, não foi suficiente para inibir o efeito simbiótico dos FMAs, proporcionando assim aumentos significativos no acúmulo de P da parte aérea e incrementos nas variáveis altura, massa seca da parte aérea e radicular (Tabelas 2, 3 e 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Samarão et al. (2011) na parte aérea e radicular de mudas de *Anonna muricata* L. inoculadas com *Glomus clarum* cultivadas com doses crescentes de P. De acordo com Kiriachek et al. (2009), em solos com níveis adequados de fertilidade, a inoculação causa aumento nos custos de produção e a atuação dos fungos pode ser inibida.

Foram verificados efeitos significativos da interação entre espécies de FMAs e adubação fosfatada, para o conteúdo de Ca na massa seca da parte aérea das plantas de calêndula (Tabela 10).

Tabela 10. Conteúdo de Ca ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) na parte aérea das plantas de calêndula aos 85 dias após a semeadura, em função da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada

| Doses de P             | Ca ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) |                     |                   |                  |                   |        |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------|
|                        | Sem fungo                      | FMAs                |                   |                  |                   | Média  |
|                        |                                | <i>G. margarita</i> | IR <sub>F</sub> % | <i>G. clarum</i> | IR <sub>F</sub> % |        |
| 0 $\text{mg dm}^{-3}$  | 56,41 aB                       | 60,15 aB            | 6,63              | 55,76 aB         | -1,15             | 57,44  |
| 50 $\text{mg dm}^{-3}$ | 94,93 bA                       | 105,16 aA           | 10,78             | 108,35 aA        | 14,14             | 102,81 |
| IR <sub>P</sub> %      | 68,28                          | 74,83               | -                 | 94,31            | -                 |        |
| Média                  | 75,67                          | 82,65               |                   | 82,05            |                   | 80,12  |
| C.V. (%)               |                                |                     | 5,06              |                  |                   |        |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ). Incremento relativo da massa seca [IR<sub>F</sub>% =  $100(x-y)/y$ , sendo x: conteúdo da planta inoculada e y: conteúdo da planta controle (sem FMA)]; Incremento relativo à presença de P no substrato [(IR<sub>P</sub>% =  $100(x-y)/y$ , sendo x: com P e y: sem P)].

Em condições de baixa disponibilidade de P no substrato ( $12,5 \text{ mg dm}^{-3}$ ), foi possível observar que as espécies de FMAs testadas não influenciaram significativamente no acúmulo deste nutriente na parte aérea (Tabela 10). Além disso, os tratamentos inoculados com a espécie *G. clarum* proporcionaram reduções de 1,15% no conteúdo de Ca foliar, quando comparados ao tratamento controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Quitério (2006) em plantas de *Artemisia annua* L. Neste estudo, os tratamentos inoculados com *G. clarum* e cultivados em câmaras de crescimento, contento  $15 \text{ mg dm}^{-3}$  de P no substrato, apresentaram decréscimos de até 33,4% no conteúdo de Ca foliar, em relação ao tratamento sem FMA.

Estes resultados demonstram a importância da avaliação de resposta de diferentes espécies de FMAs para o acúmulo de Ca em diversas espécies de plantas medicinais, especialmente em calêndula. Pois, esta associação é de baixa especificidade, podendo ainda sofrer influências das diversas condições ambientais existentes no ambiente de cultivo (Smith e Read, 2008).

A adubação fosfatada favoreceu o aumento no conteúdo de Ca das plantas de calêndula inoculadas com as espécies de FMAs *G. margarita* e *G. clarum* (Tabela 10). As médias obtidas em  $\text{mg planta}^{-1}$  na dose de  $50 \text{ mg dm}^{-3}$  foram de 105,16 e 108,35, respectivamente, correspondendo ao incremento de 74,83% e 94,31%, em relação às plantas cultivadas sem adição de P. Resultados



semelhantes foram obtidos por Vitorazi filho (2011) em plantas de *Passiflora alata* cultivadas com 15 mg dm<sup>-3</sup> de P e inoculadas com *G. margarita* e *G. clarum*, sendo 163 e 175%, respectivamente superior ao tratamento controle. Entretanto, Freitas et al. (2006) observaram que o conteúdo de Ca e também de Mg e S foram influenciados apenas pela aplicação de P, não tendo sido afetados pelos tratamentos microbiológicos.

#### 4.4. Teor de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais nos capítulos florais da calêndula foram influenciados pela interação entre os tratamentos microbiológicos e as doses de P (Tabela 11).

Tabela 11. Teor de flavonoides totais nos capítulos florais da calêndula em função dos fungos micorrízicos arbusculares e das doses de P no substrato

| Doses de P             | *Teor de Flavonoides totais (%) |                     |                  |       |
|------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------|-------|
|                        | Sem fungo                       | FMA                 |                  | Média |
|                        |                                 | <i>G. margarita</i> | <i>G. clarum</i> |       |
| 0 mg dm <sup>-3</sup>  | 0,13 aA                         | 0,10 bB             | 0,11 aB          | 0,11  |
| 50 mg dm <sup>-3</sup> | 0,09 bB                         | 0,12 aA             | 0,09 bB          | 0,10  |
| Média                  | 0,11                            | 0,11                | 0,10             | 0,11  |
| C.V. (%)               |                                 | 5,51                |                  |       |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05). \*Teor de flavonoides totais estimados como Quercetina.

Na ausência de adubação fosfatada, a maior média dos teores de flavonoides totais foi obtida nos tratamentos cultivados sem fungo (0,13%), no entanto, estes não diferiram estatisticamente daqueles inoculados com a espécie *G. clarum* (0,11%). O mesmo desempenho não foi observado nestes mesmos tratamentos na presença de P, ocasionado assim, reduções de 30,8 e 18,2%, respectivamente, em relação aos tratamentos cultivados sem P (Tabela 11). Isso possivelmente pode ter ocorrido devido, às baixas concentrações de P presentes no material estudado, favorecendo com isso, o acúmulo de carboidratos, que são desviados da rota, para a formação do ácido chiquímico, produzindo ao final do

metabolismo, as antocianinas, que são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides (Taiz e Zeiger, 2004), e que provavelmente poderá também influenciar na síntese de outros flavonoides.

Reconhecidamente, o fósforo é um nutriente que desempenha importantes funções no metabolismo vegetal, no entanto, dependendo das concentrações existentes no meio de cultivo, poderão ocorrer interações com a síntese de compostos do metabolismo secundário, especialmente no acúmulo de flavonoides. Estudando a relação entre a concentração de flavonoides totais em folhas de fava d`anta, cultivadas com diferentes níveis de fósforo, Mendes et al. (2005) observaram que nos tratamentos submetidos às menores doses de P, ocorreu uma produção 20% maior no teor de flavonoides totais.

Em contrapartida, a espécie *G. margarita*, proporcionou incrementos de 20% nos teores de flavonoides totais, em relação ao tratamento sem P (Tabela 11). Isso possivelmente pode ter ocorrido devido às relações de dependência, entre a espécie estudada e as plantas de calêndula, já que os FMAs são microrganismos biotróficos obrigatórios, e apenas completam o seu ciclo de vida se estiverem associados às raízes de plantas hospedeiras.

Durante o processo de reconhecimento e troca de sinais entre os simbiossiontes, mudanças fisiológicas ocorrem no hospedeiro, levando ao acúmulo de vários compostos resultantes do metabolismo secundário (Carlsen et al., 2008; Nell et al., 2009). Segundo Larose et al. (2002), a primeira etapa da colonização micorrízica pode ser caracterizada pela indução da formação de alguns compostos, como por exemplo, os compostos fenólicos, flavonoides e proteínas relacionadas a patógenos (Chaudhary et al., 2008), em raízes de plantas inoculadas. No entanto, nenhum mecanismo está reconhecidamente identificado, exceto para o estado nutricional das plantas cultivadas na presença de inóculo micorrízico.

Dados disponíveis na literatura correlacionam o acúmulo destes metabólitos, em plantas medicinais inoculadas por FMAs. Nell et al. (2009) obtiveram efeitos significativos na produção de fenóis totais em raízes de *S. officinalis* L. nos tratamentos colonizados por *Symbivit*, *G. mosseae* e *G. intraradices*, em relação ao tratamento controle. Uma tendência semelhante foi demonstrada em estudo realizado por Zubek et al. (2012), em plantas de

*Hypericum perforatum* L., onde as maiores concentrações de hypericin e pseudohypericin foram obtidas nos tratamentos submetidos à inoculação por *G. intraradices* e uma mistura de FMAs.

O acúmulo de flavonoides totais ainda pode ter sido afetado pelo aumento na produção de massa seca das flores. Nos tratamentos inoculados com *G. clarum* foi obtido o menor teor de flavonoides totais (0,09%) (Tabela 11), seguidos pela maior produção de massa seca de capítulos florais (Tabela 6), na presença de adubação fosfatada. Segundo Gobbo-Neto e Lopes, (2007) o aumento da biomassa da planta, pode reduzir a concentração de princípios ativos nos tecidos vegetais, devido ao efeito de diluição.

Apesar das monografias da OMS descrever que as espécies de *C. officinalis* não devem apresentar menos que 0,4% de flavonoides totais (calculados como hiperosídeos) (Who, 2002), os resultados obtidos ficaram próximos aos encontrados na literatura em outros experimentos conduzidos com calêndula (Pacheco, 2007 e Manganotti, 2011). Pacheco (2007) afirma que no mercado brasileiro a grande maioria da matéria-prima vegetal proveniente de plantas de calêndula apresenta teor de flavonoides entre 0,05 a 0,1%. Ou seja, a matéria-prima obtida neste trabalho pode ser considerada similar à encontrada no mercado. Vale ressaltar que os resultados apresentados são de flavonoides totais calculados como quercetina e não como hiperosídeos.

Diante dos dados apresentados foi possível observar a capacidade dos FMAs em potencializar o crescimento e a produção de flavonoides, nas plantas de calêndula mesmo nas condições climáticas ocorridas na cidade de Campos dos Gytacazes - RJ durante todo o período de condução do experimento, especialmente na fase inicial de crescimento onde o efeito benéfico dos FMAs é aceito e cientificamente comprovado.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Conduziu-se um experimento em casa de vegetação com o objetivo de avaliar o efeito dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e doses de fósforo quanto a capacidade de promoção do crescimento, produção de capítulos florais, acúmulo de nutrientes e flavonoides totais em *Calendula officinalis* L. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial de 3 x 2, sendo três tratamentos microbiológicos: *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita* e controle (sem fungo) e duas doses de fósforo 0 e 50 mg dm<sup>-3</sup>, com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por dois vasos de plástico contendo 6 dm<sup>3</sup> de solo cada, e duas plantas por vaso. As plantas foram produzidas a partir de sementes em vasos de 6 dm<sup>-3</sup>, contendo como substrato uma mistura de solo e areia na proporção de 1:1(v/v), esterilizado em autoclave por duas vezes a 121°C. Aos 85 dias após a semeadura as plantas foram coletadas e avaliados a altura, as massas secas da parte aérea e raiz, o diâmetro e o número de capítulos florais, a porcentagem de colonização micorrízica, o conteúdo de N, P, K, Ca e Mg na parte aérea das plantas e teor de flavonoides totais.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- A inoculação das plantas de calêndula com a espécie *Gigaspora margarita* proporcionou aumentos no crescimento e produção de capítulos florais em baixa

disponibilidade de P no solo;

- A espécie *G. margarita*, proporcionou aumento significativo na absorção e acúmulo de N e K na parte aérea das plantas de calêndula, independente da adubação fosfatada;
- O conteúdo de P, e Ca, foi influenciado significativamente pelas espécies de FMAs e adubação fosfata, destacando-se a presença de *Gigaspora margarita* na ausência de adubação fosfatada em proporcionar maior acúmulo de P;
- A adubação fosfatada reduziu os teores de flavonoides totais, nos capítulos florais das plantas de calêndula cultivadas sem FMA e aumentou significativamente com a inoculação por *Gigaspora margarita*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMF-Taxonomy e Phylogeny. Glomeromycota phylogeny; Glomeromycota taxonomy. Disponível em: [http:// www.AMF-phylogeny.com](http://www.AMF-phylogeny.com). Acesso em 02 de Março de 2012.
- Anjos, E.C.T.de., Cavalcante, U.M.T., Santos, V.F.dos., Maia, L.C. (2005) Produção de mudas de maracujazeiro-doce micorrizadas em solo desinfestado e adubado com fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, 40 (4): 345-351.
- Araim, G., Saleem, A., Arnason, J.T., Charest, C. (2009) Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of Purple Coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57 (6): 2255-2258.
- Araújo, C.B.O.; Santos, A.M.; Fernandes, L.A.; Martins, E.R.; Sampaio, R.A.; Costa, C.A.; Leite, G.L.D. (2009) Uso da adubação orgânica e cobertura morta na cultura da calêndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 11 (2): 117-123.
- Azzaz, N.A., Hassan, E.A., Emarey, F.A.El (2007) Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. *African Crop Science Conference Proceedings*, 8: 1727-1738.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y. (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124: 949–957.
- Barbosa, C.K.R., Valadares, S.V., Bonfim, F.P.G., Honorio, I.C.G., Martins, E.R. (2010) Influência do substrato e do tamanho da célula de bandejas de poliestireno expandido no desenvolvimento de mudas e produção de calêndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 12 (1): 18-22.

- Barboza, V.C., Vieira, M.do.C., Zárata, N.A.H., Botega, S.P., Padilha, N.de.S., Paes, C.L. (2009) Produção de biomassa de *Calendula officinalis* L. adubada com fósforo e cama-de-frango. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 33 (2): 478-483.
- Batista, M.A.V., Prado, R.de.M., Leite, G.A. (2011) Resposta de mudas de goiabeira a aplicação de fósforo. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 27 (4): 635:641.
- Bauer, M.F.A. (2010) *Viabilidade técnico-econômica da produção de Calendula officinalis* L., na ilha de Santa Catarina, como fonte de matéria-prima para fármacos à base de luteína. Monografia (Graduação em Agronomia) – Florianópolis - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 76p.
- Becard, G., Piche, Y. (1989) Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (9): 2320-2325.
- Binet, M.N., Tuinen, V.D., Deprêtre, N., Koszela, N., Chambon, C., Gianinazzi, S. (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Artemisia umbelliformis* Lam, an endangered aromatic species in Southern French Alps, influence plant P and essential oil contents. *Mycorrhiza*, 21:523 – 535.
- Blank, A.F., Oliveira, A.dos.S., Arrigoni-Blank, M.de.F., Faquin, V. (2006) Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. *Horticultura Brasileira*, 24 (2): 195-198.
- Borella, J.C., Ribeiro, N.S., Freato, A.M.R., Mazzo, K.F., Barbosa, D.M. (2011) Influência da adubação e da cobertura morta na produtividade e no teor de flavonóides de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 13 (2): 235-239.
- Borges, A.J.da.S., Trindade, A.V., Matos, A.P.de., Peixoto, M.de.F.da.S. (2007) Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (1): 35-41.
- Bortolo, D.P.G., Marques, P.A.A., Pacheco, A.C. (2009) Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 11 (4): 435-441.
- Carvalho, A.J.C.de, Monnerat, P.H., Martins, D.P., Bernardo, S., Silva, J.A.da (2002) Teores foliares de nutrientes no maracujazeiro amarelo em função da adubação nitrogenada, irrigação e épocas de amostragem. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 59 (1): 121-127.
- Carlsen, S. C. K., Understrup, A., Fomsgaard, I. S., Mortensen, A. G., Ravnskov, S. (2008) Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. *Plant and Soil*, 302 (1-2): 33-43.

- Castro, H.G.; Ferreira, F.A.; Silva, D.J.H. e Mosquim, P.R. (2004). Contribuição ao estudo das plantas medicinais- Metabólitos secundários. UFV, 2<sup>o</sup> ed, 113.
- Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C., Nogueira, R.J.M.C., Santos, V.F.dos. (2001) Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. *Acta Botanica Brasílica*, 15 (3): 379-390.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Martelloni, L., Sbrana, C., Picciarelli, P., Giovannetti, M. (2010) Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. *Plant Soil*, 335:311-323.
- Centeno, L.M.M. (2004) Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Medicina Naturista*, 5: 257-261.
- Chaudhary, Vidhi., Kapoor, R., Bhatnagar, A.K. (2008) Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology*, 40:174-181.
- Costa, M.D., Lovato, P.E., Sete, P.B. (2010) Micorrização e indução de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 45 (4): 376-383.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006) *Plant Secondary Metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. 1<sup>o</sup> ed. 372 p.
- Dave, S., Jayashankar, D., Tarafdar, J.C. (2011) Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae on growth and saponin accumulation in *Chlorophytum borivilianum*. *Science Asia*, 37: 165–169.
- Freitas, M.S.M., Martins, M.A., Carvalho, A.J. C.de. (2006) Crescimento e composição mineral da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. *Horticultura Brasileira*, 24 (1): 11-16.
- Freitas, M.S.M., Martins, M.A., Vieira, I.J.C. (2004) Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39 (9): 887-894.
- Fritsche, K., Hornung, E., Peitzsch, N., Renz, A., Feussner, I. (1999) Isolation and characterization of a calendic acid producing (8,11)-linoleoyl desaturase. *FEBS Letters*, 462 (3) 249-253.
- Gobbo-Neto, L; Lopes, N.P. (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, São Paulo, 30 (2): 374-381.



- Grace, C., Stribley, P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95: 1160-1162.
- Grant, C.A., Flaten, D.N., Tomaszewicz, D.J., Sheppard, S.C. (2001) A importância do fósforo no crescimento inicial da planta. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, 95: 1-5.
- Harrisom, M.J. (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59:19-42.
- Hussain, I., Khader, J.A., Noor, S., Ullah, R., Talha, M., Badrullah, Ahmed, M. (2012) Study on the medicinal plant *Calandula officinalis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (13): 973-978.
- Jackson, M.L. (1965) Soil chemical analysis. New Jersey: Prentice Hall, 498p.
- Kapoor, R., Chaudhary, V., Bhatnagar, A. K. (2007) Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*, 17: 581-587.
- Karagiannidis, N., Thomidis, T., Panou-Filothou, E. (2012) Effects of *Glomus lamellosum* on growth, essential oil production and nutrients uptake in selected medicinal plants. *Journal of Agricultural Science*, 4 (3): 137- 144.
- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Jaleel, C.A. (2009) Response of some medicinal plants to vesicular arbuscular mycorrhizal inoculations. *Journal Scientific Research*, 1 (2), 381-386.
- Kiriachek, S.G., Azevedo, L.C.B.de., Peres, L.E.P., Lambais, M.R. (2009) Regulação do desenvolvimento das micorrizas arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33: 1-16.
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, V., Vierheilig, H. (2002) Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 159: 1329–1339.
- Latef, A.A.H.A. (2011) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annum* L.). *Mycorrhiza*, 21: 495-503.
- Leite, G.L.D., Guanabens, R.E.M., Silva, F.W.S., Gusmão, C.A.G., Guilherme, D.de.O., Martins, E.R. (2011) Effect of organic fertilization, mulch and natural phosphate by biomass production, flavonoids and insects associated in the *Calendula officinalis*. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 7 (12): 1-6.
- Lima, K.B., Martins, M.A., Freitas, M.S.M., Olivares, F.L. (2011) Fungos micorrízicos arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação fosfatada em

- mudas de mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 33 (3): 932-940.
- Luz, L.A.de.la., Ferradá, C.R., Govín, E.S. (2001) Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1: 23-27.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A.de. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2º ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p.
- Mann, J. (2001) *Secondary metabolism*. 2º ed. Oxford: Oxford Science, 374p.
- Manganotti, S.A. (2011) *Produção de biomassa, teor de flavonoides e qualidade microbiológica de calêndula (Calendula officinalis L.) em dois sistemas de irrigação e três coberturas de solo*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Montes Claros. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 88p.
- Marschner, H., Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhiza. *Plant and Soil*, 159: 89-102.
- Mendes, A.D.R., Martins, E.R., Fernandes, L.A., Marques, C.C.L. (2005) Produção de biomassa e de flavonóides totais por fava d' anta (*Dimorphandra mollis* Benth) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 7 (2): 7-11.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) *Regras para análise de sementes*. 1ºed. Brasília: Mapa/ ACS, 399p.
- Ministério da Saúde (2009). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/> Acesso em: 26 de Janeiro de 2012.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2º ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 729p.
- Moreira, P.A., Marchetti, M.E., Vieira, M.C., Novelino, J.O., Gonçalves, M.C., Robaina, A.D. (2005) Desenvolvimento vegetativo e teor foliar de macronutrientes da calêndula (*Calendula officinalis* L.) adubada com nitrogênio e fósforo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 8 (1): 18-23.
- Nóbrega, J.C.A., Lima, J.M.de., Curi, N., Siqueira, J.O., Motta, P.E.F.da. (2001) Fosfato e micorriza na estabilidade de agregados em amostras de Latossolos cultivados e não-cultivados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36 (11): 1425-1435.
- Nell, M., Vötsch, M., Vierheilig, H., Steinkellner, S., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., Novak, J. (2009) Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Science of food and Agriculture*, 89: 1090-1096.

- Nisha, M.C., Rajeshkumar, S. (2010) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrition of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merril. *Indian Journal of Science and Technology*, 3 (6): 676-678.
- Pacheco, A.C. (2007) *Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonoides em calêndula (Calendula officinalis L.)*. Tese (Doutorado em Ciências) – Piracicaba – SP. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, 61p
- Parente, L.M.L., Silva, M.S.B., Brito, L.A.B., Lino-Júnior, R.S., Paula, J.R., Trevenzol, L.M.F., Zatta, D.T., Paulo, N.M. (2009) Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 11 (4): 383-391.
- Parente, L.M.L., Paula, J.R.de., Costa, E.A., Silveira, N.de.A. (2002) *Calêndula officinalis*: Características, propriedades químicas e terapêuticas. *Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR*, 6 (2): 165-169.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. (2004) *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Nº46325. Canadá.173p.
- Ponce, M.A., Scervino, J.M., Erra-Balsells, R., Ocampo, J.A., Godeas, A.M. (2004) Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*, 65: 1925-1930.
- Prado, R.de.M., Vale, D.W.do. Romualdo, L.M. (2005) Fósforo na nutrição e produção de mudas de maracujazeiro. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, 27 (3): 493-498.
- Quitério, G.C.M. (2006) *Produção de artemisinina por Artemisia annua L. sob influência de micorriza arbuscular*. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Campinas, SP. Instituto Agronômico de Campinas – IAC, 39p.
- Rapparini, F., Llusà, J., Peñuelas, J. (2008) Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biology*, 10: 108–122.
- Rasouli-Sadaghiani, M., Hassani, A., Barin, M., Danesh, Y.R., Sefidkon, F. (2010) Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (21): 2222-2228.
- Rodrigues, P.O., Gonçalves, T.C., Silva, W.B.da. (2004) Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23 (1): 27-31.

- Russomanno, O.M.R., Kruppa, P.C., Minhoni, M.T.A. (2008) Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de plantas de alecrim e manjerição. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v(1): 37-43.
- Samarão, S.S., Rodrigues, L.A., Martins, M.A., Manhães, T.N., Alvim, L.A.da.M. (2011) Desempenho de mudas de gravioleira inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo não-esterilizado, com diferentes doses de fósforo. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 33 (1): 81-88.
- Santos, P.C.dos., Freitas, S.de.J., Freitas, M.S.M., Souza, L.B.de., Carvalho, A.J.C.de. (2011) Produção de mudas do tipo rebentão, utilizando coroas de três cultivares de abacaxi inoculadas com fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 33 (3): 954-961.
- Scalco, S.R. (2009) *Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do extrato glicólico de Calendula officinalis L. (Asteraceae) visitadas e protegidas por insetos*. Monografia (Graduação em Farmácia) – Criciúma -SC. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, 43p.
- Scalon Filho, H., Vieira, M.C., Scalon, S.P.Q., Heredia, N.A.Z. (2011) Formas de aplicação de cama-de-frango no crescimento e produção de capítulos florais de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 13 (4): 382-388.
- Sharma, D., Kapoor, R., Bhatnagar, A.K. (2008) Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of *Curculigo orchoides* Gaertn.: an endangered medicinal herb. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 395-400.
- Siqueira, J.O., Lambais, M.R., Sturmer, S.L. (2002) Fungos micorrízicos arbusculares. *Biotechnologia da Ciência e Desenvolvimento*, 25: 12- 21.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3<sup>o</sup> ed. Califórnia: Academic Press, 605p.
- Soares, A.C.F., Martins, M.A., Mathias, L., Freitas, M.S.M. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedling. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 62 (4): 331-336.
- Souza, J.A., Miranda, E.M. (2013) Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis. Disponível em: [http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agropecuaria/artigo\\_agropecuaria/plantas\\_medicinais\\_e\\_fitoterapicos:\\_alternativas\\_viaveis.html?query=plantas+medicinais](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agropecuaria/artigo_agropecuaria/plantas_medicinais_e_fitoterapicos:_alternativas_viaveis.html?query=plantas+medicinais). Acesso em: 17 de Maio de 2013.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J., Vierheilig, H. (2007) Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, 12: 1290-1306.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.

- Tejavathi, D.H., Anitha, P., Murthy, S.M., Nijagunaiah, R. (2011) Effect of AM fungal association with normal and micropropagated plants of *Andrographis paniculata* Nees on biomass, primary and secondary metabolites. *International Research Journal of Plant Science*, 2(12): 338-348.
- Verlag, D.A. (1978) *Deustches Arzneibuch*. Stuttgart: Gogi-Verlag GmBH, 680p.
- Vieira, M.C., Gomes, H.E., Sangalli, A., Heredia, Z.N.A., Teixeira, I.R., Ramos, M.B.M. (2006) Crescimento e produção de biomassa de calêndula (*Calendula officinalis* L.) proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 8 (4): 193-197.
- Vitorazi filho, J.A. (2011) *Fungos micorrízicos arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação fosfatada em mudas de maracujazeiro-doce*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes– RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 52p.
- Zaller, J.G., Saccani, F., Frank, T. (2011) Effects of earthworms and mycorrhizal fungi on the growth of the medicinal herb *Calendula officinalis* (Asteraceae). *Plant Soil Environmental*, 57 (11): 499-504.
- Zonta, E. P; Machado A.A.; Silveira Júnior p. (1984) *Sistema de análises estatísticas para microcomputadores (SANEST)*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 151p.
- Zubek, S., Mielcarek, S., Turnau, K. (2012) Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 22: 149-156.
- Weber, O.B., Souza, C.C.M.de., Gondim, D.M.F., Oliveira, F.N.S., Crisóstomo, L.A., Caproni, A.L., Saggin Júnior, O. (2004) Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39 (5): 477- 483.
- Who-World (2002) Health Organization. *Monographs on selected medicinal plants*, 2. Geneva, 356p.

## APÊNDICE

Quadro 1A. Resumo da análise de variância e dos correspondentes coeficientes de variação (CV) para as características altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), nº de capítulos florais, massa seca de capítulos florais, diâmetro das inflorescências, colonização micorrízica em raízes, teores de N e P em função da inoculação com fungos micorrízicos e de adubação fosfatada.

| <b>Quadrado Médio</b>     |             |                          |             |            |
|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|------------|
| <b>Causas de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Altura de plantas</b> | <b>MSPA</b> | <b>MSR</b> |
| Bloco                     | 3           | 5.0505548                | 0.0610009   | 0.8198499  |
| FMA's                     | 2           | 28.2162534               | 0.1738033   | 3.0274542  |
| Fósforo                   | 1           | 248.3266961              | 76.9556909  | 74.9596763 |
| FMA's x Fósforo           | 2           | 44.1204197               | 0.6738256   | 0.5956382  |
| Resíduo                   | 15          | 2.2115558                | 0.0761864   | 0.4489900  |
| CV (%)                    |             | 5.44                     | 4.81        | 15,05      |

| <b>Causas de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Nº de capítulos florais</b> | <b>Massa seca de capítulos florais</b> | <b>Diâmetro das inflorescências</b> |
|---------------------------|-------------|--------------------------------|--|-------------------------------------|
| Bloco                     | 3           | 1.6111111                      | 0.0002299                              | 24,1299875                          |
| FMA's                     | 2           | 44.7916667                     | 0.1043551                              | 18,4737512                          |
| Fósforo                   | 1           | 150.0000000                    | 0.1890375                              | 0,5399995                           |
| FMA's x Fósforo           | 2           | 86.3750000                     | 0.0321466                              | 21,4687777                          |
| Resíduo                   | 15          | 2.7111111                      | 0.0022257                              | 29,2296693                          |
| CV (%)                    |             | 11.04                          | 9.43                                   | 7,14                                |

| <b>Causas de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Colonização micorrízica</b> | <b>Conteúdo de N</b> | <b>Conteúdo de P</b> |
|---------------------------|-------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Bloco                     | 3           | 16.6666667                     | 33.1730203           | 2.1854814            |
| FMA's                     | 2           | 12716.6666667                  | 239.1542589          | 39.6109281           |
| Fósforo                   | 1           | 2016.6666667                   | 12054.7874855        | 1490.7384127         |
| FMA's x Fósforo           | 2           | 516.6666667                    | 42.3572870           | 9.1666609            |
| Resíduo                   | 15          | 16.6666667                     | 30.1059608           | 1.0622881            |
| CV (%)                    |             | 8.91                           | 6.36                 | 7,72                 |

Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Quadro 2A. Resumo da análise de variância e dos correspondentes coeficientes de variação (CV) para os teores de K, Ca e Mg em plantas de calêndula e teor de flavonoides, em função da inoculação com fungos micorrízicos e de adubação fosfatada.

| <b>Causas de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Conteúdo de K</b> | <b>Conteúdo de Ca</b> |
|---------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| Bloco                     | 3           | 65.4998241           | 41.1217419            |
| FMA's                     | 2           | 304.6659763          | 119.7575892           |
| Fósforo                   | 1           | 19228.7205354        | 12351.0751388         |
| FMA's x Fósforo           | 2           | 98.6608406           | 99.2833088            |
| Resíduo                   | 15          | 38.1686337           | 16.4590451            |
| CV (%)                    |             | 5.43                 | 5.03                  |

| <b>Causas de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Conteúdo de Mg</b> | <b>Teor de flavonoides totais</b> |
|---------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Bloco                     | 3           | 2.2354263             | 0.0000027                         |
| FMA's                     | 2           | 26.8256685            | 0.0002615                         |
| Fósforo                   | 1           | 985.8580128           | 0.0008592                         |
| FMA's x Fósforo           | 2           | 2.6645020             | 0.0016911                         |
| Resíduo                   | 15          | 1.4507744             | 0.0000343                         |
| CV (%)                    |             | 4.93                  | 5.51                              |

Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey



