



**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR
(PCR/RFLP) DE FUNGOS GLOMERALES EM
CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

LUCAS CARVALHO BASILIO DE AZEVEDO

2005

59122

050455

LUCAS CARVALHO BASILIO DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR (PCR/RFLP) DE FUNGOS
GLOMERALES EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, área de concentração em Microbiologia do Solo, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientação

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira

Dr. Arnaldo Colozzi Filho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da
Biblioteca Central da UFLA**

Azevedo, Lucas Carvalho Basilio de
Avaliação fenotípica e molecular (PCR/RFLP) de fungos glomerales
em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Lucas Carvalho Basilio de Azevedo. –
Lavras : UFLA, 2005.

76p. : il.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. FMA. 2. Café. 3. Micorrização. 4. Micorriza. 5. DNA ribossomal. 6.
Primers. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

LUCAS CARVALHO BASILIO DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR (PCR/RFLP) DE FUNGOS
GLOMERALES EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, área de concentração em Microbiologia do Solo, para obtenção do título de “Mestre”.

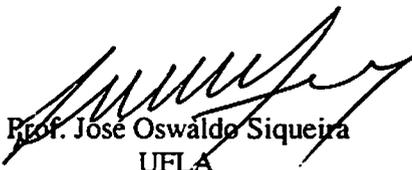
APROVADA em 04 de fevereiro de 2005

Dr. Arnaldo Colozzi Filho

IAPAR

Profª. Dulcinéia de Carvalho

UFLA


Prof. José Oswaldo Siqueira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

DEDICATÓRIA

Sou muito grato e dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, Erasmo e Marlene, meus irmãos, Mateus, Ana Julia e Maria Luiza; aos meus avós, tios, e primos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Arnaldo Colozzi Filho, pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná, pela orientação, incentivo, apoio e amizade, sendo de fundamental importância para o trabalho e à minha profissão.

Ao Professor Dr. José Oswaldo Siqueira, por sua orientação, apoio e disposição em melhorar e ajudar o trabalho.

À Dra. Sandra Maria Gomes da Costa, professora da Universidade Estadual de Maringá, pela grande disponibilidade e contribuição na identificação dos fungos MAs.

Ao Programa de Pós-Graduação em Solo e Nutrição de Plantas, da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Instituto Agronômico do Paraná, pela possibilidade da realização de estágio para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A Dra. Diva de Souza Andrade, Oswaldo Machineski, Aresmundinei Dias, Maria de Matos, Alexandra Scherer, André Nakatani, Andréa Scaramal, Brenda, Janksyn, Kiel, Patrick, Letícia, Luana, Luciana, Regina, Thalita, do Laboratório de Microbiologia do Solo (IAPAR), pelo auxílio, convívio e momentos alegres.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Solo, da Embrapa – CNPSo, na pessoa da Dra. Mariângela Hungria, por disponibilizar equipamentos e reagentes para algumas análises neste estudo.

Aos amigos Flávio de Paula, Emanuelle, Alessandra de Paula, Augusto, Bruno, Daniela, Fabrício Torres, Geraldo, Gláucia, Hudson, Dr. Igo Lepsch, Krisle, Liziane, Márcio Neres, Pablo, Paulo Pinho, Regilene, Robson, Rodrigo Cornacini, Sandra Maia, Sandro, Silvana, Tullio Pádua, Vinícius, Walfrido, Welson e todos que foram importantes durante esta etapa.

Aos meus queridos familiares, essenciais para este trabalho e para minha vida: meus avós Naziozeno, Florinda e Quitéria; meus tios Maria Elena, Maria de Lourdes, Raquel, Israel, Aparecida e Gilson; meus primos Francisco, Gesielene, Emanuel, Itauã, Bárbara, Rebeca, João Manoel e Gabriel.

Aos meus queridos pais, Erasmo e Marlene e meus grandes irmãos Mateus, Ana Julia e Maria Luiza.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Micorrizas Arbusculares	03
2.2 Micorrizas arbusculares no cafeeiro (<i>Coffea arábica</i> L.)	04
2.3 Genética de FMAs	08
2.4 Classificação, detecção e identificação de FMAs.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Micorrização do cafeeiro inoculado em casa de vegetação	14
3.1.1 Avaliação da colonização micorrízica e dos fungos colonizantes.....	16
3.1.2 Caracterização fenotípica e molecular dos esporos de FMAs	22
3.2 Micorrização do cafeeiro inoculado e cultivado a campo com insumos reduzidos.....	25
3.2.1 Avaliação da colonização micorrízica e dos fungos colonizantes.....	27
3.2.2 Caracterização fenotípica dos esporos de FMAs	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Estudos em casa de vegetação – avaliação fenotípica	30
4.2 Estudos em casa de vegetação – avaliação molecular	39
4.3 Estudos com material de cafeeiros sob cultivo com insumos reduzidos – avaliação fenotípica	51

4.4 Estudos com material de cafeeiros sob cultivo com insumos reduzidos – avaliação molecular	62
5 CONCLUSÕES	68
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

AZEVEDO, Lucas Carvalho Basilio de Azevedo. **Avaliação Fenotípica e Molecular (PCR-RFLP) de Fungos Glomerales em Cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 69 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

A simbiose entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e cafeeiro exerce grande efeito no crescimento e nutrição mineral das plantas, favorecendo o seu desenvolvimento. Devido aos efeitos desta simbiose para o cafeeiro é importante conhecer os aspectos da biologia dos FMAs quanto à identificação dos isolados presentes na rizosfera e à composição da comunidade rizosférica e daqueles fungos que de fato colonizam as raízes do cafeeiro. Neste trabalho, avaliaram-se a ocorrência e a colonização de FMAs em cafeeiros inoculados com espécies selecionadas e cultivados em solo natural, em condições de casa de vegetação e a campo, com insumos reduzidos. Em casa de vegetação, inocularam-se os cafeeiros com *Gigaspora margarita* e *Acaulospora morrowiae*, e a campo com uma mistura de espécies de FMAs. Aqueles efetivamente colonizando as raízes do cafeeiro cultivado com insumos reduzidos foram multiplicados a partir das raízes em milho como cultura armadilha. A ocorrência de FMAs micorrização foi avaliada por caracterização morfológica e molecular dos esporos, pela avaliação da colonização por PCR-RFLP e pela determinação da taxa de colonização em raízes. Em casa de vegetação, as espécies mais frequentes observadas após o crescimento por 188 dias foram da família Acaulosporaceae, enquanto que, na rizosfera de cafeeiros inoculados a campo, predominaram espécies da família Glomaceae e Acaulosporaceae. No bioensaio em casa de vegetação, a maioria das espécies recuperadas do milho inoculado com raízes de cafeeiro pertencia às famílias Gigasporaceae e Glomaceae. *Gl. geosporum* e *Gl. mosseae* foram observadas no solo rizosférico do cafeeiro a campo, mas não foram recuperadas no bioensaio com milho. Conclui-se que os iniciadores de amplificação de DNA específicos ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1, GiITS2, VAACAU, VAGIGA e VANS1 não são eficientes em detectar esses fungos nas raízes do cafeeiro. A inoculação aumentou a riqueza de espécies e densidade de esporos no cafeeiro. Por PCR/RFLP, *Scutellospora heterogama* foi detectada nas raízes, porém as espécies inoculadas *G. margarita* e *A. morrowiae*

* Comitê Orientador: José Oswaldo Siqueira - UFLA (Orientador), Arnaldo Colozzi Filho – IAPAR.

não foram detectadas por esta metodologia, apesar de *A. morrowiae* ter sido encontrada no solo. *G. margarita* e *Gl. clarum*, inoculadas no cafeeiro, foram recuperadas na rizosfera do milho, comprovando sua colonização no cafeeiro, porém não foram observados na rizosfera. Gigasporaceae foi detectada por PCR em raízes dos cafeeiros inoculados. Apesar de ter detectado alguns FMAs, a técnica PCR/RFLP não foi eficiente para estudar a ocorrência destes simbiontes nas raízes dos cafeeiros.

ABSTRACT

AZEVEDO, Lucas Carvalho Basilio de Azevedo. **Phenotypic and Molecular (PCR-RFLP) Evaluation of Glomerales Fungi in Coffee Tree (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 69 p. Dissertation (Master Program in Soil and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil*.

The arbuscular mycorrhizal symbiosis in coffee plants has great effect on plant growth and nutrition, and therefore favoring plant development. It is important to know the biological aspects of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) with regarding to the identification of rhizosphere isolate, AMF community composition and, especially, those colonizing coffee roots. In the present study AMF colonization was evaluated in coffee plants inoculated on natural soil under greenhouse and under field condition with low input. In the greenhouse coffee plants were inoculated with *Gigaspora margarita* and *Acaulospora morrowiae* whereas in the field coffee seedlings inoculated at transplanting with a mixture of AMF species. The AMF colonizing roots of inoculated plants under field conditions were also multiplied in bioassay using maize as trap culture. The presence of mycorrhiza was evaluated by morphological and molecular characterization of spores in the soil, the detection of root colonization through the use of PCR/RFLP techniques and by determination of colonization rate. Under greenhouse conditions the most frequent species belong to the Acaulosporaceae family. There was predominance of species of the Glomaceae and Acaulosporaceae families in the rhizosphere of field soil. The majority of the recovered AMF in maize bioassay belonged to the Gigasporaceae and Glomaceae families. *Gl. geosporum* and *Gl. mosseae* were not observed in the bioassay with maize, although they have been recovered in the coffee rhizospheric in the field. The specific primers for DNA amplification ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1, GiITS2, VAACAU, VAGIGA e VANS1 were not efficient to detect AMF in coffee roots. The inoculation with AMF increased the fungal species and spores density in coffee rhizosphere. The PCR/RFLP were able to detect *Scutellospora heterogama* in coffee roots but the inoculated species *G. margarita* e *A. morrowiae* were not detected by this technique, although spores of *A. morrowiae* was found in the soil. The inoculated species *G. margarita* and *Gl. clarum* were recovered by maize trapping culture inoculated with coffee tree roots, therefore indicating their

* Guidance Committee: José Oswaldo Siqueira - UFLA (Major Professor), Arnaldo Colozzi Filho - IAPAR

presence in coffee. These species were not recovered in the rhizosphere of field soil planted with inoculated coffee plant. Gigasporaceae family was detected in coffee tree roots by PCR/ RFLP. Although PCR/RFLP was able to detect some AMF this technique was not efficient to study the occurrence of symbionts colonizing coffee roots.

1 INTRODUÇÃO

Micorrizas são associações entre alguns grupos de fungos e vegetais, de ocorrência ampla e generalizada na natureza. Estas associações são geralmente caracterizadas como uma simbiose mutualista, isto é, com benefícios para o desenvolvimento tanto do fungo como da planta. Esses fungos conectam raízes com solo, facilitando a aquisição de nutrientes e água, promovendo melhoria no estado nutricional e tolerância a estresses diversos. Em contrapartida, o fungo recebe fotoassimilados e os fatores de crescimento de que necessita. Dentre estas associações micorrízicas, destacam-se aquelas feitas por fungos do Filo Glomeromicota, denominadas micorrizas arbusculares (MAs), que ocorrem na grande maioria das plantas vasculares, incluindo quase a totalidade das culturas de importância econômica, e a vasta maioria das espécies nativas dos trópicos.

Dentre as inúmeras espécies vegetais hospedeiras destes fungos, destacam-se as culturas tropicais, como o cafeeiro, no qual a simbiose exerce grande efeito no crescimento e na nutrição mineral das plantas, principalmente quanto à nutrição fosfática. As MAs aumentam a absorção de nutrientes pouco móveis no solo, como o fósforo, favorecendo todo desenvolvimento da planta, melhoria no estado de hidratação e reduzindo o estresse provocado pelo transplântio (Cardoso, 1978; Saggin-Júnior et al., 1995) e, assim, contribuem para o estabelecimento destas no campo. Por isso, os fungos que formam as MAs têm despertado muito interesse para a agricultura tropical, em que a maioria dos solos apresenta baixos níveis de P e alta capacidade de fixação deste elemento, e têm sido objeto de muitos estudos no Brasil.

Alguns estudos apontam que os efeitos da inoculação com esses fungos diminuem com o tempo e com o desenvolvimento das plantas no campo, de modo que plantas adultas tornam-se colonizadas predominantemente por fungos

indígenas do solo que, invariavelmente, são menos eficientes em promover o desenvolvimento das plantas.

É importante conhecer os aspectos da biologia destes simbiontes quanto à identificação dos isolados presentes na rizosfera, à composição da comunidade de FMAs e, em especial, aqueles que de fato colonizam as raízes do cafeeiro. Os estudos sobre a dinâmica e a taxa de colonização das raízes pelos FMAs em solo contendo comunidade diversa são dificultados pela semelhança entre hifas e entre estruturas anatômicas dos fungos quando colonizam as raízes. Assim, dentre as várias espécies de fungos que podem simultaneamente ser encontradas na rizosfera do cafeeiro, é difícil determinar, pela avaliação da colonização e do micélio interno, quais estão em simbiose com o cafeeiro. Técnicas convencionais baseadas em estudos morfológicos das estruturas produzidas pelos fungos nas raízes têm contribuído de modo muito limitado para se conhecer estes aspectos. A utilização de novas técnicas experimentais, baseadas em biologia molecular, tais como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) acoplada à RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) permite a caracterização de parte do DNA de indivíduos isolados ou em comunidade e pode possibilitar a caracterização destes fungos em vida livre no solo ou em simbiose no interior das raízes.

Neste trabalho empregaram-se as técnicas fenotípicas e de PCR-RFLP para avaliar a ocorrência e a colonização de FMAs em cafeeiros inoculados com espécies selecionadas e cultivados em casa de vegetação e a campo com insumos reduzidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Micorrizas arbusculares

As relações compatíveis entre plantas e certos grupos de fungos do solo são um fenômeno generalizado na natureza, conhecidas como micorrizas. Cerca de 70% a 80% das plantas terrestres formam micorrizas arbusculares (MAs), as quais são associações mutualistas entre as raízes da maioria das plantas vasculares e os fungos da ordem Glomerales, pertencentes ao Filo Glomeromicota (Schübler et al., 2001b). Pela sua ampla distribuição mundial nos ecossistemas (Smith & Read, 1997), as micorrizas arbusculares têm importância destacada na estrutura da comunidade vegetal e também por ocorrerem em grande parte das espécies cultivadas pelo homem (van der Heijden et al., 1998; Burrows & Pflieger, 2002; O'connor et al., 2002). Fortes evidências denotam a evolução dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) conjuntamente com as plantas terrestres e seus respectivos estabelecimentos no começo da Época Devoniana, há cerca de 400 milhões de anos (Remy et al., 1994). Fósseis de vegetais contendo organismos com estruturas morfológicamente similares aos FMAs atuais foram encontrados e reforçam tal hipótese. Provavelmente, as MAs evoluíram nos trópicos, mas foram disseminadas por toda a superfície do planeta, devido à sua grande diversidade de hospedeiros.

Conhecem-se diversos efeitos da micorrização arbuscular sobre as plantas simbiotes e os principais são a melhoria do estado nutricional, maior produção de substâncias de crescimento, maior taxa fotossintética, melhor capacidade de adaptação ao meio, redução dos efeitos sofridos por estresses de origem biótica e abiótica (Moreira & Siqueira, 2002), influência na atividade enzimática como, por exemplo, o aumento de atividade de H^+ -ATPases e as H^+ -

Pirofosfatases na raiz (Ramos et al., 2002) e maiores atividades de redutase de nitrato em mudas de cafeeiro micorrizadas (Konrad et al., 2002). Há evidências de que as micorrizas auxiliam na absorção de água (Al-Karaki et al., 2004; Augé et al., 2004; Sánchez-Blanco et al., 2004; Almeida, 1985), influenciando a determinação de tolerância à seca. A intensidade e a qualidade dos efeitos ocorrem conforme o hospedeiro, o ambiente e o fungo, mas a nutrição do vegetal é geralmente melhorada e, desse modo, aumenta a eficiência de utilização e conservação de nutrientes no agroecossistema. Os benefícios nutricionais são proporcionados pela maior absorção de elementos minerais, principalmente aqueles pouco móveis no solo, como o P, Zn e Cu (Colozzi-Filho & Balota, 1994; Siqueira, 1996; Caldeira et al., 1983). Os benefícios da micorrização quanto à absorção de P decrescem com o aumento deste elemento no substrato (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996). Em plantas de cafeeiro micorrizadas, os teores de N são geralmente reduzidos em relação àquelas onde não se verifica tal simbiose, o que é atribuído ao efeito de diluição, pela maior produção de massa dos vegetais micorrizados (Colozzi-Filho & Siqueira, 1986). Em contrapartida, os fungos MAs recebem fotoassimilados e os fatores de crescimento que necessitam para completar seu ciclo de vida, já que tais fungos são simbiotróficos obrigatórios e somente conseguem se multiplicar na presença do hospedeiro.

2.2 Micorrizas arbusculares no cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

A grande influência na nutrição inicial das mudas de cafeeiro pode ser demonstrada pela necessidade de elevada concentração de P no solo para promover desenvolvimento de plantas não inoculadas em mesmo nível de plantas inoculadas (Siqueira & Colozzi-Filho, 1986; Lopes et al., 1983; Habte & Bittenbender, 1999), indicando alta dependência da planta aos FMAs para a absorção deste nutriente (Lopes, 1985; Estrada & Sanches-De-Prager, 1995).

Entretanto, as informações sobre a ocorrência de FMAs em cafeeiros não-inoculados (seja no viveiro ou após estabelecimento no campo) e em produção mostram a predominância de espécies de baixa eficiência simbiótica que ocorrem naturalmente no solo. Assim, muitas vezes, as espécies indígenas (nativas) são mais eficientes em estabelecer simbiose, mas não em promover o desenvolvimento vegetal (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996).

Quando se tem uma monocultura como o cafeeiro, há a seleção de espécies de FMAs do sistema, em que as mais adaptadas permanecem ou tornam-se dominantes. Mas, nem sempre os aspectos de adaptação da espécie ao meio estão ligados à eficiência em promover o desenvolvimento vegetal (Johnson et al., 1992). Já o aumento da diversidade vegetal pode elevar o número de espécies de FMAs no sistema.

Conforme relata Colozzi-Filho (1999), o cultivo de leguminosas como adubos verdes, intercalar ao cafeeiro, aumentou a densidade e diversidade de FMAs no solo. Os ecossistemas naturais em equilíbrio possuem alta diversidade genética e de espécies. O cultivo agrícola e suas práticas de mecanização, adubações pesadas, aplicação de defensivos, etc., podem diminuir a diversidade dos FMAs (Ricci et al., 1999). Pelo fato das lavouras cafeeiras sob cultivo orgânico não receberem adubações químicas (principalmente fertilização de P), nem fungicidas e outros pesticidas com efeitos negativos sobre fungos MAs, elas podem apresentar maior densidade e diversidade desses fungos em relação ao cultivo convencional (Ricci et al., 1999). De acordo com Douds Junior et al. (1993), os sistemas de produção agrícola orgânica apresentam maior potencial de inóculo, número de esporos, colonização radicular e diversidade de espécies em relação aos sistemas convencionais. Em um trabalho com citros sob manejo orgânico, França (2004) mostra maior diversidade de espécies de FMAs do que sob manejo convencional.

As taxas de colonização do cafeeiro por FMAs são influenciadas pelo ambiente, pelo hospedeiro e pelo microssimbionte fúngico e variam em uma ampla faixa que, segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), pode variar, em média, de 16% a 51% de colonização micorrízica, em valores mínimos e máximos, respectivamente. Lopes et al. (1983a) relatam variação de 4% a 46% de colonização micorrízica no cafeeiro em amostras de solo rizosférico no estado de São Paulo. Fernandes & Siqueira (1989) relatam taxas de colonização variando de 10% a 60% em cafeeiros da região sul do estado de Minas Gerais.

Muitas espécies de FMAs que ocorrem no cafeeiro já foram relatadas, conforme dados de Saggin Júnior & Siqueira (1996), Lopes et al. (1983a), Balota (1989). Lopes et al. (1983a) identificaram 22 espécies de fungos MAs em 27 pontos de coleta de solo rizosférico em lavouras do estado de São Paulo. Fernandes & Siqueira (1989) encontraram 36 espécies de FMAs em diversas lavouras cafeeiras na região sul do estado de Minas Gerais. Os dados de várias lavouras cafeeiras mostram a predominância de ocorrência de espécies do gênero *Acaulospora*, seguida de *Glomus* e, conforme Lopes et al. (1983a), que analisaram várias lavouras cafeeiras, relatam que espécies do gênero *Acaulospora* estavam presentes em todas amostras, e espécies dos gêneros *Glomus* e *Gigaspora* estavam, respectivamente, em 81,5% e 59,2% das amostras analisadas.

Segundo dados de Saggin-Júnior; Siqueira (1996), as espécies de maior ocorrência no cafeeiro na região sudeste são *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *A. mellea*, *A. spinosa*, *Entrophospora colombiana*, *Gl. etunicatum* e *Gl. fasciculatum*, enquanto que espécies eficientes para o desenvolvimento do cafeeiro, como *G. margarita* e *Gl. clarum*, são de baixa densidade relativa nas amostras recuperadas do campo. De acordo com dados de Lopes et al. (1983a), *G. margarita* não foi encontrada em quaisquer dos 27 locais de amostragem em cafeeiros no estado de São Paulo.

O emprego da inoculação com espécies de fungos selecionadas é uma das propostas para aumentar o índice de colonização em mudas de cafeeiro com espécies simbioticamente eficientes e, por consequência, acelerar o crescimento, melhorar o vigor das plantas na fase de formação, melhorar o estabelecimento e aumentar a sobrevivência das mudas no campo (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996; Colozzi-Filho et al., 1994; Siqueira et al., 1993). Pelo fato de estes fungos serem simbiotróficos obrigatórios, precisarem de multiplicação *in vivo* e de serem mantidos em vasos de multiplicação, se faz necessário o estudo de alternativas de inoculação com isolados de FMAs, visando aumentar também sua eficiência simbiótica. Segundo Trindade (2000), fungo micorrízico arbuscular eficiente é aquele que, em certas condições edáficas, tem capacidade de sobreviver, colonizar o hospedeiro, competir com outros organismos, produzir grande volume de micélio e, assim, estabelecer uma eficiente relação mutualista com a planta. Estes parâmetros podem ser medidos pela produção e ou desenvolvimento vegetal.

Quando a inoculação é realizada em plantas em um substrato esterilizado, os FMAs não encontram dificuldades impostas por microrganismos no solo em estabelecer a micorrização, já que estes são ausentes, proporcionando melhores condições para o vegetal. Porém, a Instrução Normativa nº 1, de 10 de setembro de 2002, assinada em conjunto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determinou cronograma de eliminação do brometo de metila para todos os seus usos até 31 de dezembro de 2006 no Brasil. Desse modo, obriga a produção de mudas de cafeeiro em substrato não esterilizado.

A saída para os produtores de mudas de cafeeiro é a produção sem o uso de solo, em substratos comerciais e outros materiais isentos de agentes fitopatogênicos, porém, com ausência também de FMAs. Levando em

consideração a dependência do cafeeiro pela micorrização para seu desenvolvimento inicial e para aumentar a sobrevivência após transplântio (Colozzi-Filho et al., 1994), uma proposta é a inoculação de FMAs no cafeeiro no momento do transplântio para o solo de produção comercial, o qual possui uma comunidade biológica complexa. Em um solo natural não desinfestado, como ocorre em plantas no campo ou simulando-se estas condições, a resposta da planta em termos de desenvolvimento, quando inoculada com FMAs, também depende da espécie, da forma de se inoculá-la e desta espécie conseguir colonizar a planta em um ambiente mais competitivo. Portanto, é necessário conhecer qual o comportamento de cada espécie de FMA introduzida no cafeeiro sob as determinadas condições impostas pelo ambiente à inter-relação fungo-hospedeiro-solo. Balota (1989) mostra espécies inoculadas que persistiram no solo por cinco anos e comenta que existem evidências de que há viabilidade da introdução de espécie exótica em condições de campo, em relação à sua permanência na presença de espécies indígenas potencialmente mais adaptadas.

2.3 Genética de FMAs

Ainda existem muitas dúvidas a respeito da organização genética dos FMAs e não há relatos da ocorrência de reprodução sexual nestes organismos. No entanto, os FMAs têm apresentado variações no gene do RNA ribossomal (RNAr) entre isolados da mesma espécie, dentro do isolado e, até mesmo, variação dentro de um único esporo. Essa variação pode ser devido à hibridização, à recombinação intragenômica ou ao acúmulo de mutações ao acaso. Como são fungos cenocíticos (com hifas sem septos) e os esporos podem ter até milhares de núcleos, primeiramente se propôs que os FMAs possuíam núcleos distintos dentro de um mesmo organismo (Kuhn, 2001) e, portanto, sendo organismos heterocarióticos.

Em trabalho mais recente, Palowska & Taylor (2004) mostram por meio de análises do gene do RNAr em progênies e seqüenciamento destes genes a partir de núcleos isolados, que os FMAs possuem diferentes seqüências dentro de um esporo, mas que as mesmas seqüências são encontradas em todos os núcleos do mesmo esporo. Neste último caso, estes fungos possuiriam núcleos iguais dentro de um organismo, mas com diferenças nos genes de RNAr dentro do núcleo, portanto, sendo seres homocarióticos. Stukenbrock & Rosendahl (2005) propõem que podem haver espécies heterocarióticas e outras poliplóides (homocariose) ou, ainda, que existem aqueles genes com múltiplas variantes dentro de um esporo, enquanto outros genes se apresentam como única variante.

Souza et al. (2004) encontraram evidências para a recombinação gênica por meio de anastomose de hifas entre fungos geneticamente compatíveis dentro do gênero *Gigaspora*, caracterizando uma recombinação parassexual. Segundo Souza et al. (2004), “O recebimento de núcleos de outro fungo tornaria o receptor heterocariótico. A heterocariose é tipicamente instável e pode levar à fusão de dois núcleos geneticamente distintos, gerando um organismo diplóide. Posteriormente, este fungo pode perder cromossomos para retornar ao estágio haplóide (Schardl & Craven, 2003)”. Os mesmos autores concluem que as recombinações parassexual e intragenômica e a acumulação casual de mutações têm um importante papel na determinação de diversidade genética nesses, supostamente, fungos assexuais. De acordo com Vandenkoornhuyse et al. (2001), condições estressantes no solo levariam a maiores taxas do fenômeno de recombinação, gerando mais diversidade na população e tornando-a mais resiliente.

Apesar dos recentes avanços no entendimento da organização genética dos fungos micorrízicos arbusculares, ainda há muito para se conhecer sobre material genético, com o objetivo do melhor entendimento da biologia destes

fungos, de sua dinâmica populacional com conseqüente implicação na estrutura da comunidade vegetal e produtividade dos sistemas naturais e agrícolas.

2.4 Classificação, detecção e identificação de FMAs

Os FMAs são classificados dentro do Filo Glomeromicota, na ordem Glomerales, que compreende as seguintes famílias: Paraglomeraceae, Arcaeosporaceae, Geosiphonaceae, Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae (gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*) e Glomeraceae (*Glomus* grupo 1 e *Glomus* grupo2) (Schübler et al., 2001b). Existem aproximadamente 150 espécies de fungos glomeraleanos.

O estudo da ocorrência e da dinâmica das populações de FMAs vem se mostrando um desafio, pelo fato da identificação destes fungos não ser simples. Sua taxonomia baseia-se, principalmente, em aspectos morfológicos dos esporos, tais como cor, forma, estruturas e ornamentação de paredes externas (Schenck & Perez, 1987), as quais são afetadas pela fase de maturação do fungo. A produção de esporos e os seus caracteres morfológicos podem ser alterados por variações do ambiente e dependem do estágio fisiológico do fungo e do hospedeiro. Entretanto, até mesmo os esporos saudáveis podem trazer problemas porque algumas espécies possuem esporos com menos características morfológicas para diferenciação, como entre aquelas dos gêneros *Glomus* Tuslane & Tuslane e *Paraglomus* Morton & Redecker. Espécies dimórficas podem levar à confusão na identificação (Redecker et al., 2003).

Em determinadas situações, o FMA predominante na colonização pode não esporular na mesma magnitude de sua colonização, da mesma forma que uma outra espécie de FMA pode estar presente em grande número de esporos no solo, porém, sem uma colonização efetiva na planta. A dificuldade na identificação por morfoespécies torna-se ainda maior devido ao simbiotrofismo

obrigatório que estes microrganismos apresentam, sendo impossível, até o momento, seu cultivo em meio de cultura.

Além da dificuldade de identificação tradicional dos esporos, de estudos de dinâmica populacional e eficiência simbiótica de FMAs, necessita-se da identificação dos fungos que realmente estão colonizando as raízes. Com as metodologias disponíveis, este conhecimento é limitado devido à grande semelhança entre o micélio das várias espécies de FMAs. Assim, deve-se usar culturas armadilhas onde são inoculadas as raízes colonizadas para identificação dos esporos que aí se formarão. Contudo, esta metodologia pode não favorecer a esporulação de um ou outro fungo colonizante por efeitos de seletividade da planta ou do meio, além de exigir certo tempo. Entretanto, as dificuldades da identificação *in-situ* dos FMAs estão sendo superado por técnicas de biologia molecular (Stukenbrock & Rosendahl, 2005; Gadkar & Rillig, 2005; Isayenkov et al., 2004; Redecker, 2003; Millner et al., 2001; Redecker, 2000, Colozzi-Filho, 1999).

Além do DNA, outras moléculas, como ácidos graxos e isoenzimas, têm sido analisadas visando identificação, mas o seu uso é pequeno. Em comparação com essas moléculas, quando se analisa o DNA, tem-se a vantagem de não haver interferências do ambiente e de expressão gênica. As técnicas de análises genéticas têm sido recentemente utilizadas na pesquisa com os fungos MAs e têm permitido a identificação de fungos internamente às raízes colonizadas, além de caracterização molecular de esporos de FMAs (Renker et al., 2003; Colozzi-Filho & Cardoso, 2000). Têm também propiciado estudos com os genes do vegetal e dos fungos expressos durante o desenvolvimento da simbiose (Franken & Requena, 2001), a identificação de genes homólogos em outras espécies que não sejam FMAs (Requena et al., 2000), os estudos de evolução e filogenia (Souza et al., 2004; Morton & Redecker, 2001), a diversidade de

populações (Giovannetti et al., 2003) e outros resultados de trabalhos de pesquisa recentes.

Aliada à taxonomia tradicional, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) permitiu grande avanço no estudo de genética e em técnicas de identificação molecular de organismos, como o estudo de seqüências nucleotídicas em fungos Glomerales para estabelecer correta organização filogenética, como as novas famílias Archaeosporaceae e Paraglomaceae e seus respectivos gêneros, *Archaeospora* e *Paraglomus* (Morton & Redecker, 2001). Também se tem conseguido a identificação de FMAs, inclusive aqueles internos às raízes (Ishii & Loynachan, 2004; Colozzi Filho & Cardoso, 2000; Redecker, 2003).

Com o uso da PCR são possíveis análises genéticas a partir de pequenas quantidades de DNA pertencentes a organismos que não podem crescer axenicamente, como os FMAs. O uso de enzimas de restrição de DNA após a PCR tem sido aplicado para diferenciar organismos ou isolados com o mesmo padrão de bandas eletroforéticas de amplicons, mas com seqüências de nucleotídeos diferentes. Giovannetti et al. (2003) conseguiram um padrão de bandas único de PCR-RFLP da região ITS do DNA ribossomal (DNAr) para isolados de *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe, o qual pôde ser utilizado para a diferenciação de organismos dentro da espécie estudada. Redecker et al. (2003) também obtiveram padrões de bandas de PCR-RFLP a partir de DNA de esporos para comparação com os produtos de digestão com as mesmas endonucleases sobre amplicons de raízes colonizadas.

Análises de fragmentos de DNA amplificados pela técnica de PCR e também aqueles resultantes de PCR-RFLP podem detectar seqüências genômicas específicas e propõem a possibilidade da identificação taxonômica segura de FMAs, inclusive os fungos em colonização efetiva nas raízes do hospedeiro. Quase todos sistemas de identificação de FMAs utilizam a região do

DNAr. Esta região está presente em grande número de cópias no núcleo e possui regiões de seqüências nucleotídicas bem conservadas, juntamente com regiões variáveis, o que permite diferenciar taxa de vários níveis.

Objetivando-se a identificação de FMAs, na PCR podem-se empregar oligonucleotídeos iniciadores de amplificação de DNA (*primers*) específicos para famílias, gêneros ou espécies destes microrganismos e complementar a separação dos organismos em seus táxons com tratamento de endonucleases de restrição. Os iniciadores de amplificação de DNA GLOM5.8R, GIGA5.8R, ACAU1660, ARCH1311 e LETC1670 foram desenhados para a amplificação de indivíduos das famílias Glomaceae, Gigasporaceae, Acaulosporaceae, Archaeosporaceae e para a espécie *Glomus etunicatum*, respectivamente (Redecker, 2000). Os iniciadores VAGLO, VAACAU, VAGIGA e VALETC foram desenhados para a amplificação das famílias Glomaceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, e para a espécie *Glomus etunicatum*, respectivamente (Simon et al., 1993). Porém, pode ocorrer de que alguns iniciadores não se alinhem com a seqüência do DNA ribossomal de alguns indivíduos (Schübler et al., 2001a), o que pode levar à necessidade de utilização de mais de um iniciador de amplificação para identificação do fungo MA.

Considerando que a simbiose micorrízica arbuscular exerce grande efeito para o desenvolvimento do cafeeiro em solo natural, é importante conhecer a composição da comunidade destes fungos, os aspectos da biologia dos FMAs quanto à identificação destes na rizosfera e aqueles que, de fato, colonizam as raízes do cafeeiro. Desse modo, neste trabalho avaliaram-se, por meio das técnicas fenotípicas e de PCR-RFLP, a ocorrência e a infectividade de FMAs em cafeeiros inoculados com espécies selecionadas e cultivados em solo natural, em condições de casa de vegetação e a campo cultivado com insumos reduzidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado utilizando-se raízes e esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), ambos coletados na rizosfera de cafeeiros inoculados ou não com FMAs e cultivados em solo natural, sob condição de casa de vegetação e a campo conduzido há dois anos sob manejo orgânico. Complementarmente, parte das raízes provenientes de cafeeiros inoculados conduzidos a campo foi utilizada como fonte de inóculo para a realização de um bioensaio em casa de vegetação, tendo o milho como planta hospedeira.

3.1 Micorrização do cafeeiro inoculado em casa de vegetação

As raízes e esporos de FMAs foram coletados em plantas de cafeeiro e solo provenientes de um experimento de inoculação do cafeeiro em solo natural, com diferentes tipos de inóculos de FMAs, conforme tratamentos descritos a seguir: 1) controle (solo natural sem inoculação); 2) suspensão de esporos de *Gigaspora margarita* Becker & Hall e 3) suspensão de esporos de *Acaulospora morrowiae* Spain & Schenck. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na estação experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em Londrina, PR, no período de 29 de setembro de 2001 a 5 de abril de 2002.

O cafeeiro utilizado foi da variedade “Catuaí Amarelo”, que foi germinado em vermiculita estéril e transplantado para o solo no estádio de “orelha de onça”. O solo utilizado foi coletado na camada de 0 a 20 cm de profundidade, em área de monocultivo prolongado de cafeeiro (8 anos), localizada no município de Bela Vista do Paraíso, PR, cuja análise química é apresentada na Tabela 1. O solo foi acondicionado em vasos plásticos com capacidade para 3,5 litros e nenhuma correção de acidez ou fertilização foi

realizada. Este solo apresentou uma população nativa de FMAs composta pelas espécies *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e *Glomus microagregatum* Koske, Gemma & Olexia, com densidade total de 12 esporos.50cm³.

A suspensão de esporos de FMAs inoculada foi obtida por meio da extração dos esporos de um vaso de multiplicação que tinha *Brachiaria sp.* como planta hospedeira e as seguintes espécies de FMAs: *Acaulospora morrowiae* Spain & Schenck, *Archaeospora leptoticha* (Schenck & Smith) Morton & Redecke, *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Glomus spurcum* Pfeiffer, Walker & Bloss e *Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker.

TABELA 1. Análise química do solo proveniente de lavouras conduzidas há 8 anos com monocultivo de cafeeiro, em Bela Vista do Paraíso, PR, utilizado no experimento.

PH	C	P	K	Al	H+Al	Ca	Mg
	dag.dm ⁻³	— mg.dm ⁻³ —		—— cmol _c .dm ⁻³ ——			
4,3	1,904	5,2	46,8	1,01	7,2	1,17	0,69

Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido e centrifugação (Gerdemann & Nicolson, 1963). Para a obtenção da suspensão de esporos de *G. margarita*, estes foram extraídos do solo por centrifugação em água e recolhidos em peneira com malha de 0,105 mm, por meio de peneiramento úmido. Os esporos retidos foram então selecionados sob microscópio estereoscópico, eliminando-se eventuais contaminantes e contados para determinação da concentração de esporos no inóculo. Para *A. morrowiae*, os esporos foram recolhidos na peneira com malha de 0,037 mm e, sob

microscópio estereoscópico, separados por características morfológicas e contados. O inóculo foi colocado junto às raízes das plântulas de caféiro usando-se pipetadores manuais graduados, no momento do transplântio. Nos tratamentos com inoculação, aplicaram-se 2 mL da suspensão inóculo.planta⁻¹, contendo aproximadamente 150 esporos de cada espécie em cada tratamento. Visando homogeneizar a microbiota do solo, em todos tratamentos foram aplicados 10 mL.vaso⁻¹ de um filtrado de solo do vaso de multiplicação fonte do inóculo.

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação por 188 dias. As plantas receberam irrigação controlada por meio de pesagens dos vasos, de modo a manter a umidade do solo em aproximadamente 60% da capacidade de campo. Semanalmente, foi realizado rodízio dos vasos na bancada, com o objetivo de eliminar a ocorrência de efeitos ambientais sobre os tratamentos. Ao final do período de crescimento, as plantas foram colhidas separando-se raízes e parte aérea. O solo foi colhido e armazenado sob refrigeração até sua utilização. As raízes foram lavadas em água, separando-se as mais finas para avaliação de colonização micorrízica e caracterização molecular dos fungos que colonizavam efetivamente as raízes, conforme descrito abaixo. Os esporos foram extraídos do solo para determinação da esporulação e caracterização morfológica e molecular das espécies de FMAs presentes no solo, conforme descrito a seguir.

3.1.1 Avaliação da colonização micorrízica e dos fungos colonizantes

Para a avaliação da colonização micorrízica do caféiro e a caracterização molecular dos FMAs internamente às raízes, foram coletados, em diversos pontos das raízes, fragmentos de raízes finas, de modo a perfazer 2g por planta. Estas raízes foram homogeneizadas e divididas em duas porções de 1g cada, que foram utilizadas uma para avaliação quantitativa da colonização micorrízica e outra para estudos moleculares.

Para a determinação da colonização radicular do cafeeiro por FMAs, as raízes foram lavadas e imersas em KOH 10% por uma noite. Depois, foram aquecidas a 60°C em KOH 10% por 10 minutos para clarificação. Após a clarificação, coraram-se as estruturas fúngicas internas com azul de tripano ácido, de acordo com Phillips & Hayman (1970) e analisou-se a colonização das raízes sob microscópio estereoscópio, segundo Giovannetti & Mosse (1980).

Para os estudos de detecção molecular, extraiu-se o DNA de raízes de cafeeiro selecionando-se 30 a 50 fragmentos de raízes com 1cm de comprimento que foram sonicados (tratamento com ultra-som) duas vezes na potência máxima por cinco minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM para eliminação de debris e solo aderidos externamente às raízes. Depois, foram lavados em água estéril (destilada e autoclavada) e novamente sonicados como já descrito, mas na própria água estéril. Para liberação do DNA presente nas hifas colonizantes, foi feita uma maceração dos fragmentos de raízes com um micropilão após adição de 150 µL de tampão TE (Tris-EDTA) e 40µL de resina Chelex (Biorad®) 20%. O macerado foi, então, submetido a 4 ciclos de temperatura de +94°C e -20°C em banho-maria e congelador, respectivamente, para auxiliar a liberação do material genético em meio aos compostos dos tecidos fúngicos e vegetais ou, em protocolo alternativo, com a menor temperatura a -180°C, em nitrogênio líquido. O sobrenadante coletado após a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos foi utilizado em várias diluições nas reações de PCR ou, então, armazenados a -20°C.

Para confirmar se as condições da reação estavam corretas para se obter amplificação do DNA fúngico presente internamente às raízes e se o DNA extraído de raízes colonizadas (em que a concentração de DNA fúngico é muito inferior ao material genético vegetal e os compostos vegetais poderiam interferir na reação de amplificação), cada amostra de DNA extraído de esporos de *A. morrowiae*, de *G. margarita* e de *S. heterogama* foi diluída em 1:10 e misturada

em volume igual com um extrato cru de raízes de cafeeiro semeado e crescido em vermiculita esterilizada e, portanto, sem colonização micorrízica. O extrato destas raízes foi obtido como descrito anteriormente para a obtenção de extrato cru das raízes de cafeeiro crescidos em casa de vegetação sobre solo natural não desinfestado. O material resultante dessa mistura (extrato de esporos de FMAs + extrato de raízes sem colonização – ERSC) foi utilizado em PCR. Os produtos de PCR obtidos foram comparados com aqueles amplicons obtidos de esporos e de raízes colonizadas.

A reação de amplificação (PCR) constituiu-se de 2,5 µl de extrato cru contendo DNA de raízes nas diluições 1:1 (sem diluição), 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionados à solução de reação para um volume final de 25µl. A concentração final na reação foi de 125 µM de cada dNTP (desoxinucleotídeo trifosfato), 0,5µM de cada oligonucleotídeo de iniciação de amplificação de DNA (iniciadores de amplificação), 5,0 mM de MgCl₂, utilizando 1 unidade (U) de enzima Taq DNA polimerase e mais o tampão, fornecido pelo fabricante juntamente com a enzima, na concentração final de 1X. Para amplificação e análise dos fragmentos de DNAr proveniente das raízes utilizou-se a técnica de *nested* PCR ou amplificação aninhada, em que, primeiramente, amplifica-se uma região maior, para, na segunda PCR, utilizar os iniciadores da região alvo. Os produtos de PCR da primeira reação foram diluídos 100 vezes e utilizados como amostras para a amplificação na segunda PCR. Os iniciadores e suas seqüências de nucleotídeos utilizados são mostrados na Tabela 2.

Na primeira amplificação da região dos ITS foram usados os iniciadores de amplificação ITS1 ou NS51 em conjunto com ITS4. Na segunda etapa da *nested* PCR, utilizaram-se os iniciadores específicos da região dos ITS para *Gigaspora margarita*: GiITS1 e GiITS2 combinados. Para a família Gigasporaceae, utilizou-se o conjunto GIGA5.8R combinado com ITS1; para a família Acaulosporaceae, os iniciadores ACAU1660 e ITS4 e os iniciadores

específicos para *Glomus etunicatum* GETU1 e GETU2. A primeira reação para *nested* PCR visando a amplificação do início da região 18S foi feita utilizando-se o conjunto de iniciadores VANS 1 e NS41. Na segunda PCR, quando se objetivou amplificar a região alvo, foram utilizados os iniciadores para Gigasporaceae VAGIGA combinado com VANS1. Também foram empregados iniciadores para amplificação da família Acaulosporaceae: VAACAU em conjunto com VANS 1. O esquema de localização de anelamento dos iniciadores pode ser visto na Figura 1.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores de amplificação de DNA utilizados, suas respectivas seqüências nucleotídicas e referências.

Oligonucleotídeo	Seqüência nucleotídica	Referência
ACAU1660	5'-tga gac tct cgg atc ggg-3'	Redecker (2000)
GETU1	5'-gta ttc aaa acc cac act-3'	Millner et al. (2001)
GETU2	5'-ctc atc aag caa tta cga-3'	Millner et al. (2001)
GIGA5.8R	5'-act gac cct caa gca tgt g-3'	Redecker (2000)
GiITS1	5'-tga ggt att tta tac ctc ttg-3'	Lanfranco et al. (1999)
GiITS2	5'-acg ctt cac att aca taa cc-3'	Lanfranco et al. (1999)
ITS1	5'-tcc gta ggt gaa cct gcg g -3'	White et al. (1990)
ITS4	5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'	White et al. (1990)
ITS5	5'-gga agt aaa agt cgt aac aag g-3'	White et al. (1990)
NS41	5'-ccc gtg ttg agt caa att a-3'	Simon et al. (1992)
NS51	5'-ggg gga gta tgg tgc caa ggc-3'	Simon et al. (1992)
VAACAU	5'-tga ttc acc aat ggg aaa ccc c-3'	Simon et al. (1993)
VAGIGA	5'-tca cca agg gaa acc cga agg-3'	Simon et al. (1993)
VANS 1	5'-gtc tag tat aat cgt tat aca gg-3'	Simon et al. (1993)

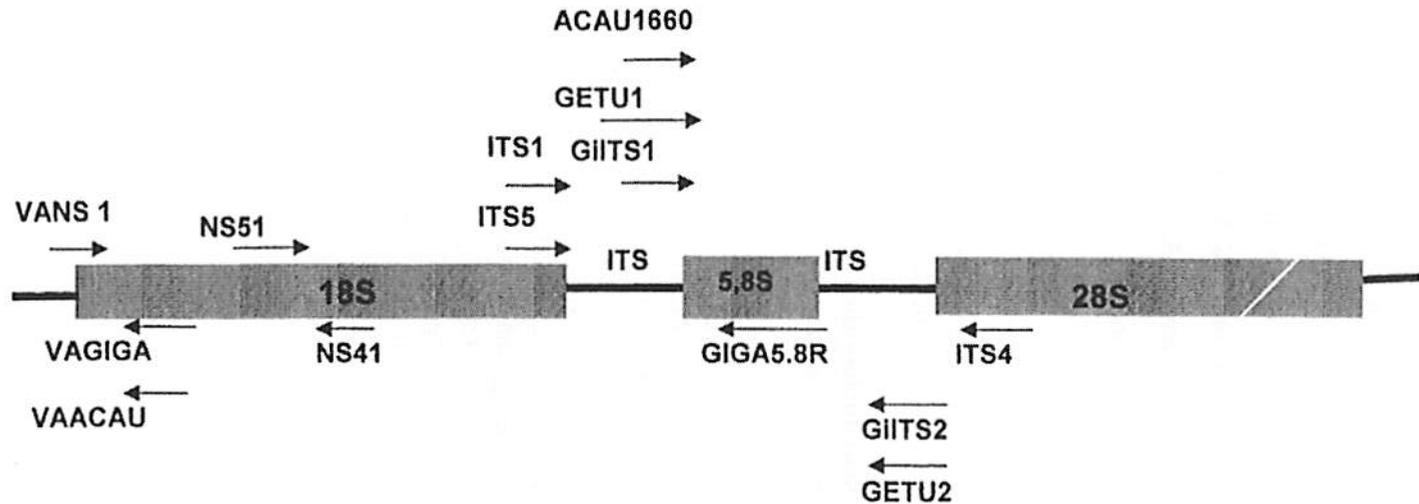


FIGURA 1. Representação da região do DNA ribossomal e os locais de anelamento dos iniciadores de amplificação (indicados como setas) utilizados em raízes de cafeeiros e esporos de fungos micorrízicos arbusculares. Adaptado de White et al. (1990), Simon et al. (1992), Simon et al. (1993), Lanfranco et al. (1999), Redecker (2000) e Millner et al. (2001).

O DNA foi amplificado empregando-se um termociclador PTC-100 da MJ Research®. O programa para a primeira etapa de amplificação foi 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial e 40 ciclos de 1 minuto e 30s a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 54°C para anelamento, 1 minuto a 72°C para extensão da fita por meio da polimerização de nucleotídeos, seguidos de 3 minutos a 72°C para extensão final. Para a segunda reação, com iniciadores da região alvo, o programa foi 60°C por 3 minutos, 95°C por 3 minutos, seguidos de 5 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 35 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; depois seguiram 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Em todos os ensaios foram utilizados tratamentos controle, com adição de água ao mix (= solução com todos reagentes para a amplificação por PCR) em vez de amostra de DNA. Depois de corrido o programa da segunda etapa de *nested* PCR, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%, por 2 horas a 110 volts. O tampão utilizado para a eletroforese foi o TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) 1X. O gel foi corado com brometo de etídeo, sendo a visualização feita sob luz ultravioleta (UV). A análise e a determinação do tamanho dos fragmentos de DNA, em pares de nucleotídeos amplificados e a foto-documentação do gel foram feitas com o sistema Kodak Digital Science®.

Para diferenciar os amplicons obtidos com os iniciadores de amplificação de DNA de raízes de cafeeiro inoculadas com aqueles obtidos das amostras de esporos de *G. margarita* e *S. heterogama*, e obter uma caracterização mais segura do DNA fúngico interno às raízes amplificado, o material amplificado foi digerido com as enzimas MBO I, ECO RI e HAE III. Na reação de restrição foram utilizados 10µL do produto de PCR, soro-albumina bovina, cinco unidades (U) da endonuclease e mais o tampão fornecido junto com as enzimas. A digestão realizou-se a 37°C por uma noite. Depois, o material resultante da digestão foi submetido à eletroforese e fotografado.



Para melhor caracterizar molecularmente o material amplificado de raízes, os amplicons resultantes da PCR foram submetidos ao seqüenciamento. Para tanto, as amostras foram purificadas com acetato de amônio (7,5M). Depois de ressuspendido as amostras foram diretamente utilizadas em reação de PCR para o seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado no ABI PRISM DNA Sequencing (Perkin Elmer®).

3.1.2 Caracterização fenotípica e molecular dos esporos de FMAs

Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963), centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos em água e por duas vezes em sacarose 50% a 2000 rpm por 2 minutos, coletando-se o sobrenadante depois de cada centrifugação. Os esporos recolhidos foram submetidos ao ultra-som por 5 segundos e transferidos para placas de petri para serem observados e contados sob microscópio estereoscópio (40 X). A caracterização morfológica dos esporos de FMAs foi feita em lâminas, por meio de observação em microscópio óptico composto. Visando tal observação, os esporos foram coletados de placas de petri e fixados em lâminas com PVLG (polivinil-álcool-glicerol) e PVLG com corante de Melzer (50% v/v). A identificação de gêneros e de espécies foi feita baseando-se em critérios morfológicos dos esporos, conforme descrito em Schenck & Perez (1987) e Morton & Benny (1990).

A ocorrência foi determinada pela presença ou ausência das espécies na amostra. Com os resultados de ocorrência e de esporulação em mãos, calculou-se a frequência de ocorrência de cada espécie por amostra, dividindo-se o número de amostras em que cada espécie estava presente pelo número total de amostras, e esse resultado foi multiplicado por 100 para transformar o dado em percentagem. Desse modo, a frequência de ocorrência (%) de uma espécie retrata a percentagem de amostras de solo com cafeeiro crescido em casa de vegetação

que apresentam tal espécie.

Para comparação com os amplicons obtidos de raízes inoculadas, realizou-se a caracterização molecular de *A. morrowiae*, *G. margarita* e *S. heterogama* provenientes do vaso de multiplicação que foi a fonte de inóculo para as mudas de cafeeiro. Esporos de *A. morrowiae*, *G. margarita* e *S. heterogama* foram separados do solo com peneiramento úmido e centrifugação em sacarose (50%), conforme descrito acima para extração de DNA e uso em PCR e PCR-RFLP.

Os esporos, em número de cinco a vinte, foram tratados por cinco vezes durante 15 segundos com ultra-som na potência máxima, em água estéril ultrapura (destilada, tratada em purificador Millipore® e autoclavada). Em seguida, foram quebrados em uma gota de 5µL de tampão 10X da enzima Taq Polymerase (Invitrogen®). Os esporos foram transferidos para tubos de 0,6 mL, adicionando-se 40 µL de TE (Tris EDTA) mais 10 µL de resina Chelex (Biorad®). Em seguida, a suspensão contendo os esporos quebrados e seu conteúdo foi submetida a quatro choques térmicos de 70°C a -20°C (ou a -180°C em nitrogênio líquido) por cinco minutos em cada uma das temperaturas. Coletou-se o sobrenadante após centrifugação a 10.000 rpm por cinco minutos, para o uso em PCR a seguir ou, então, estocagem a -20°C.

Para esporos de *A. morrowiae*, além do descrito acima, também foram utilizados dois protocolos alternativos que foram:

1 – Sessenta a cem esporos, após sonicação e enxágüe com água estéril, foram adicionados a um tubo de 0,6 mL contendo 40 µL de TE (Tris EDTA) mais 10 µL de resina Chelex (Biorad®). Após centrifugação a 13.200 rpm, os esporos foram macerados com micropilão e submetidos a 4 ciclos de choque térmico a 75°C e -20°C. O sobrenadante resultante da centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos foi coletado e utilizado imediatamente em PCR ou, então, estocado a -20°C.

2 – Sessenta esporos de *A. morrowiae* foram limpos como descrito acima e quebrados em água com micropilão. O extrato cru foi submetido ao protocolo adaptado e o DNA extraído com o kit de extração de DNA do solo do fabricante Mobio®. A exceção foi a ausência do passo de agitação inicial em sílica por 10 minutos. Alíquotas da solução final foram diluídas, sendo usadas imediatamente na reação de PCR ou, então, armazenadas a -20°C para uso posterior.

A reação de amplificação (PCR) constitui-se de 2,5 µL de extrato cru contendo DNA de esporos diluído 1:10 e adicionados à solução de reação para um volume final de 25µL, com as mesmas concentrações das reações para raízes. Os produtos de PCR da primeira reação foram diluídos 100 vezes e utilizados como amostras para a segunda amplificação na PCR. Para os esporos, na primeira amplificação da região dos ITS, foram usados os iniciadores de amplificação de DNA ITS1 ou NS51, em conjunto com ITS4. Para esporos de *G. margarita* e a mistura de ERSC desta espécie, na segunda etapa da *nested* PCR, utilizaram-se os iniciadores específicos da região dos ITS, GiITS1 e GiITS2 combinados. Para a família Gigasporaceae (*G. margarita* e *S. heterogama*), utilizou-se o conjunto GIGA5.8R combinado com ITS1 (Figura 1) e, para esporos de *A. morrowiae*, os iniciadores ACAU1660 e ITS4. A primeira reação para *nested* PCR visando a amplificação do início da região 18S foi feita utilizando-se o conjunto de iniciadores VANS 1 e NS41. Na segunda PCR, quando se objetivou amplificar a região alvo, foram utilizados os iniciadores em *G. margarita* e *S. heterogama*, VAGIGA, combinado com VANS1. Na espécie *A. morrowiae* foram empregados iniciadores VAACAU em conjunto com VANS 1.

Para a mistura de DNA de esporos com extrato de raízes ERSC, além das condições de amplificação descritas acima, também se empregou a concentração final na reação de 200 µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleotídeo de iniciação de amplificação e 2 mM de MgCl₂. Neste caso, o programa de

amplificação em termociclador para a primeira e segunda etapa da *nested* PCR foi o mesmo da etapa inicial das condições de amplificação descritas, com temperatura de anelamento de 54°C.

Após amplificação, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% para ser visualizado sob luz ultravioleta (UV). Os amplicons provenientes das amostras de esporos e mistura esporos com raízes sem colonização (ERSC) foram tratados com enzimas de restrição de DNA, de acordo com o descrito no item 3.1.1. Os amplicons resultantes da PCR de esporos de FMAs foram submetidos ao sequenciamento, assim como as amostras de produtos de PCR de raízes (item 3.1.1).

3.2 Micorrização do cafeeiro inoculado e cultivado a campo com insumos reduzidos

Avaliou-se a micorrização do cafeeiro pela determinação da colonização radicular, pela caracterização morfológica das espécies de FMAs presentes na área após 4 anos da inoculação e da população destes fungos efetivamente colonizando as raízes pelo uso de raízes como inóculo em um bioensaio tendo o milho como planta hospedeira, e pela caracterização molecular de fungos colonizantes das raízes do cafeeiro crescendo a campo por PCR-RFLP.

A lavoura localiza-se na Fazenda Nomura, uma propriedade particular situada no município de Bandeirantes, PR. As mudas de cafeeiro “Catuaí Vermelho” foram transplantadas para o campo e inoculadas em outubro de 2000. Desde o ano de 2002 a lavoura está em transição para cultivo orgânico, com vistas à certificação e, desde então, não recebe adubação química ou aplicação de defensivos agrícolas. Dessa forma, os cafeeiros são cultivados com baixos níveis de insumos há dois anos. A análise química do solo realizada no ano 2000 é apresentada na Tabela 3. Nesta lavoura o manejo das ervas que crescem na

entrelinha é realizado por meio de roçagem mecânica, visando não deixar o solo descoberto e, concomitantemente, impedir a competição do mato com a cultura.

TABELA 3. Análise química do solo sob lavoura cafeeira com insumos reduzidos da Fazenda Nomura, no município de Bandeirantes, PR

pH	C	P	K	Al	H+Al	Ca	Mg
	dag.dm ⁻³	— mg.dm ⁻³ —			——— cmol _c .dm ⁻³ ———		
6,0	2,7	29,6	936,0	0,00	3,97	13,5	3,68

Por ocasião da implantação da lavoura, no segundo semestre de 2000, mudas transplantadas em uma área de 1 ha foram inoculadas no momento do transplântio para o campo, com solo inóculo contendo uma mistura de FMAs. O solo inóculo, que continha 166 esporos.50 g⁻¹ de solo em média de 10 contagens, era composto de uma mistura de espécies de FMAs originárias da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares do IAPAR. O inóculo continha esporos das seguintes espécies: *Acaulospora morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Gl. geosporum* e *Gl. mosseae*. O solo inóculo foi adicionado nas covas no momento do transplântio das mudas produzidas em tubetes.

Em junho de 2004, no talhão de 1 ha onde as mudas foram inoculadas no transplântio há 4 anos, coletaram-se seis amostras aleatórias de solo rizosférico e raízes na projeção da copa dos cafeeiros. Os esporos foram extraídos do solo para levantamento de espécies que ocorrem no campo pela caracterização morfológica baseada nos esporos. Das amostras coletadas na rizosfera foram separadas raízes do cafeeiro para avaliação de colonização radicular e para uso como inóculo em cultura armadilha, visando a condução de um bioensaio para a multiplicação das espécies de FMAs presentes no interior das raízes. Além das

amostras da área cultivada com cafeeiros inoculados, coletou-se uma amostra de solo e raízes em um cafeeiro cultivado em área vizinha, na qual as mudas não receberam inóculo no transplântio, mas também está sob cultivo orgânico há dois anos.

3.2.1 Avaliação da colonização micorrízica e dos fungos colonizantes

A determinação da colonização micorrízica foi feita conforme já descrito no item 3.1.1. O solo coletado dos vasos com milho como cultura armadilha, e que foi inoculado com as raízes dos cafeeiros inoculados e cultivado com baixos níveis de insumo, foi utilizado para extração de esporos visando sua caracterização morfológica, conforme descrito no item 3.1.2. Assim, foram avaliadas as espécies de FMAs que esporularam em cada vaso, para se obter a riqueza de espécies que colonizavam o cafeeiro a campo.

TABELA 4. Análise química do solo utilizado no bioensaio para multiplicação de FMAs a partir de inoculação em plantas de milho de raízes de cafeeiros inoculados com fungos micorrízicos e cultivados a campo com baixa utilização de insumos.

pH	C	P	K	Al	H+Al	Ca	Mg
	dag.dm ⁻³	— mg.dm ⁻³ —		——— cmol _c .dm ⁻³ ———			
3,9	0,549	0,7	11,7	0,99	4,96	0,29	0,13

Para se recuperar as espécies de FMAs que colonizavam as raízes do cafeeiro do campo, realizou-se um bioensaio em casa de vegetação. Utilizaram-se as raízes provenientes das amostras de solo rizosférico coletados nos cafeeiros inoculados, sob cultivo comercial com insumos reduzidos, como inóculo para multiplicação de FMAs em milho (*Zea mays* L.) cultivar IPR114, sendo este

utilizado como cultura armadilha. As sementes de milho foram desinfestadas deixando-as por um minuto em álcool etílico 92,8° IPNM (92,8% v/v), seguido de um minuto em hipoclorito de sódio (NaOCl) 6%. O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi um solo proveniente do município de Arapongas, PR, desinfestado com brometo de metila e com as características químicas descritas na Tabela 4. Um grama de raiz do cafeeiro inoculado com FMAs e conduzido a campo foi utilizado como inóculo em vasos contendo 1kg de solo desinfestado. As raízes frescas foram adicionadas e espalhadas em uma camada estreita e cobertas com terra e com as sementes de milho. O ensaio constou de três repetições para cada amostra do campo, com delineamento experimental casualizado. Após duas semanas, os milhos foram desbastados para ficarem duas plantas por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente, de modo a manter a umidade em aproximadamente 60% da capacidade de campo. Após 110 dias da semeadura, as plantas foram colhidas e o solo amostrado para avaliação da esporulação e da diversidade de FMAs.

Além do protocolo de extração de DNA descrito no item 3.1.1, nas amostras de raízes do campo sob produção com insumos reduzidos também foi utilizado, em protocolo adaptado, o kit de extração de DNA do solo do fabricante Mobio®. Para tanto, após o passo de limpeza com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tratamento com ultra-som, as amostras de raízes foram previamente maceradas em tubos de 1,5 mL, com emprego de micropilão. O extrato das raízes foi adicionado aos tubos do kit comercial contendo solução para extração de DNA. A partir daí seguiu-se o protocolo do kit, com exceção do passo de agitação inicial em sílica por 10 minutos. Alíquotas da solução final foram diluídas, sendo usadas imediatamente na reação de PCR ou, então, armazenadas a -20°C para utilização posterior.

Para as raízes de cafeeiros do campo sob produção com baixa utilização de insumos, além dos iniciadores de amplificação e das condições de

amplificação descritas em 3.1.1, também se procedeu da seguinte maneira: a PCR constituindo-se de 2,5 µl de extrato cru contendo DNA de raízes nas diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionados à solução de reação para um volume final de 25µl. A concentração final na reação foi de 200 µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleotídeo de iniciação de amplificação de DNA (*primer*), 2 mM de MgCl₂, 1 unidade (U) de enzima Taq DNA polimerase e mais o tampão, fornecido pelo fabricante juntamente com a enzima, na concentração final de 1X. Na amplificação da região dos ITS, foram usados os iniciadores de amplificação ITS4 e ITS5 na primeira PCR. Na segunda amplificação, utilizou-se o conjunto GIGA5.8R e ITS5, os iniciadores GiITS1 e GiITS2 combinados (Figura 1) e GETU1 e GETU2.

O programa de amplificação em termociclador para a primeira etapa da nested PCR foi o mesmo da etapa inicial das condições de amplificação descritas no item 3.1.1. Já no segundo passo, foi utilizado o programa de amplificação: 95°C por 3 minutos, seguidos de 5 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 35 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; depois seguiram 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Em todos os ensaios foram utilizados tratamentos controle, com adição de água em vez de amostra de DNA. As condições de eletroforese, visualização e análise do gel foram as mesmas descritas no item 3.1.1. Os amplicons resultantes da PCR foram submetidos ao seqüenciamento, conforme descrito no item 3.1.1. Os esporos foram extraídos do solo, conforme Gerdemann & Nicolson (1963) e descrito no item 3.1.2.

3.2.2 Caracterização fenotípica dos esporos de FMAs

A caracterização morfológica dos esporos extraídos a campo foi realizada conforme descrito no item 3.1.2.

Foram avaliadas as frequências de ocorrência de cada espécie de FMA nos cafeeiros inoculados do campo e também aquelas espécies multiplicadas em milho inoculado com raízes desses cafeeiros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos em casa de vegetação – avaliação fenotípica

Mudas de cafeeiros inoculadas com *G. margarita* apresentaram maior colonização micorrízica (33%) em relação àquelas sem inoculação. Estas, ainda assim, apresentaram elevada colonização (21%), evidenciando a infectividade natural do solo. Cafeeiros inoculados com *A. morrowiae* apresentaram taxa de colonização intermediária (24%). Vários trabalhos com FMAs nesta planta indicam a ocorrência de uma grande amplitude nas taxas de colonização micorrízica. Segundo Saggin-Júnior & Siqueira (1996), a colonização micorrízica em cafeeiro varia de 0% a 88%, tendo a média analisada nos vários trabalhos sido de 33,5%. Siqueira & Colozzi-Filho (1986) indicam que, por volta de 20% - 30% de colonização micorrízica, os FMAs exercem efeito benéfico no crescimento do cafeeiro. Desse modo, embora estes valores sejam relativos e influenciados pela planta, pelo fungo e também por fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e fertilidade do solo, a colonização das mudas inoculadas com *G. margarita* está acima deste valor, e as mudas sem inoculação e inoculadas com *A. morrowiae* estão dentro desta faixa de valor (21% e 24%, respectivamente).

A inoculação e o crescimento do cafeeiro promoveram a esporulação e aumentaram a riqueza de espécies dos FMAs (Figura 2 e Tabela 5). A densidade relativa de esporos de cada espécie de FMAs também mudou com a inoculação. No solo com plantas inoculadas com *G. margarita*, observaram-se sete espécies de FMAs após 188 dias de crescimento: *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Entrophospora colombiana*, *Gl. diaphanum*, *Gl. microaggregatum* e *Gl. microcarpum*. No solo com mudas inoculadas com *A. morrowiae*, observaram-se 10 espécies: *A. laevis*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Acaulospora sp.*, *Entrophospora colombiana*, *Gl. diaphanum*, *Gl. microaggregatum* e *Gl. microcarpum*, *S. calospora* e *S. heterogama*, enquanto no solo com cafeeiro sem inoculação, apenas 6 espécies de FMAs foram recuperadas: *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *Entrophospora colombiana*, *Gl. microaggregatum*, *Paraglomus occultum* e *S. heterogama* (Tabela 5).

Desse modo, a inoculação de *G. margarita* e o crescimento do cafeeiro por 188 dias promoveram a esporulação de *A. morrowiae*, *Gl. diaphanum* e *Gl. microaggregatum* e não promoveram a esporulação de *P. occultum* e *S. heterogama*. O inóculo com *A. morrowiae* e o crescimento do cafeeiro promoveram a esporulação de *A. laevis*, *Acaulospora sp.*, *Gl. diaphanum*, *Gl. microaggregatum* e *S. calospora* e não promoveram a esporulação de *Gl. microcarpum* e *P. occultum*. Observa-se, na Tabela 5 e Figura 2, que o crescimento do cafeeiro, conjuntamente com a inoculação, tanto de *G. margarita* como de *A. morrowiae*, promoveu, principalmente, a esporulação de *Gl. microaggregatum*, *A. mellea* e *A. morrowiae*.

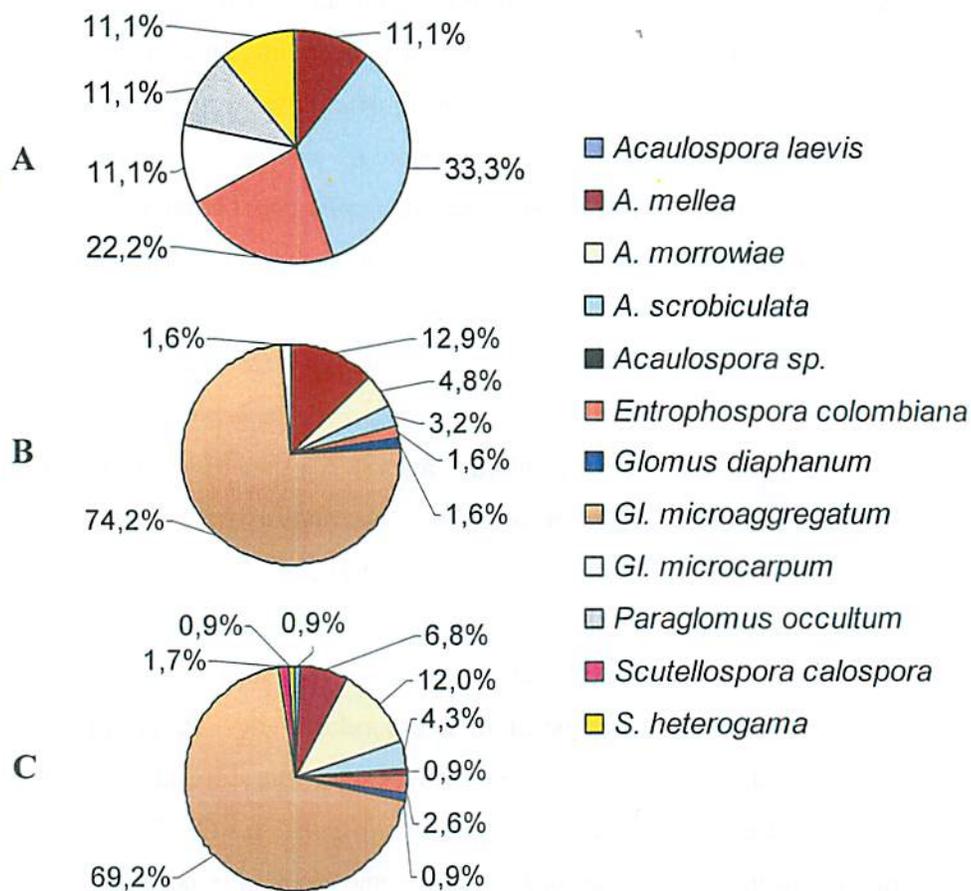


FIGURA 2. Densidade relativa¹ de esporos por espécies de fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiros não inoculados ou inoculados após 188 dias do transplante. (A) Cafeeiros não inoculados. (B) Cafeeiros inoculados com *Gigaspora margarita*. (C) Cafeeiros inoculados com *A. morrowiae*. 1 – Densidade relativa = (nº de esporos da espécie/nº de esporos do tratamento)x100. O número entre parênteses representa a densidade de esporos.150cm⁻³.

TABELA 5. Densidade de esporos de fungos micorrízicos em cafeeiros não inoculados ou inoculados com *Gigaspora margarita* e *A. morrowiae*, em casa de vegetação.

Espécies	Não inoculado	<i>G. margarita</i>	<i>A. morrowiae</i>
	Densidade de esporos(n° de esporos.150cm ⁻³)		
<i>Acaulospora laevis</i>	-	-	1
<i>A. mellea</i>	1	8	8
<i>A. morrowiae</i>	-	3	14
<i>A. scrobiculata</i>	3	2	5
<i>Acaulospora sp.</i>	-	-	1
<i>Entrophospora colombiana</i>	2	1	3
<i>Gigaspora margarita</i>	-	-	-
<i>Glomus diaphanum</i>	-	1	1
<i>G. etunicatum</i>	-	-	-
<i>G. microaggregatum</i>	1	46	81
<i>G. microcarpum</i>	-	1	-
<i>Paraglomus occultum</i>	1	-	-
<i>Scutellospora calospora</i>	-	-	2
<i>S. heterogama</i>	1	-	1
Total	9	62	117

Apesar de ter sido inoculado *G. margarita*, não foram encontrados esporos deste fungo no solo após 188 dias (Tabela 5 e 6). Pela conhecida eficiência de *G. margarita* para o desenvolvimento do cafeeiro (Lopes et al., 1983b; Colozzi-Filho & Siqueira, 1986), pela maior produção de matéria seca e crescimento em altura das plantas inoculadas com esporos desta espécie (Azevedo, 2003) e pelo fato das outras espécies presentes no solo do experimento serem reconhecidamente de baixa eficiência para o cafeeiro (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996), deduz-se que *G. margarita* foi capaz de promover alta colonização e maior desenvolvimento das plantas, porém, não foram recuperados esporos no solo onde foram inoculados, no período avaliado.

Também não foram recuperados esporos de *Gl. etunicatum*, que estavam presentes no solo antes do crescimento nos vasos com plantas de cafeeiro.

Gl. etunicatum é relativamente freqüente em solos de cafeeiro (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996) e, juntamente com *G. margarita*, é considerada eficiente para o cafeeiro (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996; Colozzi-Filho & Siqueira, 1986; Colozzi-Filho et al., 1985; Florence et al., 1984; Lopes et al., 1983b). É possível que ambas as espécies estivessem em simbiose, mas não haviam produzido esporos no período de 188 dias.

Oehl et al. (2003), utilizando amostras de solo provenientes de áreas com diferentes intensidades de manejo do solo, estudaram a esporulação em casa de vegetação. Esses autores observaram que mesmas espécies de FMAs produziram esporos em diferentes épocas, de acordo com a intensidade do manejo do solo e que chegaram a variar de 2 a 8 meses de uma área para outra. A esporulação de FMAs é regulada, principalmente, pela fisiologia da planta e, no caso do cafeeiro, o qual é uma cultura perene, sofre os efeitos da sazonalidade (Balota, 1989).

Nesse contexto, é provável que as espécies *Gl. etunicatum* e *G. margarita* estivessem colonizando as raízes do cafeeiro, porém, as condições durante a condução do experimento com relação à situação da relação simbiótica e à fisiologia do vegetal não foram favoráveis ou não permitiram a esporulação. Ainda, de acordo com Powell citado por Balota (1989), *G. margarita* possui baixa capacidade de disseminação, que reflete na baixa esporulação. Avaliando lavouras na região sul do estado de Minas Gerais, Brasil, Fernandes & Siqueira (1989) relatam que *G. margarita* foi recuperada em apenas dois locais dos 154 avaliados, enquanto que Lopes et al. (1983a) não encontraram esta espécie em diversas amostras de solo rizosférico de cafeeiro no estado de Minas Gerais.

TABELA 6. Frequência de ocorrência² de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solo natural sem inoculação ou inoculado com *G. margarita* e *A. morrowiae* após crescimento do cafeeiro por 188 dias. Média de 3 repetições.

FMA	Frequência de ocorrência, %		
	Solo natural	<i>G. margarita</i>	<i>A. morrowiae</i>
<i>Acaulospora laevis</i>	0	0	33
<i>A. mellea</i>	33	100	100
<i>A. morrowiae</i>	0	67	100
<i>A. scrobiculata</i>	67	33	100
<i>Acaulospora sp.</i>	0	0	33
<i>Entrophospora colombiana</i>	67	33	33
<i>Gigaspora margarita</i>	0	0	0
<i>Glomus diaphanum</i>	0	33	33
<i>Gl. Etunicatum</i>	0	0	0
<i>Gl. Microaggregatum</i>	33	67	67
<i>Gl. Microcarpum</i>	0	33	0
<i>Paraglomus occultum</i>	67	0	0
<i>Scutellospora calospora</i>	0	0	33
<i>S. heterogama</i>	33	0	33

1 – Frequência de ocorrência (%) calculada como = $(n^\circ \text{ de vasos com FMAs} / n^\circ \text{ total de vasos do tratamento}) \times 100$.

Antes do cultivo havia apenas uma espécie da família Acaulosporaceae no solo (*Entrophospora colombiana*); depois foram recuperadas esta e mais cinco espécies desta família (Tabela 5 e 6). No tratamento com inoculação de esporos de *A. morrowiae*, foram recuperadas as seis espécies de Acaulosporaceae, sendo que *A. mellea*, *A. morrowiae* e *A. scrobiculata* estavam presentes em todos vasos com cafeeiros crescidos por 188 dias (Tabela 6). Apesar de esporos de *A. mellea* e *A. scrobiculata* estarem ausentes no solo antes do transplântio do cafeeiro, provavelmente, outras formas de propágulos (fragmentos de raízes colonizadas e micélio) das duas espécies estavam presentes no solo e foram capazes de colonizar o cafeeiro e produzir esporos consistentemente, juntamente com *A. morrowiae*, que já estava no solo antes do

cultivo, mas também foi inoculada no ato do transplântio das mudas. Confirmam-se os dados de Saggin-Júnior & Siqueira (1996), que mostram que essas três espécies são as mais comumente encontradas na rizosfera do cafeeiro na região sudeste do Brasil e são consideradas dominantes em amostras de rizosfera de cafeeiros adultos no sul do estado de Minas Gerais (Fernandes, 1987). Apesar de não terem sido inoculadas no tratamento com suspensão de esporos de *G. margarita*, as espécies *A. mellea* e *A. morrowiae* apresentaram altos índices de ocorrência (100% e 67 %, respectivamente) (Tabela 6). Da mesma forma que propágulos de FMAs no solo, que não o esporo, colonizaram o cafeeiro inoculado com *A. morrowiae*, o mesmo deve ter ocorrido com as mudas que receberam *G. margarita* como inóculo, permitindo a esporulação destas espécies não inoculadas.

Scutellospora calospora e *S. heterogama* (Gigasporaceae) foram recuperadas do cafeeiro sem inoculação e naqueles inoculados com *A. morrowiae* (Tabela 6).

Os índices ecológicos foram aplicados aos dados de espécies e densidades de FMAs recuperados no solo das plantas sem inoculação (controle) e naquelas que receberam inóculo de *A. morrowiae* e *G. margarita* para mensurar a diversidade, dominância e equitabilidade. Pelo índice de dominância de espécies de Simpson, observa-se um valor mais baixo para a comunidade de FMAs no solo das plantas controle (sem inoculação) em relação aos tratamentos com plantas inoculadas (Tabela 7). Este dado está em conformidade com os outros índices, em que quanto menor a dominância maior é a diversidade (índice de Shannon – H') e maior a equitabilidade entre as espécies (índice de Pielou – J'). Isto indica que existe distribuição mais uniforme de espécies na comunidade de FMAs no solo das plantas sem inoculação.

TABELA 7. Índices ecológicos de dominância e diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em plantas de cafeeiro inoculado, em solo natural. Média de 3 repetições.

	RE ¹	Densidade de esporos ²	DS ³	H' ⁴	J' ⁵
Controle ⁶	6	9	0,209	1,677	0,674
<i>Gigaspora margarita</i> ⁷	7	62	0,568	1,360	0,484
<i>Acaulospora morrowiae</i> ⁸	10	117	0,499	1,153	0,464

1 - Riqueza de espécies, expressa em número de espécies de FMAs; 2 - Número de esporos por 150 cm³ de solo; 3 - Índice da Dominância de Simpson (Magurran, 1988); 4 - Diversidade de Shannon (Magurran, 1988); 5 - Equabilidade de Pielou (Magurran, 1988); 6 - Cafeeiros crescendo sobre solo natural e sem inóculo; 7 - Cafeeiros que receberam inóculo de *G. margarita* no momento do transplântio; 8 - Cafeeiros que receberam inóculo de *A. morrowiae* no momento do transplântio.

O tratamento com *A. morrowiae* apresentou a menor diversidade e distribuição mais desproporcional das espécies (menor índice J'). O tratamento com inóculo *G. margarita* resultou no valor mais alto de índice de dominância de Simpson e índices de diversidade de Shannon e equitabilidade de Pielou com valores intermediários entre os outros dois tratamentos (Tabela 7). No entanto, como esses índices ecológicos levam em conta o número de indivíduos, nesse caso o número de esporos, e analisando os valores de riqueza de espécies, constata-se que tais índices não representaram fielmente a diversidade no solo cultivado com cafeeiros inoculados ou não, em casa de vegetação (Tabelas 5, 7 e Figura 3). A maior riqueza de espécies foi apresentada onde se inocularam esporos de *A. morrowiae*, seguido do tratamento com inoculação de *G. margarita* no cafeeiro. O controle apresentou apenas 9 esporos.150cm⁻³ de 6 espécies de FMAs, enquanto, no solo com cafeeiro inoculado com *G. margarita* e *A. morrowiae*, foram recuperados 62 esporos.150cm⁻³ de 7 espécies e 117 esporos.150cm⁻³ de 10 espécies, respectivamente (Tabela 5 e 7). Como em

ambos os tratamentos inoculados com FMAs houve alta esporulação de *Gl. microaggregatum* (Tabela 5), que é comportamento característico dessa espécie, o valor do número de esporos aumentou bastante no solo e influenciou os valores dos índices ecológicos analisados.

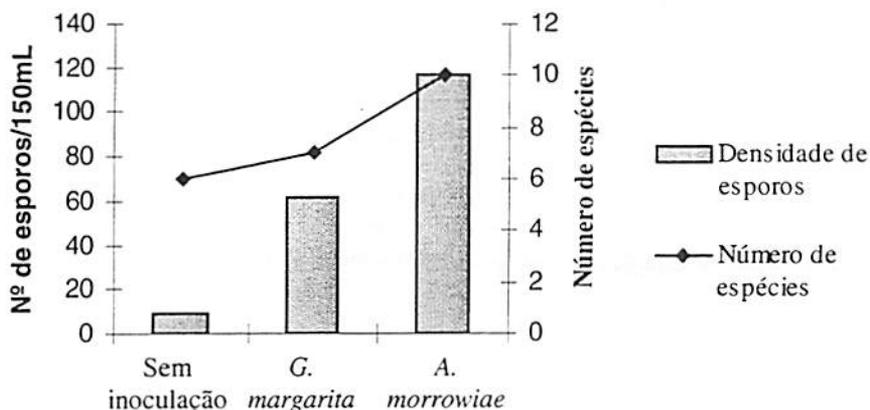


FIGURA 3. Densidade de esporos e espécies de Glomerales recuperadas do solo onde foram crescidos cafeeiros sem inoculação, inoculados com *Gigaspora margarita* e com *Acaulospora morrowiae*, em casa de vegetação.

Portanto, a inoculação nas mudas de cafeeiro aumentou a riqueza de espécies de FMAs, em maior ou menor magnitude, dependendo da espécie de fungo utilizada. *G. margarita* e *A. morrowiae* inoculados foram capazes de promover aumento da taxa de colonização micorrízica, mesmo em meio a FMAs preexistentes adaptados. As espécies com maiores índices de ocorrência pertenciam à família Acaulosporaceae.

4.2 Estudos em casa de vegetação – avaliação molecular

Os iniciadores de amplificação VAGIGA, específico para Gigasporaceae (Simon et al., 1993) e VAACAU, específico para Acaulosporaceae (Simon et al., 1993), combinados com VANS1 [específico para FMAs (Simon et al., 1993)] não amplificaram o DNA de amostras de raízes do cafeeiro crescido em vasos sobre solo natural, nem o DNA das amostras de esporos. Considerando que os cafeeiros foram inoculados com *G. margarita* e *A. morrowiae* e que diversas espécies de Acaulosporaceae (6 espécies) foram multiplicadas após o crescimento deste hospedeiro, mesmo no tratamento inoculado apenas com Gigasporaceae, a ausência de amplificação pode não refletir a ausência destas espécies de FMAs colonizando as raízes.

Uma explicação para a ausência de amplicons quando se utilizam os pares de iniciadores VANS1 e VAGIGA, e VANS1 e VAACAU é a ineficiência destes em amplificar todas as espécies de FMAs (VANS1) e todas espécies das famílias Gigasporaceae (VAGIGA) e Acaulosporaceae (VAACAU) (Schübler et al., 2001a). Segundo Schübler et al., (2001a), VANS1 não é específico para Glomerales, sendo homólogo apenas a um subgrupo de FMAs. Além disso, considerando que em apenas 20% a 30% dos segmentos das raízes havia tecido de FMAs (ou colonização micorrízica), a baixa concentração de DNA fúngico pode ter influenciado a reação, não permitindo a amplificação. Sharrock et al. (2004) trabalharam com 53 amostras de raízes de *Tithonia diversifolia* (girassol do México) que foram coletadas em 17 regiões da América Central, América do Sul, África e Ásia. Foi feita amplificação com os iniciadores VAGIGA, VAACAU e VAGLO [este último é proposto para amplificação de DNA da família Glomeraceae (Simon et al., 1993)] e em apenas 25% das amostras obteve-se amplificação com VAGLO-VANS1. De todas amostras de raízes, apenas uma amostra da Nicarágua amplificou com VAACAU. O iniciador VAGIGA, em conjunto com VANS1, não teve sucesso em amplificar DNA de

FMA colonizando raízes nesse trabalho. Devido à baixa especificidade destes iniciadores, discutida por Schübler et al. (2001a), Sharrock et al. (2004) sugerem que os iniciadores de amplificação utilizados podem ter subestimado a diversidade de fungos MA estudada em *Tithonia diversifolia*.

Devido à não amplificação de DNA com os iniciadores VAGIGA e VAACAU, específicos para as espécies de FMAs inoculadas, e devido à ocorrência no solo de esporos do gênero *Glomus* após o cultivo do cafeeiro, tentou-se a amplificação do DNA de FMAs colonizantes das raízes utilizando-se os iniciadores GETU1 e GETU2, específicos para *Gl. etunicatum* (Millner et al., 2001), e que flanqueiam a região dos ITS para iniciar a amplificação. Apesar de existirem esporos de *Gl. etunicatum* no solo antes do crescimento, não se obteve amplificação para raízes de cafeeiros inoculados ou não inoculados, crescidos em condições de casa de vegetação. É possível que não tenha havido infecção e colonização do cafeeiro por este fungo, uma vez que este não foi recuperado no solo nem detectado nas raízes por métodos moleculares.

Quando se utilizaram os iniciadores GiITS1 e GiITS2, específicos para amplificar a região dos ITS de *G. margarita* (Lanfranco et al., 1999), apenas amostras de DNA de esporos desta espécie foram amplificadas (Figura 4). Quando a mesma amostra de DNA fúngico do esporo foi misturada com DNA de raízes de cafeeiro sem colonização (amostra ERSC), como descrito no item 3.1.1, a amplificação não teve sucesso (Figura 4B). Provavelmente, compostos das raízes ou a diluição do DNA fúngico estão interferindo na amplificação e isto pode atrapalhar a detecção desta espécie em raízes colonizadas do cafeeiro. Também não se obtiveram amplicons de quaisquer amostras quando utilizado o iniciador ACAU1660, específico para região dos ITS de Acaulosporaceae (Redecker, 2000). DNA de esporos de *A. morrowiae* extraído de três formas diferentes também não apresentaram amplicons. Esta ausência de amplicons pode indicar que o iniciador, com a metodologia utilizada neste trabalho, não

amplifica para *A. morrowiae*.

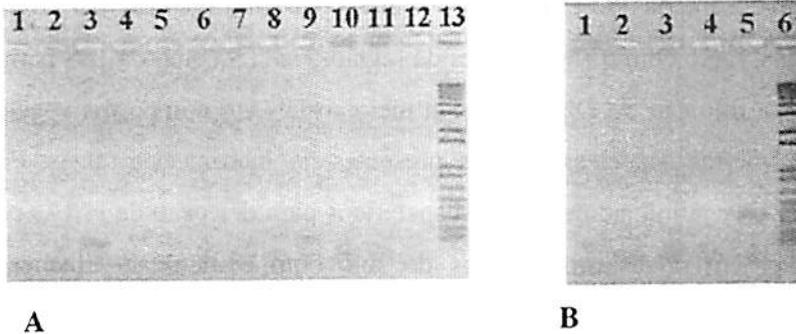


FIGURA 4. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GiITS1 e GiITS2: **A** - Colunas 1 a 12, amostras de DNA extraído de raízes colonizadas de cafeeiros crescidos em vasos sobre solo natural, **coluna 13**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®). **B** - Colunas 1 e 2, amostra de água estéril; **coluna 3**, amostra de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização, **coluna 4**, ERSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização); **coluna 5**, amostra de esporos de *G. margarita*; **coluna 6**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Os iniciadores GETU1 e GETU2, e GiITS1 e GiITS, que são espécie-específicos e o iniciador ACAU1660 (família-específico) têm como seqüências alvo a região dos ITS. Sabe-se que os genes do RNAr são altamente polimórficos até mesmo dentro de um esporo (Palowska & Taylor, 2004; Kuhn et al., 2001) e a região dos ITS é a que apresenta maior diversidade de seqüências (Lanfranco et al., 1999). Pela maior variabilidade entre espécies, a região dos ITS permite o desenho de iniciadores de amplificação espécie-específicos, citados acima. Porém, a mesma variabilidade de seqüências do DNAr pode levar a ocasiões em que esses iniciadores não se anelem na fita de DNA devido à pouca homologia entre os nucleotídeos e não amplifiquem todos isolados dentro de uma mesma espécie. Entretanto, considerando que, no extrato das raízes utilizado para amplificação do DNA de FMAs, o material genético do vegetal é predominante

em concentração e que existem várias espécies colonizando o cafeeiro (6 a 10 espécies observadas – Figura 2 e Tabela 6), outra causa da ausência de amplicons, tanto com os iniciadores da região dos ITS como da 18S para FMAs, pode ser a diluição do DNA alvo em meio ao DNA e compostos vegetais e ao DNA de outras espécies fúngicas presentes no interior das raízes. Por estas razões, o uso de iniciadores grupo-específicos para detecção de FMAs pode não ser viável em raízes provenientes de solo com comunidade diversa desses fungos.

Quando se utilizou 1 U de enzima Taq DNA polimerase nas duas ampliações da *nested* PCR, amplicons a partir do DNA das raízes foram conseguidos com o iniciador GIGA5.8R (específico para Gigasporaceae) em conjunto com ITS1 nas amostras de cafeeiros sem inoculação e naqueles que tiveram tratamento com suspensão de esporos de *G. margarita* (Figuras 5 e 6). Para a detecção de espécies da família Gigasporaceae, utilizando o conjunto GIGA5.8R e ITS1, nas raízes dos cafeeiros inoculados com *A. morrowiae* (Figura 7) foi preciso aumentar a quantidade de enzima na primeira reação de amplificação para 1,5 U de enzima Taq DNA polimerase e diminuir a temperatura de anelamento dos iniciadores para 54°C, repetindo-se assim o mesmo programa de temperaturas da primeira reação. A presença de produtos de PCR quando se utilizou este iniciador específico (Gigasporaceae) nas amostras de plantas sem inoculação (controle) e naquelas inoculadas com *A. morrowiae*, pode ser devido à colonização nas raízes pelas espécies *S. heterogama* e *S. calospora* (ambas pertencentes à família Gigasporaceae), as quais foram recuperadas do solo (Tabela 5). Portanto, as espécies *S. calospora* e *S. heterogama*, que estavam no solo após cultivo (Tabelas 5 e 6), foram detectadas nas raízes pela presença de bandas de DNA amplificado de fungos da família Gigasporaceae.

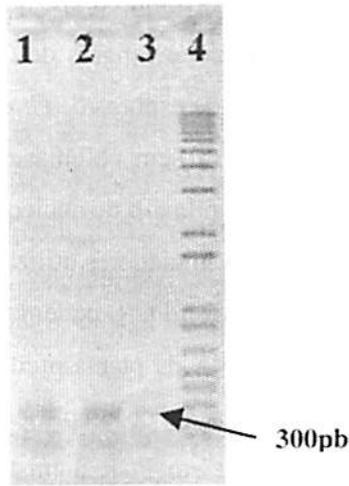


FIGURA 5. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS1 em raízes de cafeeiros crescidos em solo natural. **Colunas 1, 2 e 3**, amostras de DNA extraído de raízes de cafeeiros sem tratamento de inoculação (controle); **coluna 4**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®). Seta mostra banda de amplificação.

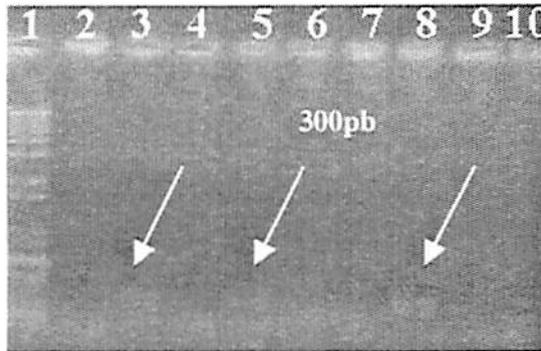


FIGURA 6. Produto da amplificação por PCR de DNA extraído de raízes de cafeeiros, utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS1 **Coluna 1**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®); **colunas 2 a 10**, amostras de DNA de raízes de cafeeiros inoculados com *G. margarita*. Setas mostram bandas de amplificação.



Os produtos de PCR utilizando o iniciador GIGA5.8R com ITS1 a partir das amostras de DNA extraído de esporos de *G. margarita*, de *S. heterogama*, ERSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização) e ERSC de *S. heterogama* tiveram o mesmo tamanho em número de nucleotídeos, isto é, 300 pares de bases (pb) (Figuras 8 e 9). Os outros iniciadores utilizados nas raízes do cafeeiro, e que não produziram amplicons após a PCR, podem ter sofrido efeitos de diluição do DNA fúngico em meio ao DNA da planta predominante e efeitos da influência de compostos vegetais na reação de amplificação. Entretanto, foram obtidos amplicons quando se utilizou em PCR a mistura de DNA de esporos de *G. margarita* ou *S. heterogama* com DNA de raízes de cafeeiro sem colonização (ERSC), como amostra para amplificação, com o iniciador GIGA5.8R em conjunto com ITS1, o que mostra a eficiência deste iniciador específico em amplificar o DNA alvo em meio aos compostos do vegetal.

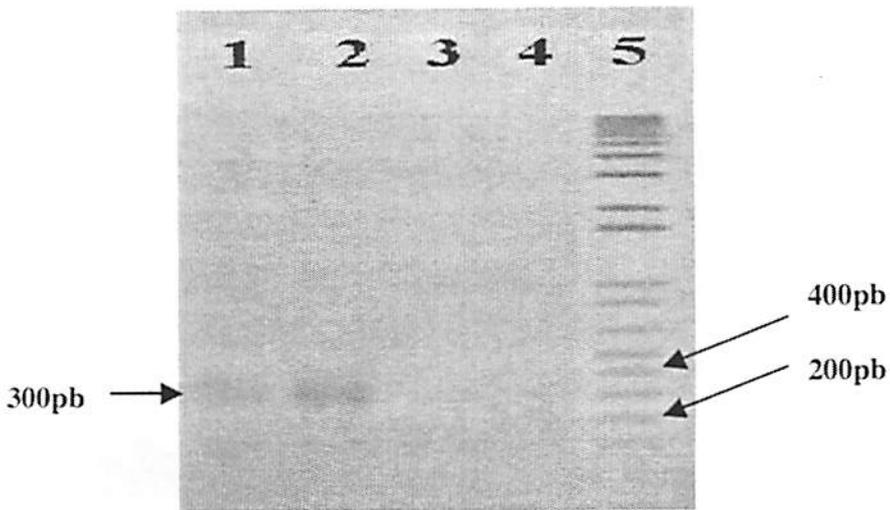


FIGURA 7. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS1 em raízes de cafeeiros crescidos em vasos contendo solo natural. **Colunas 1 a 3**, amostras de DNA de raízes de cafeeiros tratados com suspensão de esporos de *A. morrowiae*, em diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000, respectivamente; **coluna 4**, amostra de água estéril; **coluna 5**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Na reação para detecção de Gigasporaceae nas raízes das plantas inoculadas com *A. morrowiae*, a diminuição da temperatura de anelamento do iniciador de amplificação resultou em uma amplificação inespecífica na amostra com extrato de raízes sem colonização (Figura 9). O fragmento amplificado tem um tamanho aproximado de 380 pb, diferente daqueles obtidos dos esporos ou das outras raízes (300 pb). Apesar da constatação de FMAs nas raízes, as necessidades de variação nas concentrações de reagentes, nas temperaturas para a PCR, o que pode resultar em amplificações inespecíficas, podem ser um obstáculo para a aplicação da técnica da PCR na detecção de FMAs em raízes de cafeeiro quando se utilizam iniciadores de amplificação de DNA grupo-

específicos propostos.

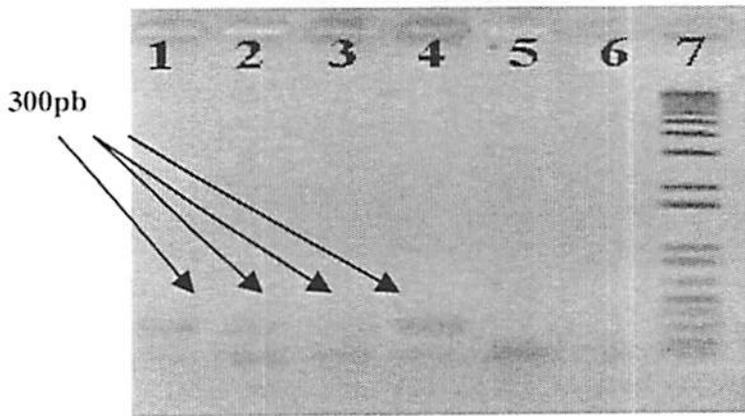


FIGURA 8. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS1. **Coluna 1**, amostras de DNA de esporos de *G. margarita*; **coluna 2**, ERSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização); **coluna 3**, esporos de *S. heterogama*; **coluna 4**, ERSC de *S. heterogama*; **coluna 5**, amostra de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização; **linha 6**, amostras de água estéril; **coluna 7**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

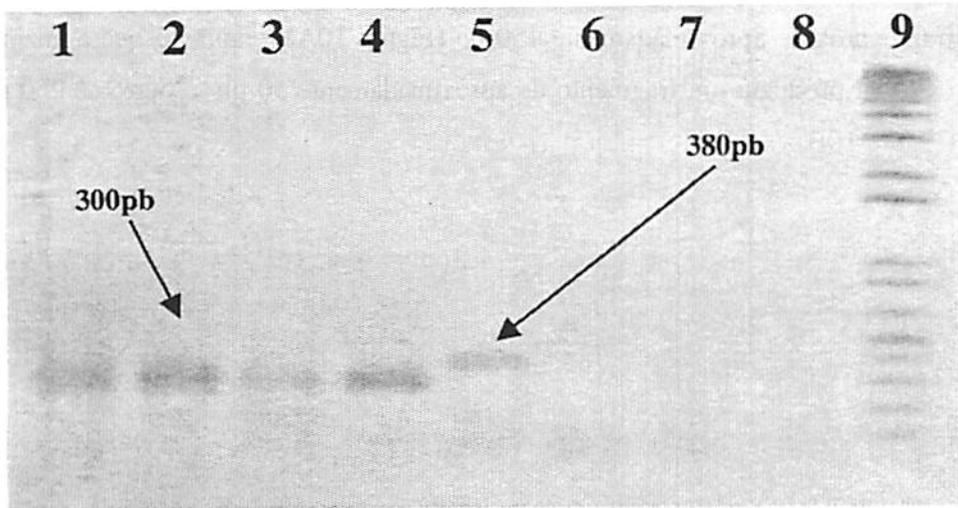


FIGURA 9. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS1, com 1,5 U de DNA polimerase e temperatura de 54°C para anelamento dos iniciadores. **Coluna 1**, esporos de *G. margarita*; **coluna 2**, ERSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização); **coluna 3**, esporos de *S. heterogama*; **coluna 4**, ERSC de *S. heterogama*, **coluna 5**, amostra 1:10 de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização; **linha 6**, amostra 1:100 de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização; **colunas 7 e 8**, amostra de água estéril; **coluna 9**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Para averiguar a relação dos amplicons obtidos das amostras de raízes descritas acima com aqueles obtidos das amostras de esporos de *G. margarita* e *S. heterogama*, foi feita digestão com endonucleases para detectar polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição nos produtos de PCR (PCR-RFLP). Quando se utilizaram as enzimas MBO I e ECO RI, não houve diferenças nos padrões de banda gerados nas amostras tratadas (Figura 10), o que não possibilitou a diferenciação entre as amostras. A enzima MBO I cortou as fitas amplificadas aproximadamente na metade de sua extensão, resultando em dois

fragmentos de aproximadamente 150 pb (Figura 10A), enquanto que a enzima ECO RI produziu um fragmento de aproximadamente 50 pb e outro de 250 pb (Figura 10B).

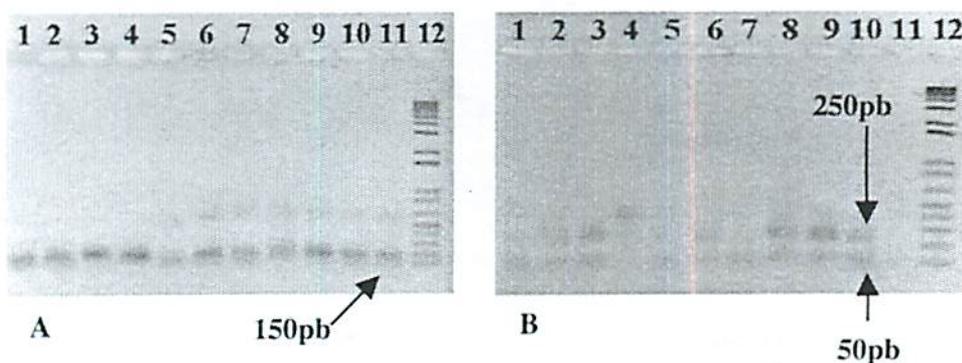


FIGURA 10. Resultado da digestão com endonucleases MBO I (A) e ECO RI (B) em amplicons (iniciadores GIGA5.8R e ITS1) de amostras de cafeeiros crescidos sobre vasos contendo solo natural e em amostras de esporos. **Colunas 1 a 3**, amostras de cafeeiros sem tratamento de inoculação (controle); **colunas 4 a 7**, amostras de cafeeiros tratados com suspensão de esporos de *G. margarita*; **coluna 8**, esporos de *G. margarita*; **coluna 9**, E : RSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização); **colunas 10 e 11**, esporos de *S. heterogama*, **coluna 12**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

O tratamento com a enzima HAE III produziu polimorfismo entre as amostras de produtos de PCR (iniciadores GIGA5.8R e ITS1) das raízes e dos esporos (Figura 11). Os amplicons das amostras de raízes dos cafeeiros não inoculados e daqueles inoculados com esporos de *G. margarita* e dos esporos de *S. heterogama* apresentaram duas bandas de DNA após a digestão, enquanto os amplicons dos esporos de *G. margarita* não foram digeridos pela HAE III

(Figura 11). Desse modo, o iniciador GiGA5.8R utilizado para amplificar DNAr de espécies da família Gigasporaceae, que compreende os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*, detectou fungos dessa família nas raízes do cafeeiro. Porém, os resultados da amplificação de DNA por PCR seguida da digestão com as endonucleases mostram que os fungos detectados internamente às raízes do cafeeiro têm uma relação maior com a espécie *S. heterogama* em relação à *G. margarita*. Isso é possível, uma vez que *S. heterogama* multiplicou-se nas plantas controle (sem inoculação) e naquelas que receberam inóculo de *A. morrowiae*. Já nas plantas que receberam inóculo de *G. margarita*, não foram observados esporos de *Scutellospora*, porém, é possível que houvesse colonização por este fungo, mas as condições da relação fungo-planta em interação com o meio não contribuíram para sua esporulação.

O seqüenciamento direto dos amplicons resultantes da PCR não foi possível, devido à baixa concentração de DNA amplificado e presença de artefatos de reação de amplificação, que foram detectados como manchas no gel de amplificação. A clonagem dos amplicons anteriormente ao seqüenciamento poderia fornecer mais informações sobre a seqüência nucleotídica e sobre a identidade do microrganismo, mas isto não pôde ser feito neste trabalho.

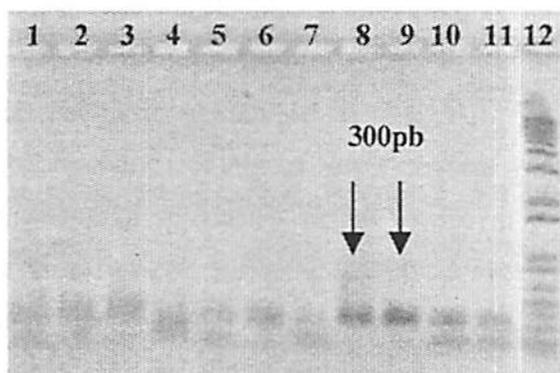


FIGURA 11. Resultado da digestão com endonucleases HAE III em amplicons (iniciadores GIGA5.8R e ITS1) de amostras de cafeeiros crescidos sobre vasos contendo solo natural e em amostras de esporos. **Colunas 1 a 3**, amostras de cafeeiros sem tratamento de inoculação (controle); **colunas 4 a 7**, amostras de cafeeiros tratados com suspensão de esporos *G. margarita*; **coluna 8**, esporos de *G. margarita*; **coluna 9, E** : RSC de *G. margarita* (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização); **colunas 10 e 11**, esporos de *S. heterogama*, **coluna 12**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Com os métodos moleculares utilizados neste trabalho não foi possível detectar a presença de *G. margarita* e *A. morrowiae* inoculadas em raízes de cafeeiro no solo natural. Entretanto, as plantas inoculadas com *G. margarita* apresentaram maior taxa de colonização radicular e maior desenvolvimento em altura e matéria seca das plantas (dados apresentados e discutidos em Azevedo, 2003), evidenciando seu estabelecimento e efetividade simbiótica para o cafeeiro. Por outro lado, os resultados de PCR-RFLP confirmam a presença de *S. heterogama* nas raízes do cafeeiro nas três situações (sem inóculo, inoculado com *G. margarita* e *A. morrowiae*). Após 188 dias de crescimento em casa de vegetação, esporos de *S. heterogama* foram recuperados em tratamentos não inoculados e naqueles inoculados com *A. morrowiae*. A avaliação molecular nas raízes de cafeeiros mostra que muitos dos iniciadores utilizados não foram

eficientes em detectar FMAs no interior das raízes. Por outro lado, foi possível observar, por PCR-RFLP, que houve infecção do cafeeiro por *S. heterogama*, da família Gigasporaceae, a qual é a mesma da espécie inoculada *G. margarita*.

4.3 Estudos com material de cafeeiros sob cultivo com insumos reduzidos – avaliação fenotípica

Os índices de colonização micorrízica nas plantas cultivadas a campo com insumos reduzidos foram de 33% e 57% (Tabela 8), respectivamente, nos cafeeiros inoculados e no não inoculado, após 4 anos do transplântio e da inoculação. Estes valores estão dentro da faixa encontrada em outros trabalhos. Fernandes; Siqueira (1989) observaram, em várias lavouras cafeeiras no estado de Minas Gerais, que a colonização micorrízica variou de 9,9% a 59,4 %, tendo a média de 154 amostras sido de 27,4 %. Balota & Lopes (1996) relatam valores médios de colonização micorrízica de 35%, sendo que em cafeeiros inoculados a média foi 38% e em cafeeiros não inoculados foi de 34%.

TABELA 8. Colonização micorrízica de cafeeiros inoculados ou não inoculados há 4 anos no transplântio com fungos micorrízicos arbusculares e cultivados a campo com insumos reduzidos.

	Colonização micorrízica (%)
Cafeeiros inoculados	33 (+/- 14,1)*
Cafeeiros não inoculados	57 (+/- 3,0)**

* +/- o desvio padrão; média de 6 repetições.

** +/- o desvio padrão; média de 3 repetições.

Ao todo foram recuperadas do solo e das raízes de milho, 29 espécies de FMAs. Este número é relativamente alto se compararmos com outros trabalhos

que revelam números de espécies diferentes para cafeeiros. Balota (1989) verificou 7 espécies de FMAs em cafeeiros após cinco anos de inoculação; Lopes et al. (1983a) identificaram 22 espécies de FMAs em 27 amostragens de lavouras cafeeiras no estado de São Paulo. Colozzi-Filho (1999) observou 12 (doze) espécies desses fungos em cafeeiros cultivados com leguminosas na entrelinha. Em um cafezal convencional em transição para cultivo orgânico, Ricci et al. (1999) encontraram 11 espécies de FMAs. O elevado número de espécies observadas no presente trabalho em relação a dados levantados em outros trabalhos e em relação à área vizinha onde o cafeeiro não recebeu inóculo de FMAs (Tabela 8), provavelmente deve-se ao inóculo aplicado nos cafeeiros no transplântio há 4 anos.

Considerando que o esporo representa grande dreno de fotossintatos da planta, e que é a unidade multiplicativa e órgão essencial para o ciclo dos FMAs, sendo um importante parâmetro para avaliar-se a relação simbiótica, é importante conhecer a densidade de esporos no solo e a sua dinâmica. A densidade média de esporos ($n^{\circ}.50\text{cm}^{-3}$ de solo) foi de 41,7 e 48,8 (Tabela 9) para o solo rizosférico dos cafeeiros não inoculado e para aqueles inoculados, respectivamente, havendo um pequeno aumento quando inocularam-se as plantas no campo. Foram observados, em média, 36 esporos. 50cm^{-3} (Tabela 9) no milho inoculado com raízes de cafeeiros. No entanto, como a esporulação é fortemente influenciada pela fisiologia e ciclo do vegetal, a densidade de esporos no milho pode não refletir a real relação e proporção de FMAs ocupando as raízes do cafeeiro que foram inoculadas na cultura armadilha.

No cafeeiro inoculado observou-se um total de 20 espécies de FMAs no solo rizosférico (Tabela 9). Porém, quando se recuperaram espécies colonizantes do cafeeiro no milho inoculado com raízes do próprio cafeeiro, 19 espécies de FMAs foram observadas (Tabela 9). O solo do cafeeiro não inoculado apresentou apenas quatro espécies (Tabela 9): *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A.*

scrobiculata e *Gl. etunicatum*, tendo *A. mellea* dominado em número relativo de esporos no solo (89% do total; Tabela 10 e Figura 12A). Já as espécies de FMAs no solo rizosférico do cafeeiro inoculado apresentaram distribuição mais uniforme de esporos em cada espécie e maior número de espécies (20), tendo as que apresentaram maiores densidades relativas de esporos sido *A. scrobiculata* (29%), *Gl. macrocarpum* (22%), *Gl. etunicatum* (13%), *A. mellea* (9%), *A. spinosa* (8%) e *Paraglomus occutum* (5%) (Tabela 10 e Figura 12B).

Portanto, as espécies mais estimuladas pela inoculação, quanto à esporulação, foram *A. scrobiculata*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. etunicatum*, *A. spinosa*, *Paraglomus occutum*, *Gl. invermaium*, *Glomus sp.*, *A. morrowiae* e *Gl. agregatum*, em ordem decrescente. Dessa forma, a inoculação do cafeeiro estimulou a esporulação de espécies de FMAs, sendo este efeito observado ainda após quatro anos de aplicação do inóculo. Em trabalho com cafeeiros a campo, Balota & Lopes (1996) relatam que a inoculação de *G. margarita* influenciou e aumentou a esporulação de algumas espécies indígenas no solo.

TABELA 9. Densidade de esporos e número de espécies observadas em cafeeiros não inoculados (NI) e inoculados (IN) há 4 anos no transplantio, cultivados com insumos reduzidos; e recuperados de milho inoculado com raízes do cafeeiro inoculado.

	Cafeeiro NI ¹	Cafeeiro IN ¹	Milho ²
Densidade de esporos ³	41,7	48,8	36
Nº de espécies	4	20	19

1 – Cafeeiros não inoculados (NI) ou inoculados no transplantio para o campo;

2 – Densidade de esporos e espécies em bioensaio com milho, onde inocularam-se as raízes do cafeeiro inoculado;

3 – Densidade de esporos = nº de esporos.50cm⁻³ de solo.

TABELA 10. Densidade relativa (%)¹ de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em cafeeiros não inoculados (NI) ou inoculados há 4 anos no transplântio, cultivados a campo com insumos reduzidos.

FMA	Cafeeiro NI ²	Cafeeiro inoculado
<i>Acaulospora foveata</i>	-	0,46%
<i>A. lacunosa</i>	-	1,02%
<i>A. mellea</i>	88,8%	9,21%
<i>A. morrowiae</i>	4,0%	2,05%
<i>A. scrobiculata</i>	4,0%	29,4%
<i>Acaulospora sp.</i>	-	0,34%
<i>A. spinosa</i>	-	7,62%
<i>E. infrequens</i>	-	0,23%
<i>Gigaspora margarita</i>	-	-
<i>Glomus agregatum</i>	-	1,93%
<i>Gl.clarum</i>	-	-
<i>Glomus diaphanum</i>	-	0,34%
<i>Gl. etunicatum</i>	3,2%	12,6%
<i>Gl. fasciculatum</i>	-	0,34%
<i>Gl. geosporum</i>	-	0,34%
<i>Gl. invermaium</i>	-	3,07%
<i>Gl. macrocarpum</i>	-	21,6%
<i>Gl. mosseae</i>	-	0,45%
<i>Gl. sinuosum</i>	-	0,79%
<i>Glomus sp.</i>	-	2,50%
<i>Paraglomus occultum</i>	-	5,46%
<i>S. hebterogama</i>	-	0,11%
<i>Paraglomus occultum</i>	-	5,46%
<i>S. hebterogama</i>	-	0,11%

1 - Densidade relativa de esporos = (nº de esporos da espécie/nº total de esporos)x100;

2 - Cafeeiros que não receberam inóculo de FMAs no transplântio.

Como a área do presente trabalho está sob cultivo orgânico há 2 anos, portanto, sem a aplicação de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas, as espécies inoculadas e outras estimuladas podem ter encontrado condições

favoráveis à sua multiplicação. Outro fator que pode ter ajudado na permanência de espécies no agrossistema é a presença de plantas daninhas crescendo na entrelinha. Dados de Oehl et al. (2003) sobre áreas localizadas na Europa Central, mostram que o manejo com rotação de cultura e sob cultivo orgânico possui valores de riqueza (número) de espécies de FMAs similares às estimativas de riqueza em ecossistemas naturais da Europa, e maiores em relação a sistemas de agricultura mais intensos.

Em monoculturas, como o cafeeiro, ocorre seleção para espécies de FMAs generalistas e aquelas especialistas na cultura agrícola em questão (Fernandes & Siqueira, 1989; Saggin Júnior & Siqueira, 1996; Lopes et al., 1983a). As espécies especialistas, que podem dominar a comunidade de FMAs, nem sempre são as mais eficientes na colonização radicular e na promoção do crescimento e desenvolvimento do hospedeiro. Isso é verificado pelo grande índice de ocorrência e ou dominância de espécies pouco eficientes para o cafeeiro do gênero *Acaulospora* no campo (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996). Segundo Colozzi-Filho (1999), o cultivo de leguminosas como adubação verde na entrelinha do cafeeiro aumentou a densidade e a diversidade de FMAs tanto na entrelinha como na rizosfera do cafeeiro. Esse autor mostra que espécies da família Acaulosporaceae (gêneros *Acaulospora* e *Entrophospora*) são mais frequentes no cafeeiro e espécies de Gigasporaceae foram mais comuns nas leguminosas. Entre as 20 espécies que ocorreram no campo, apenas 10 foram multiplicadas no bioensaio em milho e 9 espécies não encontradas no campo foram multiplicadas no milho (Tabela 11).

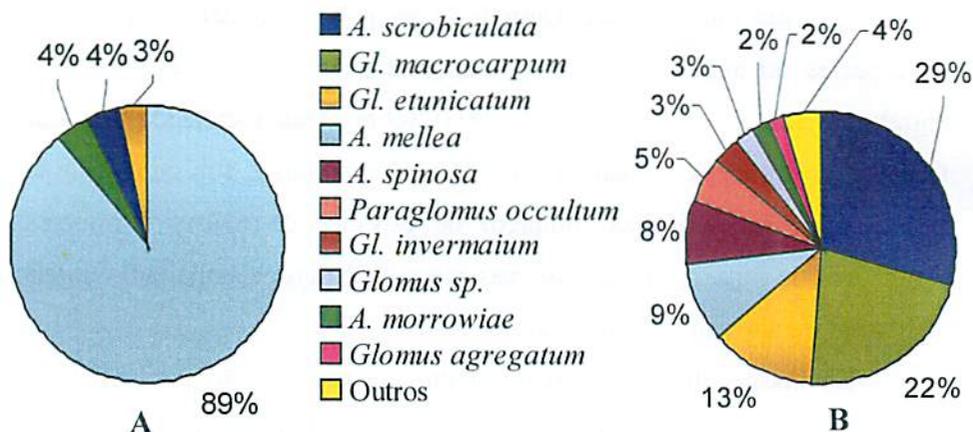


FIGURA 12. Densidade relativa de esporos no solo rizosférico de cafeeiros sob cultivo com baixos insumos. (A) Cafeeiros não inoculados no transplantio. (B) Cafeeiros inoculados no transplantio há 4 anos, com *Acaulospora morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Gl. geosporum* e *Gl. mosseae*.

As espécies encontradas no solo rizosférico do cafeeiro, mas não multiplicadas no milho foram: *A. foveata*, *A. lacunosa*, *A. sp.*, *A. spinosa*, *E. infrequens*, *Gl. agregatum*, *Gl. geosporum*, *Gl. mosseae*, *Gl. sinuosum* e *Gl. sp.* As espécies que foram recuperadas no milho, mas não estavam no solo rizosférico do cafeeiro no campo, foram *A. laevis*, *Archaeospora gerdemannii*, *E. colombiana*, *G. margarita*, *Gl. clarum*, *S. calospora*, *S. cerradensis*, *S. pellucida* e *S. sp.*

As espécies em comum que foram encontradas, tanto no solo como as recuperadas nas raízes, tiveram diferentes frequências de ocorrência no campo quando comparada às raízes (Tabela 11). Espécies com maior ocorrência no campo foram *A. mellea*, *A. morrowiae*, *Gl. etunicatum*, *Gl. macrocarpum* e *Paraglomus occultum*, sendo encontradas em todos os locais de amostragem. *A. Scrobiculata*, *A. spinosa* e *Gl. invermaium* foram recuperadas em 83% dos

pontos de coleta das amostras de solo rizosférico; *Gl. mosseae* em 67% e *A. lacunosa*, *Gl. sinuosum* em 50%. As espécies com maior ocorrência nas raízes (recuperados em milho) foram *A. scrobiculata* e *Gl. fasciculatum* (100%); *A. mellea*, *Gl. etunicatum*, *Gl. invermaium* e *Gl. macrocarpum* (83%); *G. margarita*, *S. heterogama* e *S. pellucida* (67%) e *A. morrowiae*, *P. occultum* e *S. calospora* (50%) (Tabela 11).

Saggin-Júnior & Siqueira (1996) relatam que as espécies mais comumente encontradas na rizosfera de cafeeiro da região sudeste são: *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *A. mellea*, *A. spinosa*, *E. colombiana*, *Gl. etunicatum* e *Gl. fasciculatum*. Com os dados apresentados aqui, também se constata a maior ocorrência de várias dessas espécies na época de amostragem (junho de 2004), no cafezal analisado neste trabalho, o qual foi inoculado no transplântio há 4 anos e que está há dois anos sob cultivo orgânico e localiza-se na região norte do Paraná, no município de Bandeirantes.

TABELA 11. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em cafeeiros não inoculados (NI) e inoculados (IN) há 4 anos no transplântio, cultivados com insumos reduzidos; e recuperados de milho inoculado com raízes do cafeeiro inoculado.

FMA	NI ¹	Inoculado ¹	Milho ²
	Ocorrência e densidade ³	Frequência de ocorrência ⁴	
<i>Acaulospora foveata</i>	-	33%	0
<i>A. lacunosa</i>	-	50%	0
<i>A. laevis</i>	-	0	17%
<i>A. mellea</i>	+ (37)	100%	83%
<i>A. morrowiae</i>	+ (1,7)	100%	50%
<i>A. scrobiculata</i>	+ (1,7)	83%	100%
<i>Acaulospora sp.</i>	-	17%	0
<i>A. spinosa</i>	-	83%	0
<i>Archaeospora gerdemannii</i>	-	0	17%
<i>Entrophospora colombiana</i>	-	0	17%

TABELA 11, Cont.

FMA	NI ¹	Inoculado ¹	Milho ²
	Ocorrência e densidade ³	Frequência de ocorrência ⁴	
<i>E. infrequens</i>	-	17%	0
<i>Gigaspora margarita</i>	-	0	67%
<i>Glomus aggregatum</i>	-	17%	0
<i>Gl.clarum</i>	-	0	33%
<i>Glomus diaphanum</i>	-	17%	33%
<i>Gl. etunicatum</i>	+ (1,3)	100%	83%
<i>Gl. fasciculatum</i>	-	17%	100%
<i>Gl. geosporum</i>	-	17%	0
<i>Gl. invermaium</i>	-	83%	83%
<i>Gl. macrocarpum</i>	-	100%	83%
<i>Gl. mosseae</i>	-	67%	0
<i>Gl. sinuosum</i>	-	50%	0
<i>Glomus sp.</i>	-	33%	0
<i>Paraglomus occultum</i>	-	100%	50%

1 - Cafeeiros não inoculados (NI) ou inoculados no transplântio para o campo;

2 - Espécies recuperadas em bioensaio com milho, onde foram inoculadas as raízes do cafeeiro inoculado;

3 - + = presença; - = ausência; o número entre parênteses mostra a densidade de esporos (nº de esporos.50cm⁻³)

4 - Frequência de ocorrência (%) calculada como = (nº de vasos com FMAs/nº total de vasos do tratamento)x 100;

Apesar de estar bem apenas uma das amostras de solo rizosférico coletadas no cafezal, *Gl. fasciculatum* foi recuperada em todas as amostras de raízes de cafeeiro inoculadas no milho (Tabela 11). Portanto, as espécies mais frequentes no solo deste agrossistema cafeeiro e, ao mesmo tempo, mais frequentes também nas raízes do cafeeiro são *A. mellea*, *A. scrobiculata* e *A. morrowiae* da família Acaulosporaceae; *Gl. etunicatum*, *Gl. macrocarpum* e *Gl. invermaium* pertencentes à família Glomaceae e *P. occultum* da família Paraglomaceae. O fato de *A. morrowiae*, *A. spinosa*, *P. occultum* e *Gl. mosseae*

estarem com grande ocorrência no solo rizosférico nos cafeeiros do campo, mas apresentarem uma ocorrência menor ou não terem esporulado no milho, quando este foi inoculado com raízes dos mesmos cafeeiros, pode ter como explicação a ausência real desses fungos nas raízes dos cafeeiros, estando associados às plantas daninhas ou, então, ser em decorrência de algum efeito de seletividade da planta multiplicadora por estas espécies de fungos MAs. Todavia, é necessário considerar que esses fungos que não produziram esporos no milho poderiam não estar em simbiose com o cafeeiro no momento da coleta de amostras, mas os seus propágulos na rizosfera podem permitir a futura colonização das raízes, se tais fungos forem competitivos o bastante para isso.

Espécies da família Gigasporaceae foram encontradas apenas aquelas recuperadas no milho como cultura armadilha, quando foi inoculado com as raízes do cafeeiro, com exceção de *S. heterogama* que estava presente em uma amostra de solo. As espécies *G. margarita*, *S. calospora*, *S. cerradensis*, *S. pellucida* e *Scuellospora* sp. só foram recuperadas a partir das raízes e com altas frequências de ocorrência nos pontos coletados de 67%, 50%, 67% e 67%, respectivamente (Tabela 11). *S. heterogama* teve uma frequência de ocorrência de 33% nas raízes dos cafeeiros.

As espécies *G. margarita* e *Gl. clarum* inoculadas no cafeeiro a campo não foram recuperadas no solo cultivado, mas foram observadas nos vasos com milho inoculado com raízes do cafeeiro do campo com frequências de ocorrência de 67% e 33%, respectivamente. Apesar de não esporularem no solo do campo, estas espécies, quando inoculadas em solo natural, foram eficientes na competição com outros fungos, na adaptação às condições edáficas para sobreviverem e colonizarem o cafeeiro e serem encontradas em suas raízes após 4 anos de sua inoculação. *G. margarita* teve um comportamento semelhante àquele no ensaio em casa de vegetação (veja item 4.1), onde uma suspensão de esporos desta espécie foi inoculada no solo natural no momento do transplântio e

promoveu melhor desenvolvimento das plantas, porém, não foram recuperados esporos desta espécie no solo com cafeeiros. Isto pode indicar que o estado fisiológico da planta e o estado da relação fungo-planta-solo não promoveram a produção de esporos na época avaliada. Os dados de Balota (1989) mostram que *G. margarita* foi observada após cinco anos de sua inoculação no cafeeiro, apesar do número de esporos desta espécie ter sido baixo (média de 2,5 esporos.100mL⁻¹ de solo). Lopes et al. (1983a) não observaram esporos de *G. margarita* em várias lavouras cafeeiras no estado de São Paulo. Fernandes & Siqueira (1989) encontraram *G. margarita* em apenas 1,2% das amostras avaliadas em cafeeiros da região Sul do estado de Minas Gerais. Observações de Powell (1979), citado por Balota (1989), mostram que *G. margarita* possui baixa capacidade de disseminação, mesmo na ausência de competidores, o que ajuda a explicar os baixos índices de ocorrência desta espécie.

Glomus mosseae e *Gl. geosporum* foram inoculadas nas plantas de cafeeiro e encontradas com ocorrência de 67% para a primeira espécie e um baixo índice de ocorrência (17%) para *Gl. geosporum* na rizosfera do cafeeiro do campo. No entanto, nenhuma das duas espécies foi recuperada a partir de raízes destes cafeeiros inoculadas em milho (Tabela 11). Apesar dessas espécies não serem encontradas nas raízes dos cafeeiros após quatro anos da inoculação, elas ainda permanecem no sistema em maior ou menor magnitude, respectivamente para *Gl. mosseae* e *Gl. geosporum*. Porém, é possível que essas duas espécies tenham sofrido efeitos do meio e da seletividade do milho nos vasos com cultura armadilha e que não proporcionaram a formação de esporos.

Nas amostras de campo, após 4 anos do transplântio e da inoculação, a maioria das espécies de FMAs recuperadas de cafeeiros inoculados pertence à família Glomaceae (10 espécies do gênero *Glomus*), seguida de espécies da família Acaulosporaceae (8 espécies) (Tabela 12). Já as quatro espécies recuperadas do cafeeiro não inoculado (Tabelas 10 e 11) pertencem apenas a

duas famílias: Acaulosporaceae (três espécies) e Glomaceae (uma espécie). Como já discutido acima, algumas espécies do gênero *Acaulospora*, família Acaulosporaceae, são reconhecidamente de grande ocorrência em cafeeiros (Lopes et al., 1983a; Caldeira et al., 1983; Fernandes & Siqueira, 1989; Saggin Junior & Siqueira, 1996). Lopes et al. (1983a) analisaram várias lavouras no estado de São Paulo e mostram maiores índices de ocorrência para espécies do gênero *Acaulospora*, seguidas por espécies dos gêneros *Glomus* e *Gigaspora*, em ordem decrescente.

TABELA 12. Fungos micorrízicos arbusculares em solo rizosférico após 4 anos do transplante e inoculação de cafeeiros cultivados com insumos reduzidos a campo, e recuperados em milho inoculado com de raízes destes cafeeiros.

Família	Cafeeiro	Milho
	Número de espécies	
Acaulosporaceae	8	5
Archaeosporaceae	0	1
Gigasporaceae	1	6
Glomaceae	10	6
Paraglomaceae	1	1
Total	20	19

Quando se recuperaram as espécies das raízes do cafeeiro no milho, a família Gigasporaceae, com 6 espécies, também é dominante no número de espécies, juntamente com as outras duas famílias citadas acima (Tabela 12). O número de espécies da família Glomaceae recuperadas do milho como cultura armadilha, em relação àquelas recuperadas da rizosfera do cafeeiro a campo, diminuiu de 10 para 6; para Acaulosporaceae, o número de espécies caiu de 8

para 5; Paraglomaceae permaneceu com uma espécie; surgiu uma de Archaeosporaceae e espécies de Gigasporaceae passaram de 1 no solo rizosférico do campo para 6 recuperadas no milho inoculado com raízes do cafeeiro (Tabela 12). Portanto, apesar de estar em pequeno número de espécies e baixa ocorrência no solo rizosférico dos cafeeiros do campo sob cultivo com insumos reduzidos, espécies de Gigasporaceae foram eficientes em colonizar as raízes do cafeeiro.

Os resultados de avaliação fenotípica mostram que a lavoura com cafeeiros inoculados e cultivados com baixos níveis de insumo apresentou alto número de espécies de FMAs em relação ao cafeeiro não inoculado crescendo em área adjacente e a dados de outras lavouras relatados na literatura. Observa-se que nem todas as espécies de FMAs dominantes no solo rizosférico do cafeeiro também são nas suas raízes utilizadas como inóculo em milho. Espécies eficientes para o cafeeiro *G. margarita* e *Gl. clarum* inoculadas há 4 anos em cafeeiro foram recuperadas de suas raízes, quando inoculadas em milho, mostrando que as duas espécies foram capazes de colonizar o cafeeiro. As famílias com maior número de espécies nas raízes foram Gigasporaceae e Glomaceae seguidas de Acaulosporaceae. No solo rizosférico no campo, a maioria das espécies pertenciam à Glomaceae e Acaulosporaceae.

Deve-se considerar que os dados do presente trabalho representam o retrato da situação no momento das coletas das amostras de solo.

4.4 Estudos com material de cafeeiros sob cultivo com insumos reduzidos – avaliação molecular

Para detectar fungos MAs inoculados, nas raízes dos cafeeiros cultivados com insumos reduzidos, utilizaram-se iniciadores de amplificação de DNA específico para Acaulosporaceae (VAACAU e ACAU1660), para Gigasporaceae (VAGIGA e GIGA 5.8R) e para *G. margarita* (GiITS1 e GiITS2). Como a

freqüência de *Gl. etunicatum* foi alta para amostras de solo rizosférico (100%) e para amostras de raízes do cafeeiro (83%) (Tabela 11), utilizou-se o par de iniciadores GETU1 e GETU2. Confirmando-se, assim, o que já foi relatado para raízes de cafeeiros em casa de vegetação, ou seja, a utilização dos iniciadores VANS1, VAGIGA e VAACAU não produziu amplicons em quaisquer amostras deste ensaio. Apesar de muitas espécies da família Acaulosporaceae estarem colonizando o cafeeiro, conforme revelou o estudo com cultura armadilha, o iniciador VAACAU não foi capaz de detectar colonização micorrízica.

Gl. etunicatum foi recuperado de 83% das amostras de raízes de cafeeiro (Tabela 8), porém, o uso de iniciadores GETU1 e GETU2 em raízes de cafeeiro não resultou em amplificação. Da mesma forma, mesmo com a presença de *G. margarita* multiplicada em 67% das amostras inoculadas em milho (Tabela 11) também não houve amplicons após PCR com o emprego do par de iniciadores GiITS1 e GiITS2. A ausência de amplicons pode ser devido ao grande número de espécies colonizando o cafeeiro (observadas como aquelas que se multiplicaram no milho). Foi observada uma média de 11,33 espécies de FMAs multiplicadas no milho para cada uma das 6 amostras no campo. Para se ter uma idéia da competição entre espécies apenas de FMAs, se for dividida a percentagem média de pontos de colonização micorrízica nas amostras de campo que foram inoculadas (33%) (Tabela 8) pelo número médio de espécies recuperadas em raízes de milho inoculado com as raízes dos cafeeiros (11,33), obtém-se o hipotético valor de 2,91% da colonização micorrízica do cafeeiro sendo ocupado por cada espécie, considerando-se todas elas com mesmo nível de competência para colonizarem as raízes. Esses números dão uma idéia de quão competitivo é o ambiente para colonização entre as espécies de FMAs. Isso ainda sem considerar os outros vários fatores bióticos e abióticos do meio. Assim, considerando o valor hipotético de 2,91% de colonização micorrízica por cada FMA nas raízes do cafeeiro do campo, como discutido acima, é possível que a

colonização por *G. margarita* e *Gl. etunicatum* foi pequena o bastante para não ser detectada por amplificação de DNA, por causa da diluição DNA fúngico destas duas espécies em meio ao DNA do vegetal dos outros FMAs colonizantes. Isso poderia resultar em baixa probabilidade dos iniciadores encontrarem a seqüência alvo. Entretanto, como já discutido (item 4.2), na diluição do DNA fúngico nas amostras extraídas de raízes, os compostos vegetais do extrato cru utilizado para reação de amplificação ou a alta especificidade dos iniciadores podem ter influenciado a PCR e não permitido a amplificação do DNA das famílias e espécies de FMAs no interior das raízes do cafeeiro, quando foram utilizados os iniciadores VAGIGA, VAACAU, ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1 e GiITS2.

Os iniciadores de amplificação GIGA5.8R (específico para Gigasporaceae) e ITS5 utilizados resultaram em amplicons em algumas amostras de raízes do cafeeiro, esporos de *G. margarita*, DNA de *G. margarita* misturado com extrato de raízes sem colonização (ERSC), *S. heterogama*, DNA de *S. heterogama* misturado com extrato de raízes sem colonização (ERSC) (Figuras 13 e 14). Porém, somente em três amostras de raízes do campo e das amostras de esporos de *G. margarita*, DNA de *G. margarita* misturado com extrato de raízes sem colonização (ERSC), de esporos de *S. heterogama* e DNA de *S. heterogama* misturado com extrato de raízes sem colonização (ERSC) é que produziram amplicons de 300pb (Figuras 13 e 14). Outros amplicons de amostras das raízes do cafeeiro do campo, têm o tamanho de cerca de 250 pb (Figura 14). Como no programa de amplificação utilizado nas amostras destas raízes, a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores foi mais baixa (54°C), o que resultou, provavelmente, em ampliações inespecíficas nas amostras do DNA amplificado de 250 pb. Esse resultado corrobora com aquele obtido neste trabalho, com raízes de cafeeiros crescidos em vasos sobre solo natural, no qual o uso da temperatura de 54°C para anelamento dos iniciadores

resultou em amplificação inespecífica quando se utilizou GIGA5.8R (Figura 8) (ver item 4.2).

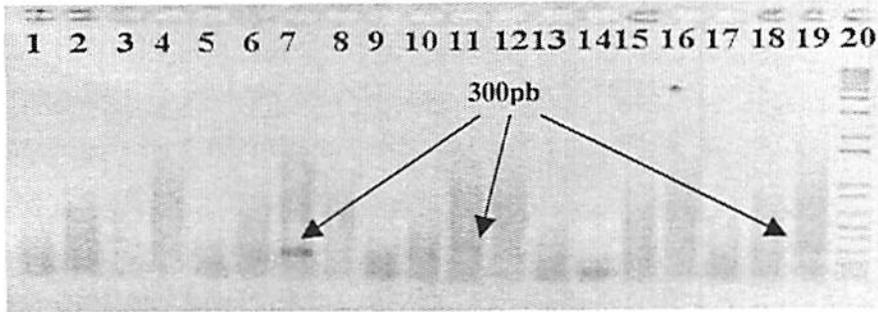


FIGURA 13. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 em amostras raízes de cafeeiros inoculados em condições de campo, sob cultivo com insumos reduzidos. **Colunas 1 a 19**, amostra de DNA em diluições de 1:1, 1:10 e 1:100; **coluna 20**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Por meio dos resultados dos amplicons com os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 nas raízes de cafeeiros do campo, descartando-se as amostras sem amplificação positiva e aquelas com amplificações inespecíficas (amplicons de 250pb), nota-se que espécies da família Gigasporaceae estão colonizando as raízes dos cafeeiros.

Assim como os amplicons das amostras do ensaio em casa de vegetação, o seqüenciamento dos amplicons de amostras provenientes do campo não foi possível pelas mesmas razões discutidas acima (item 4.2).

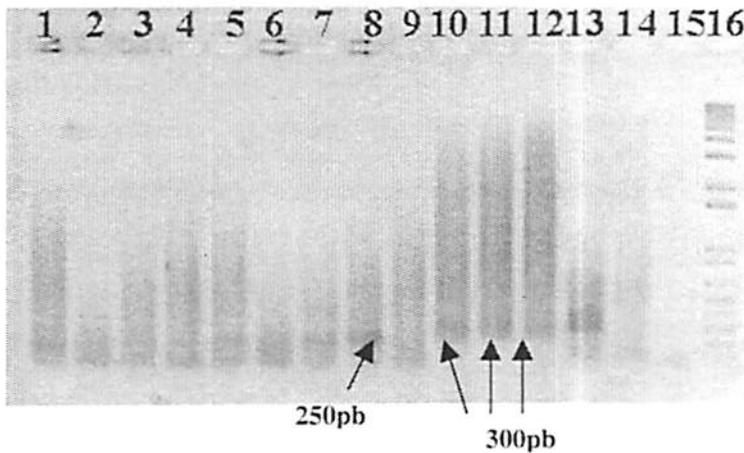


FIGURA 14. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 em amostras de esporos e de raízes de cafeeiros a campo sob cultivo com insumos reduzidos. **Colunas 1 a 5**, amostras de DNA de raízes de cafeeiros inoculados em diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000; **colunas 6 a 9**, raízes coletadas em área adjacente onde o cafeeiro não recebeu inóculo, como extrato cru, diluição 1:10, 1:100 e 1:1000; **coluna 10**, esporos de *Gigaspora margarita*; **coluna 11**, ERSC (DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização) de *G. margarita*; **coluna 12**, esporos de *Scuellospora heterogama*; **coluna 13**, ERSC de *S. heterogama*, **colunas 14 e 15**, amostra de água estéril; **coluna 16**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

A inoculação do cafeeiro a campo cultivado com baixos níveis de insumos aumentou a diversidade (número de espécies) no solo, sendo que as espécies inoculadas *G. margarita* e *Gl. clarum* estavam colonizando o cafeeiro, depois de 4 anos da inoculação. Utilizando PCR foi possível detectar FMAs da família Gigasporaceae nas raízes do cafeeiro a campo, entretanto, sem definição de espécie.

As técnicas tradicionais de avaliação morfológica dos esporos permitiram a identificação de FMAs no solo e a presença nas raízes do cafeeiro por meio do uso de cultura armadilha. Porém, a metodologia da cultura armadilha pode ter influência do efeito de seletividade para esporulação de determinadas espécies

pela cultura armadilha. Desse modo, a identificação por análise do material genético contornaria tal problema, porém, o uso de PCR-RFLP como ferramenta única não foi eficiente para detectar espécies de FMAs dentro de raízes em solo natural. A ineficiência dos iniciadores pode ser devido à diluição do DNA alvo, à influência dos compostos vegetais, à especificidade alta dos iniciadores que pode excluir da amplificação alguns organismos com pequenas variações genéticas ou ser devido à combinação entre as três circunstâncias. Avanços nas técnicas moleculares, adaptações e combinações de métodos poderão contribuir para o acesso à diversidade de FMAs colonizando raízes.

5 CONCLUSÕES

Os iniciadores de amplificação de DNA específicos ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1, GiITS2, VAACAU, VAGIGA e VANS1 não são eficientes em detectar FMAs nas raízes do cafeeiro.

Mudas de cafeeiro isentas de micorrizas, quando inoculadas no transplântio para solo com fungos indígenas, promovem aumento de esporos e riqueza de espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

Os fungos micorrízicos arbusculares introduzidos via inoculação não são detectados pela esporulação ou por PCR-RFLP em cafeeiros crescidos em casa de vegetação. Entretanto, a técnica molecular detecta a presença de *Scutellospora heterogama* nas suas raízes.

As espécies *G. margarita* e *Gl. clarum* inoculadas são capazes de colonizar os cafeeiros cultivados com insumos reduzidos a campo e permanecem no agrossistema depois de 4 anos da inoculação e implantação da lavoura.

Pelo uso de PCR foi possível detectar colonização por Gigasporaceae em raízes dos cafeeiros a campo:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KARAKI, G.; McMICHAEL, B.; ZAK, J. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, New York, v. 14, n. 4, p. 263-269, Aug. 2004.

ALMEIDA, R. T. Estudo sobre micorrizas vesículo-arbusculares no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 2, p. 210-212, jun. 1985.

AUGÉ, R. M.; SYLVIA, D. M.; PARK, S.; BUTTERY, B. R.; SAXTON, A. M.; MOORE, J. L.; CHO, K. Partitioning mycorrhizal influence on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 82, n. 4, p. 503-514, Apr. 2004.

AZEVEDO, L. C. B. **Micorrização do cafeeiro com diferentes inóculos e aplicação de técnicas moleculares no estudo da colonização.** 2003. 40 p. Monografia (Conclusão de Curso) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

BALOTA, E. L. **Flutuação sazonal de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no cafeeiro (*Coffea arabica*).** 1989. 145p. 1989. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S. Introdução de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo: I. Persistência e interação com espécies nativas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 20, n. 2, p. 217-223, maio/ago. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 1**, 10 de setembro de 2002. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA); Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2002.

BURROWS, R. L.; PFLEGER, F. L. Host responses to AMF from plots differing in plant diversity. *Plant Soil*, Dordrecht, v. 240, n. 1, p. 169-179, Mar. 2002.

CALDEIRA, S. F.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L. Associação de micorriza vesículo-arbuscular com café, limão-rosa e capim-gordura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, n. 3, p. 223-228, mar. 1983.

CARDOSO, E. J. B. N. Ocorrência de micorrizas em café. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 4, n. 2/4, p. 136-137, jan./dez. 1978.

COLOZZI FILHO, A. **Dinâmica populacional de fungos micorrízicos arbusculares no agrossistema cafeeiro e adubação verde com leguminosas**. 1999. 106 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E. L. **Micorrizas arbusculares: manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA-CNPSO, 1994.

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

COLOZZI FILHO, A.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas vesículo-arbusculares de cafeeiro. I: Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n. 3, p. 199-205, set./dez. 1986.

COLOZZI FILHO, A.; SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JUNIOR, J.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-transplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1397-1406, set. 1994.

DOUDS JUNIOR, D. D.; JANKE, R. R.; PETERS, S. E. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 43, n. 3/4, p. 325-335, Feb. 1993.

ESTRADA, M. G.; SANCHEZ-DE-PRAGER, M. Dependencia del cafe *Coffea arabica* L. var. Colombia por la micorriza vesículo-arbuscular. **Acta Agronomica**. Sede Palmira, v. 45, n. 1, p. 85-88, 1995.

FERNANDES, A. B. **Micorrizas vesículo-arbusculares em cafeeiro da região**

sul do Estado de Minas Gerais. 1987. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

FERNANDES, A. B.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiros da região sul do estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 12, p. 1489-1498, dez. 1989.

FLORENCE, M. L. D.; MIGUEL, A. E.; GUERRA NETO, E. G. GUERRA NETO, E. G. Efeito da inoculação do fungo micorrízico *Gigaspora margarita* no desenvolvimento de mudas de café, em substrato expurgado e não expurgado In: CONGRESSO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 11., 1984, Londrina. **Anais...** Rio de Janeiro/RJ: Instituto Brasileiro do Café, 1984. p. 168-170

FRANÇA, S. C. **Comunidades de fungos micorrizicos arbusculares nos manejos convencional e orgânicos de citros e suas interações com *Phytophthora parasitica***. 2004. 106 p. Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FRANKEN, P.; REQUENA, N. Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. **New-Phytologist**, Cambridge, v. 150, n. 3, p. 517-523, June 2001.

GADKAR, V.; RILLIG, M. C. Application of phi29 DNA polymerase mediated whole genome amplification on single spores of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 242, n. 1, p. 65-71, Jan. 2005.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-244, 1963.

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

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; STRANI, P.; AGNOLUCCI, M.; RINAUDO, V.; AVIO, L. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 616-624, Jan. 2003.

HABTE, M.; BITTENBENDER, H. C. Reactions of coffee to soil solution P concentration and arbuscular mycorrhizal. **Journal of South Pacific Agriculture**, Kagoshima, v. 6, n. 1, p. 29-34, 1999.

ISAYENKOV, S.; FESTER, T.; HAUSE, B. Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago trunculata* using real-time (RT) PCR. **Journal of Plant Physiology**, Jena v. 161, n. 12, p. 1379-1383, Dec. 2004.

ISHII, S.; LOYNACHAN, T. E. Rapid and reliable DNA extraction techniques from trypan-blue-stained mycorrhizal roots: comparison of two methods. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, p. 271-275, Aug. 2004.

JOHNSON, N. C.; COPELAND, P. J.; CROOKSTON, R. K.; PFLEGER, F. L. Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v. 84, n. 3, p. 387-390, May/June 1992.

KONRAD, M. L. F.; CASSIOLATO, A. M. R.; SILVEIRA, A. P. D. Efeito da colonização micorrízica no desenvolvimento de cafeeiro. In: FERTBIO 2002, Rio de Janeiro. **Fertbio: agricultura: bases ecológicas para o desenvolvimento social e econômico sustentado**, 2002. p. 103.

KUHN, G.; HIJRI, M.; SANDERS, I. R. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 414, n. 16865, p. 745-748, Dec. 2001.

LANFRANCO, L.; DELPERO, M.; BONFANTE, P. Intraporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 37-45, Jan. 1999.

LOPES, E. L. Micorrizas em cafeeiro. In: FUNDAÇÃO CARGELL. **Aspectos da nutrição do cafeeiro**. Campinas, 1985. p. 107-116.

LOPES, E. S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, N. C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in Central Sao Paulo State, Brazil. **Turrialba**, San José, v. 33, n. 4, p. 417-422, oct./dic. 1983a.

LOPES, E. S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A. M. L.; MORAES, F. R. P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 137-141, maio/ago. 1983b.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University, 1988. 179 p.

MILLNER, P. D.; MULBRY, W. W.; REYNOLDS, S. L. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, n. 6, p. 259-265, Apr. 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 471-491, Apr./June 1990.

MORTON, J. B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera, Archeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 1, p. 181-195, Jan./Feb. 2001.

O'CONNOR, P. J.; SMITH, S. E.; SMITH, E. A. Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in a semiarid herbland. **New Phytologist**, Cambridge, v. 154, n. 1, p. 209-218, Apr. 2002.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2816-2824, May 2003.

PALOWSKA, T. E.; TAYLOR, J. W. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 427, n. 6976, p. 733-737, Feb. 2004.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 55, n. 1, p. 158-160, 1970.

RAMOS, A. C.; MARTINS, M. A.; BATISTA, Q. R.; OLIVARES, F. L.;

FAÇANHA, A. R. Análise ultraestrutural, atividade H⁺-Pirofosfatásica e H⁺-ATPásica do tipo "P" e "V" de raízes de milho (*Zea mays* L.) colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares. In: FERTBIO 2002, Rio de Janeiro. **Fertbio: agricultura: bases ecológicas para o desenvolvimento social e econômico sustentado**, 2002. p. 175.

REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, n. 2, p. 73-80, Aug. 2000.

REDECKER, D.; HIJRI, I.; WIEMKEN, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. **Folia Geobotanica**, Praha, v. 38, n. 2, p. 113-124, 2003.

REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H. Four Hundred Million Year Old Vesicular Arbuscular Mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, n. 25, p. 11841-11843, Dec. 1994.

RENKER, C.; HEINRICHS, J.; KALDORF, M.; BUSCOT, F. Combinig nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi in roots from the field. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, n. 4, p. 191-198, Aug. 2003.

REQUENA, N.; MANN, P.; FRANKEN, P. A homologue of the cell cycle check point TOR2 from *Saccharomyces cerevisiae* exists in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Protoplasma**, Vienna, v. 212, n. 1/2, p. 89-98, 2000.

RICCI, M. S. F.; AQUINO, A. M.; SILVA, E. M. R.; PEREIRA, J. C.; REIS, V. M. **Transformações biológicas e microbiológicas ocorridas no solo de um cafezal convencional em conversão para orgânico**. EMBRAPA, 1999. 10 p. (Comunicado Técnico, n. 31).

SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 203-254.

SAGGIN JUNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O.; GUIMARAES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Colonização do cafeeiro por diferentes fungos micorrízicos: efeitos na formação das mudas e no crescimento em solo fumigado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 213-220, maio/ago. 1995.

SÁNCHEZ-BLANCO, M. J.; FERRÁNDEZ, T.; MORALES, M. A.; MORTE, A.; ALARCÓN, J. J. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 6, p. 675-682, June 2004.

SCHARDL, C. L.; CRAVEN, K. D. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p.2861-2873, November 2003.

SCHENK, N. C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: University of Florida, 1987. 242 p.

SCHÜBLER, A.; GEHRIG, H.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. **Mycology research**, New York, v. 105, n. 1, p. 5-15, Jan. 2001a.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, Dec. 2001b.

SHARROCK, R. A.; SINCLAIR, F. L.; GLIDDON, C.; RAO, I. M.; BARRIOS, E.; MUSTONEN, P. J.; SMITHSON, P.; JONES, D. L.; GODBOLD, D. L. A global assessment using PCR techniques of mycorrhizal fungal populations colonising *Tithonia diversifolia*. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, n. 2, p. 103-109, Apr. 2004.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 1, p. 291-295, Jan. 1992.

SIMON, L.; LÉVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4211-4215, Dec. 1993.

SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. 290 p.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n. 3, p. 207-211, set./dez. 1986.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI FILHO, A.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência de fungos micorrizicos e superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 53-60, jan./abr. 1993.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. New York: Academic press, 1997. 605 p.

SOUZA, F. A.; GANDOLFI, A.; VIJVEBERG, K.; KOWALCHUK, G. A. Phylogenetic evidence for parasexual recombination in arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. In: FERTBIO 2004, Lages-SC. **Fertbio 2004: avaliação das conquistas: base para estratégias futuras, 2004**. CD-ROM.

STUKENBROCK, E. H.; ROSENDAHL, S. Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 42, n. 1, p. 73-80, Jan. 2005.

TRINDADE, A. V.; SIQUEIRA, J. O.; ALMEIDA, F. P. Eficiência simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares em solo não fumigado, para mamoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 501-513, jul./set. 2000.

van der HEIJDEN, M. G. A.; KLIRONOMOS, J. N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, n. 6706, p. 69-72, Nov. 1998.

VANDENKOORNHUYSE, P.; LEYVAL, C.; BONNIN, I. High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 243-253, Aug. 2001.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **Protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, 1990. p. 315-322.

