

**COLONIZAÇÃO, ESPORULAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES MANTIDOS EM CULTURA**

**CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS**

**2008**

**CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS**

**COLONIZAÇÃO, ESPORULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
FENOTÍPICA E MOLECULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES MANTIDOS EM CULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

2008

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

Novais, Cândido Barreto de.

Colonização, esporulação e caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em cultura / Cândido Barreto de Novais. -- Lavras : UFLA, 2008.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Bibliografia.

1. Formononetina. 2. Esporulação. 3. PCR-DGGE. 4. Caracterização genotípica. 5. Caracterização fenotípica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS**

**COLONIZAÇÃO, ESPORULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
FENOTÍPICA E MOLECULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES MANTIDOS EM CULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de março de 2008

Dr. Francisco Adriano de Souza

Embrapa

Dra. Fernanda Covacevich

FIBA

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira  
UFLA  
(Orientador)

MINAS GERAIS – BRASIL

*Aos meus pais **Clodoaldo**<sup>†</sup> e **Maria** e aos meus irmãos por serem meu refúgio, meu alicerce, meu porto seguro.*

## **OFEREÇO**

*A minha irmã **Jackelyne Novais** e a meu querido amigo **Evandro Costa**, por todo apoio, carinho, respeito e cumplicidade.*

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto;

Ao professor José Oswaldo Siqueira, pela orientação, apoio e confiança durante o Mestrado;

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo;

A professora Fátima Maria de Souza Moreira pela colaboração e cordialidade durante todo o mestrado;

Ao pesquisador Francisco Adriano de Sousa pela co-orientação e por ter possibilitado o suporte para as realizações das análises moleculares na Embrapa Agrobiologia;

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, por toda amizade e colaboração para a execução deste trabalho;

Ao pesquisador Orivaldo José Saggin Júnior pela orientação na iniciação científica, pelo direcionamento, apoio, e principalmente pela amizade, oportunidades, confiança e consideração;

A pesquisadora Eliane Maria Ribeiro por todo apoio e carinho;

Ao técnico Itamar Garcia por toda amizade e colaboração;

Aos amigos da Embrapa Agrobiologia: Isabel, Fernanda Carvalho, Glória, Francys, Carol, Veralú, Paulo Ivan e em especial a Fernanda Covacevich por toda ajuda e atenção e a meus grandes amigos Wardsson e Gabriel por todo apoio que me deram;

Aos amigos Levy, Jonas, Fabiano Freire e Fabiano Duarte, companheiros de república, por toda convivência e amizade;

Aos amigos adquiridos durante o curso, Lucélia, Cléide, Silvia, André, Eduardo, Silvio, Douglas, Taís, Michele, Ligiane, Plínio, José Geraldo, Alice, Adriana,

Éderson, Yvonei, Pedro, Maíra, Paulo, Bruno Dias, Évio, Euzelina, Ênio, Rogério, Leandro, Paula, Valdete, Vitória, Jerusa, Sheila, Daniela, Maurício, Josinaldo, Cris, Daiane, Naty, Marlon, Gra, Gil, Alexandre, Douglas e Rossi;

As grandes amigas Krisle, Meire, Gláucia e Amanda, que foram minha família durante esse tempo, enchendo minha vida de alegria, sem dúvida alguma vocês são o mais precioso presente de Deus em minha vida, amo vocês;

Aos grandes amigos e amigas, Carlos (Bahiano), Carlos (Lambari), Paulo, Khalil, Hernandez, Alexandre, Afrânio, Wallace, Ronan, Roberto, Carla, Priscila, Prescila, Ana Amélia, Galzerano, Fernando e Alexandre;

Às pessoas mais importantes em minha vida, Renata e Michelle, por cada minuto de cumplicidade que construímos, e por todos os momentos felizes e também árduos nos quais vocês estiveram sempre ao meu lado, tenham a certeza de que amo muito vocês;

Aos grandes amigos, Rafaell, Leonardo e Wardsson por toda conviência e amizade durante e posterior a graduação;

A família 513, em especial ao Evandro, Patusso, Erick, Deivison, Cayrê, Mauricio, André, Rafael, Renato e Wilmar por ter me acolhido durante todo esse tempo, e principalmente por toda amizade e consideração;

Agradecimento especial a meu grande amigo Evandro que durante todos esses anos tem sido um grande irmão, com quem tenho compartilhado cada momento de minha vida, saiba que é imensa a minha consideração e admiração por você.

Agradecimento especial a meu amigo Paulo Boa Sorte por todo apoio, amizade e consideração;

Aos meus pais, Clodoaldo<sup>†</sup> e Maria, e a meus irmãos, Jackelyne, Karina, Cida, Célia, Neidelene, Reinaldo, Luiz e Renan por todo apoio, carinho e por serem responsáveis por tudo que sou, amo vocês;

A minha irmã Jackelyne, por sempre acreditar em mim, me apoiando e dando suporte para cada etapa da minha vida, por proporcionar-me entusiasmo e confiança. Com certeza irei compartilhar contigo cada conquista, amo você;

A Deus por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho e por todas as oportunidades de minha vida;

MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....	4
2.2 Colonização e esporulação em vasos de cultivo.....	5
2.3 Identificação e classificação do FMAs.....	8
2.4 Emprego de técnicas moleculares em estudos de FMAs.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 A Multiplicação dos FMAs.....	20
3.2 Caracterização morfológica dos isolados.....	23
3.3 Caracterização molecular dos isolados.....	24
3.4 Análises.....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1 Esporulação dos isolados de FMAs .....	29
4.2 Caracterização morfológica dos isolados de FMAs.....	33
4.2.1 DCS 02 e 30-Isolados de <i>Acaulospora delicata</i> (Walker, Pfeiffer e Bloss, 1986) .....	37
4.2.2 DCS 23 – <i>Acaulospora morrowiae</i> (Spain & Schenck).....	39
4.2.3 DCS 03 - <i>Kuklospora colombiana</i> (Spain & Schenck) Oehl & Sieverding.....	40
4.2.4 DCS 11, 12 e 13 - <i>Glomus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann, 1977) ..	43
4.2.5 DCS 09 e 10 - <i>Glomus clarum</i> (Nicolson & Schenck, 1979) .....	45
4.2.6 DCS 06, 24, 31 e 32 - Isolados de <i>Glomus diaphanum</i> (Morton & Walker, 1984).....	47

4.2.7 DCS 08 - <i>Gigaspora margarita</i> (Becker & Hall, 1976).....	49
4.2.8 DCS 22 - <i>Gigaspora albida</i> (Schenck & Smith, 1982).....	51
4.2.9 DCS 05 - <i>Gigaspora gigantea</i> (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe, 1974.....	52
4.2.10 DCS 19- <i>Scutellospora heterogama</i> (Koske & Walker, 1985).....	54
4.2.11 DCS 18- <i>Scutellospora gregária</i> (Schenck & Nicolson) Walker & Sanders (1986).....	14
4.2.12 DCS 27- <i>Scutellospora rubra</i> (Stürmer & Morton, 1999).....	57
4.3 Análise de PCR-DGGE.....	58
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## RESUMO

NOVAIS, Cândido Barreto de. **Colonização, esporulação e caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em cultura**. 2008. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do isoflavonóide formononetina na colonização e esporulação, e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente por meio de PCR-DGGE 36 isolados de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em vasos de cultivo na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. O estudo foi conduzido em vasos de cultivo (500g) com *Brachiaria decumbens* em mistura desinfestada de solo e areia (2:1). O efeito da formononetina foi avaliado pela aplicação de 1mg por vaso de Mycoform<sup>TM</sup> (produto comercial da PHC, Inc) ao solo por ocasião da repicagem das plantas e inoculação e aos dois meses de crescimento, em comparação a um tratamento sem a aplicação do produto. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A colonização das raízes e a densidade de esporos em amostras coletadas diretamente dos vasos foram avaliadas após cinco meses de crescimento. A caracterização fenotípica e molecular foi conduzida para os isolados que foram capazes de multiplicar. A análise molecular foi feita com base na discriminação específica da região V9 do 18S rDNA. A colonização e esporulação variou muito dentre e entre as espécies e os isolados puderam ser agrupados em aqueles que esporularam abundantemente, moderadamente e fracamente. Treze isolados demonstraram sucesso na multiplicação e 31% destes isolados responderam a aplicação de Mycoform<sup>TM</sup> aumentando a taxa de colonização em até 27% e 54% tiveram sua esporulação aumentada em até 54%. A caracterização morfológica dos esporos está de acordo com as descrições originais das respectivas espécies. A avaliação molecular por PCR-DGGE também permitiu a diferenciação das espécies e não revelou qualquer diferença entre os isolados da mesma espécie corroborando com a identificação fenotípica.

---

<sup>1</sup> Orientador: José Oswaldo Siqueira – UFLA

## ABSTRACT

NOVAIS, Cândido Barreto de. **Colonization, sporulation and phenotypic and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungi kept in host culture.** 2008. 73p. Dissertation (Master degree in Soil Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

The aim of this study was to evaluate the effect of the isoflavonoid formononetin on the colonization and sporulation, and characterize phenotypically and genotypically through PCR-DGGE 36 arbuscular mycorrhizal fungi isolates from the collection of Soil Microbiology Laboratory, Department of Soil Science of Federal Lavras University, Minas Gerais, Brazil. The study was conducted in pots (500g) with *Brachiaria decumbens* in a disinfested soil/sand mixture (2:1). The effect of formononetin was evaluated through the application of 1 mg of Mycoform<sup>TM</sup> (commercial product of PHC, Inc) into the soil in each pot at planting and inoculation and after two months of growth, comparing with a treatment without the product. The treatments were laid out in a completely random design with five replicates. The root colonization and the spore density of samples collected directly from the pots were evaluated after five months of growth. Phenotypic and molecular characterization was conducted for the isolates that were able to multiply. The molecular analysis was made through the discrimination of the specific V9 region in the 18S rDNA. Colonization and sporulation varied a lot, both between and within the species and the isolates could be grouped on clusters that sporulated abundantly, moderately and sparsely. Thirteen isolates showed successful multiplication, 31% of these isolates responded to the application of Mycoform<sup>TM</sup>, increasing the colonization rate up to 27% and 54% had the sporulation increased up to 54%. The morphological characterization of the spores is in accord with the original descriptions of the species. The molecular evaluation by PCR-DGGE also allowed the differentiation of the species and did not reveal any differences between the isolates of the same species, in agreement with the phenotypic characterization.

---

<sup>1</sup>Advisor: José Oswaldo Siqueira – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

Em decorrência da importância da biota e dos processos biológicos para a produção agrícola e da necessidade de se reabilitar ecossistemas degradados pela atividade humana, há grande interesse em estudos sobre a biologia e os efeitos benéficos da inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), no crescimento e desenvolvimento de plantas. Entre os trabalhos pioneiros da micorrizologia moderna se destacam os estudos desenvolvidos por Mosse, Gerdeman e Nicolson nas décadas de 60 e 70, atualmente, numerosos trabalhos tem sido desenvolvidos em vários países. No entanto, grande parte destes tem sido redundantes, pois têm abordado apenas aspectos benéficos destes fungos no crescimento de plantas, havendo uma grande carência de estudos sobre caracterização de estirpes, e de ensaios comparativos de diferentes isolados geográficos, bem como dos aspectos filogenéticos e da natureza simbiótica destes organismos. Isto pode ser atribuído à impossibilidade de crescimento desses fungos em meios de cultura na ausência de raízes metabolicamente ativas e a não caracterização da fase sexuada em seus ciclos de vida o que dificulta, em muitas pesquisas com esse grupo de fungos. Com isso, a identificação e classificação destes fungos têm sido baseadas, quase que exclusivamente, nas características morfológicas e estruturais de seus esporos vegetativos (Morton & Benny, 1990). Entretanto, a identificação morfológica não possibilita uma fácil distinção das diferentes espécies de FMAs, e durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares não permite a distinção de espécies em comunidades complexas. Além disso, a identificação morfológica pode ser influenciada por condições locais e pela diferença de maturidade dos esporos introduzindo problemas para identificação precisa de FMAs e para a otimização da simbiose em campo, comprometendo assim, o desenvolvimento de estudos básicos, tais

como àqueles ligados à competição, sobrevivência, dispersão, e eficiência, quando executados em comunidades complexas, como as encontradas em solos tropicais (Salles & Souza, 1998).

Existe grande dificuldade na obtenção de inóculo básico de boa qualidade e em quantidade suficiente para estudos de identificação e trabalhos de pesquisa sobre fisiologia, eficiência simbiótica e dependência micorrízica, e principalmente para o desenvolvimento de inoculante comercial. A disponibilidade de diferentes espécies de FMAs em coleções de cultura é importante para o desenvolvimento tecnológico e para o estudo da biologia e aplicação dos FMAs. As estirpes são a base para o desenvolvimento de estudos básicos e aplicados. As dificuldades para multiplicação em grande quantidade e manutenção das culturas têm limitado a diversidade nas coleções, mesmo em vaso de cultivo (Juge et al., 2002). Espécies cuja multiplicação é tida como dominada, às vezes mostram problemas de multiplicação, havendo necessidade de estudos sobre os fatores que controlam a multiplicação destes fungos.

A descoberta de metabólitos vegetais estimulantes dos FMAs e da colonização micorrízica das plantas, como o isoflavonóide formononetina, que estimula o crescimento de hifas na fase de pré-infecção facilitando a penetração e colonização das raízes (Siqueira et al., 1991; Nair et al., 1991; Davies et al., 1999; Koide et al., 1999) pode representar uma alternativa para melhorar a multiplicação de FMAs em vaso de cultivo e possibilitar a multiplicação de diferentes espécies destes fungos.

O interesse pela taxonomia morfológica tem diminuído devido às dificuldades de compreensão das estruturas subcelulares, o que exige bom conhecimento taxonômico, e pelos avanços na aplicação de técnicas moleculares, havendo necessidade de aperfeiçoamento de métodos de caracterização e diferenciação de espécies rápidos e confiáveis, que despertem o interesse dos pesquisadores, pois à medida que os estudos com FMAs estão

avançando fica cada vez mais evidente a importância da filogenia para o entendimento destes fungos.

Com o advento dos métodos baseados nas moléculas de DNA e RNA, principalmente aqueles baseados no emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual permite a amplificação do DNA a partir de uma pequena amostra, tornou-se possível a identificação de FMAs tanto em vida livre no solo como também durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares (Helgason et al., 1998; Tuinen et al., 1998a; Kjoller & Rosendahl, 2000; Kowalchuk et al., 2002).

Assim, o desenvolvimento de técnicas para a identificação taxonômica, associadas a novas ferramentas da biologia molecular são pontos de grande importância para sustentar às pesquisas com FMAs no país, que é um grande centro de biodiversidade destes fungos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do isoflavonóide estimulante das micorrizas (formononetina) na colonização e esporulação, e caracterizar fenotipicamente e por meio de PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - Eletroforese em gel com gradiente de denaturação) 36 isolados de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em vasos de cultivo na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)**

A micorriza arbuscular é uma simbiose mutualística entre raízes da maioria das plantas e fungos do filo Glomeromycota (Schüßler et al., 2001a). Esta simbiose se caracteriza pela penetração inter e intracelular das células do córtex radicular e formação de estruturas intracelulares denominadas arbúsculos (Douds & Millner, 1999). É uma das simbioses mais importantes entre microrganismos e plantas (Smith & Read, 1997) e é tida como a mais abundante na natureza, ocorrendo na maioria das plantas, inclusive inúmeras espécies de grande valor econômico e ecológico, e na maioria dos ecossistemas vegetais, apresentando ampla distribuição geográfica ocorrendo desde regiões polares até os tropicais úmidos ou desertos. A maioria das angiospermas, pteridófitas e numerosas briófitas formam micorrizas arbusculares (Trappe, 1987). Isto se deve ao fato dos FMAs terem sido fundamentais para o estabelecimento das plantas no ambiente terrestre (Pyrozynski & Malloch, 1975; Simon et al., 1993; Simon, 1996). O registro fóssil mais antigo de esporos de FMAs data de 460 milhões de anos, com base nesse registro a origem dos FMAs foi estimada para 600 milhões de anos (Redecker et al., 2000), no entanto, existem outras estimativas que datam de 1200 a 1400 anos atrás (Heckman et al., 2001).

Os FMAs são componentes importantes dos sistemas vegetais terrestres, apresentando também grande potencial para produção agrícola. Esses organismos podem favorecer o crescimento, e a capacidade reprodutiva das plantas (Lu & Koide, 1994), bem como tolerância ao estresse hídrico (Gupta & Kumar, 2000) e resistência a doenças (Declerck et al., 2002), competição inter e intra-específica (Fitter & Garbaye, 1994). O benefício principal para a planta hospedeira nesta simbiose é o aumento da absorção de nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo como o fósforo, isto devido a um aumento de sua

capacidade em explorar o solo, tanto em área de superfície de contato quanto em volume (Moreira & Siqueira, 2006; Jakobsen, 1999). Estes fungos também interagem com outros organismos do solo, tais como rizóbios envolvidos em importantes ciclos de nutrientes, desta forma, a fixação biológica de nitrogênio por leguminosas pode ser aumentada pela co-infecção com FMAs (Xavier & Germida, 2002).

## **2.2 Colonização e esporulação em vasos de cultivo**

Os FMAs são biotróficos obrigatórios, dependentes de raiz metabolicamente ativa para o fornecimento de carboidratos e para completar seus ciclos de vida (Siqueira et al., 1985). Os esporos são unidades biológicas em estado de quiescência que precisam ser ativados para desencadear os processos normais da biologia celular e as funções metabólicas que sustentam sua germinação e crescimento subsequente da fase filamentosa (Moreira & Siqueira, 2006). Eles persistem no solo e germinam espontaneamente usando suas próprias reservas, que são metabolizadas pelo metabolismo catabólico. Entretanto, o crescimento da hifa é limitado pela utilização destas baixas quantias de carbono armazenado (Bécard & Piché, 1989; Bago et al., 1999; Bago et al., 2000), assim, após certo período de crescimento, começa a formar septos na hifa a partir do ápice, o citoplasma recua e o esporo entra em dormência novamente, evidenciando sua necessidade obrigatória às células vivas do hospedeiro. Contudo, em algumas espécies, o esporo contém reservas suficientes para realizar múltiplas germinações aumentando as chances de encontrar um hospedeiro apropriado (Koske, 1981). Segundo Moreira & Siqueira (2006) não se conhece o mecanismo exato pelo qual esses esporos são ativados a germinar. No entanto, já se tem evidências de que antes da colonização ocorre uma troca de sinais moleculares, “o fungo reconhece seu hospedeiro, e lhe responde de modo positivo em potencial, produzindo e

diferenciando seu micélio assimbiótico, mesmo sem o contato físico com o hospedeiro. Do mesmo modo, o fungo é capaz de produzir sinais difusivos que elicitam expressão específica nas raízes, como o gene regulado MtENOD11, que atua na síntese da parede celular e pode facilitar a penetração do fungo (Kosuta et al., 2003)”. Desta forma, indicando a existência de esporos “receptores responsivos” às alterações na composição química do ambiente (Giovanetti & Sbrana, 1998; Bécard et al., 2004; Harrison, 2005).

Várias substâncias que estimulam os propágulos dos FMAs têm sido encontradas nos exsudados das raízes de plantas suscetíveis à micorrização. Contudo, os exsudados de plantas deficientes em fósforo são mais estimulantes para os fungos micorrízicos que aqueles de plantas bem supridas em P, indicando a presença de substâncias estimulantes nas plantas deficientes, que serão mais suscetíveis à micorrização. Neste sentido, foi identificado a partir de raízes de trevo cultivadas em condições de deficiência de fósforo, o isoflavonóide formononetina (7- hidróxi, 4'-metóxi isoflavona) (Nair et al., 1991), que devido a sua baixa solubilidade em água é de difícil aplicação. No entanto, com o aperfeiçoamento da rota de síntese foram desenvolvidas as formulações Myconate<sup>TM</sup> e Mycoform<sup>TM</sup> que são mais apropriadas a aplicação da formononetina em larga escala no solo (Nair et al., 1991).

Com a produção sintética da formononetina pôde-se observar o seu desempenho na comunicação e sinalização nas relações entre plantas e microrganismos, assim, através de estudos realizados *in vitro* verificou sua atuação como fator químico ativo capaz de estimular o crescimento assimbiótico de esporos de FMAs, crescimento de hifas na fase de pré-infecção ou indução do desenvolvimento de apressório e/ou formação de arbúsculo (Davies et al., 1999; Koide et al., 1999; Nair et al., 1997; Siqueira et al., 1991; Nair et al., 1991). Da mesma forma, Davies et al (2005) estudando a influência do flavonóide formononetina na atividade micorrízica e na produtividade de batata, relatou ter

encontrado um grande aumento na esporulação de fungos micorrízicos indígenas quando aplicado a formononetina, expressando ainda mais a importância desse insumo biológico em aumentar a contribuição dos FMAs na produção agrícola.

A fase extra-radicular da simbiose está representada pela rede de micélio que cresce no solo, este micélio cresce simultaneamente à colonização intraradicular, funcionando como um sistema radicular complementar, muito efetivo na absorção de nutrientes e água além da zona de esgotamento do solo (Barea, 2000). É na fase extra-radicular que é produzido a maioria dos esporos, isoladamente ou em esporocarpos. Em algumas espécies, os esporos são também produzidos no interior das raízes como se dá em *Glomus intraradices*. Os estádios fenotípicos do ciclo da simbiose iniciam-se com a germinação dos esporos e são concluídos com a produção de novos esporos que garantem a sobrevivência do fungo. Verifica-se que para cada estágio ocorrem estímulos, respostas e mecanismos seqüenciados e fases distintas de controle específicos na planta (Moreira & Siqueira, 2006).

Os recentes progressos nos métodos de identificação e quantificação dos FMAs nos solos e dentro das raízes das plantas tem permitido esclarecer os fatores que influenciam sua distribuição e persistência no solo. O desenvolvimento da associação micorrízica varia com o pH, temperatura, tipo e profundidade do solo, vegetação e grau de perturbação do sistema (Wang et al., 1993), umidade, matéria orgânica do solo, práticas agrícolas como o uso de agroquímicos ou rotação de cultura (Jonson & Pflieger, 1993). A esporulação não tem influência direta do hospedeiro, mas tem relação com o grau de colonização, extensão de raízes e idade (ciclo) da simbiose e parece ser regulada pelo estado de senescência da planta (Moreira & Siqueira, 2006).

### **2.3 Identificação e classificação do FMAs**

A identificação das espécies de FMAs tem sido baseada na morfologia de seus esporos (Morton & Benny, 1990) que são as estruturas fúngicas que apresentam as melhores características para distinção de espécies, tais como a cor, forma, estruturas e ornamentações de paredes externas (Schenck & Perez, 1988). Entretanto, a caracterização morfológica pode ser influenciada por condições locais, tais como, maturidade e estado de conservação dos esporos. Dificuldade é somada pela ausência de chaves taxonômicas para espécies, assim como, por ter poucas informações detalhadas sobre as espécies e poucas fotos disponíveis no site do INVAM, e por geralmente os esporos coletados diretamente do campo estarem normalmente em baixa quantidade, parasitados e, em muitos casos, não possuem todas as estruturas subcelulares intactas que permitem uma identificação das espécies.

A precisão das identificações morfológicas é muito dependente do nível de conhecimento taxonômico do técnico responsável pela análise, cada um dos gêneros dos FMAs está definido por critérios relacionados com a forma em que se originam os esporos, sendo assim, cada um deles possui uma formação especial de esporos, e apresentam diferente morfologia nos pontos de conexão das hifas de sustentação ou de formação. O Quadro 1 apresenta as estruturas típicas dos esporos dos principais gêneros e algumas de suas características.

Os tipos e a organização das diversas estruturas subcelulares dos esporos de FMAs é a base para a identificação morfológica deste grupo de fungos. Walker (1983) propôs uma terminologia conceituando essas estruturas de “paredes” que foram definidas por fenótipos estáticos, como parede laminar, evanescente, unitária e membranosa, foram também definidas as paredes amorfa (Morton, 1986), expandida (Berch & Koske, 1986), coriácea (Walker, 1986) e parede entalhada (Koske & Gemman, 1995).

QUADRO 1 Esquema das estruturas típicas dos esporos dos gêneros dos FMAs e suas principais características.

Estrutura típica dos esporos	Características
 <p>* </p>	<p>Gênero <i>Glomus</i> (Tul. &amp; C. Tul)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Os esporos formam-se terminalmente ou intercalado numa hifa fértil, cilíndrica ou alargada;</li> <li>Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>Parede do esporo (PE) com várias camadas (2 a 4) com fenótipos variáveis;</li> <li>Esporos produzidos isolados, em agregados ou esporocarpos;</li> <li>Germinação pelo lúmen da hifa suspensora ou parede do esporo;</li> </ul> </li> <li>Presença de uma camada na PE com várias subcamadas (lâminas) continua com a parede da hifa suspensora;</li> <li>Possui 104 espécies descritas</li> </ol>
 <p>* </p>	<p>Gênero <i>Acaulospora</i> (Gerd. &amp; Trappe emend. S.M. Berch)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Os esporos formam-se lateralmente no pescoço de um sáculo esporífero;</li> <li>Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>Parede do esporo com duas ou três camadas</li> <li>Parede germinativa: sempre 2, com duas camadas cada;</li> <li>Placa de germinação;</li> </ul> </li> <li>Esporos com ou sem ornamentação;</li> <li>Possui 33 espécies descritas.</li> </ol>
 <p>* </p>	<p>Gênero <i>Entrofospora</i> (Spain e Schenck)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Os esporos se desenvolvem dentro do pescoço de um sáculo esporífero e originam-se do conteúdo do sáculo.</li> <li>Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>Paredes do esporo com duas camadas.</li> </ul> </li> <li>O sáculo esporífero origina-se terminalmente ou intercaladamente numa hifa extraradicular.</li> <li>Os esporos são encontrados isoladamente no solo.</li> <li>Os esporos possuem duas cicatrizes.</li> </ol>
 <p>* </p>	<p>Gênero <i>Gigaspora</i> (Gerd. &amp; Trappe)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Esporos sem ornamentação;</li> <li>Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>Parede do esporo com duas camadas (L1 e L2);</li> <li>Parede germinativa verrugosa ou nodosa</li> </ul> </li> <li>Células auxiliares "equinuladas";</li> <li>possui 9 espécies descritas</li> <li>As espécies conhecidas apresentam grandes semelhanças morfológicas, as diferenças residem na cor e tamanho dos esporos (Bentivenga &amp; Morton, 1995)</li> </ol>
 <p>* </p>	<p>Gênero <i>Scutellospora</i> (C. Walker &amp; F.E. Sanders)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Esporos com ou sem ornamentação;</li> <li>Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>Parede do esporo com duas camadas;</li> <li>Parede germinativa- 1 a 3, com duas camadas cada;</li> <li>Escudo de germinação;</li> </ul> </li> <li>Células auxiliares "lobadas";</li> <li>Possui 33 espécies descritas</li> <li>As diferenças entre espécies residem no fenótipo das camadas da parede do esporo (cor, ornamentação, etc.);</li> </ol>

...continua...

QUADRO 1, Cont.

	<p style="text-align: center;">Gênero <i>Appendicispora</i> (Spain, Oehl &amp; Sieverd)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esporos dimorficos, esporos são formados semelhantemente aos de <i>Acaulospora</i> e de <i>Glomus</i>;</li> <li>2. Esporos do tipo Acaulosporoides se desenvolvem a partir de um "pedicel" formado no pescoço do sáculo esporífero.</li> <li>3. Esporos do tipo Glomoides se desenvolvem terminalmente a partir de qualquer hifa desenvolvida da parede do "pedicel".</li> <li>4. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Parede do esporo com três camadas</li> <li>. Duas paredes germinativas uma com duas camadas firmemente aderidas e outra com três camadas;</li> <li>. Germinação pelo tubo germinativo emergindo-se da segunda parede germinativa interna e saindo pelo poro do "pedicel". Também foi encontrado estruturas germinativas formadas entre a primeira e a segunda parede germinativa, diferente das estruturas germinativas de <i>Acaulospora</i>;</li> </ul> </li> <li>4. Possui 5 espécies descritas.</li> </ol>
	<p style="text-align: center;">Gênero <i>Archaeospora</i> (Morton &amp; Redecker)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esporos dimorficos, esporos são formados semelhantemente aos de <i>Acaulospora</i> e de <i>Glomus</i>;</li> <li>2. Esporos do tipo Acaulosporoides se desenvolvem diretamente do pescoço do sáculo esporífero.</li> <li>3. Esporos do tipo Glomoides se desenvolvem intercaladamente em uma hifa fértil.</li> <li>2. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Uma parede do esporo e uma parede germinativa interna, consistindo em duas ou três camadas.</li> <li>. Germinação através de um tubo germinativo emergindo de uma estrutura de germinação irregular;</li> </ul> </li> <li>4. Possui 1 espécie descrita.</li> </ol>
 <p style="text-align: left; margin-left: 5px;">*</p>	<p style="text-align: center;">Gênero <i>Diversispora</i> (Walker &amp; Schuessler)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Os esporos se desenvolvem de uma hifa de sustentação semelhantemente aos esporos do gênero <i>Glomus</i>.</li> <li>2. Os esporos são morfologicamente semelhantes aos esporos de <i>Glomus</i> sp. diferindo na micorriza, pois <i>Diversispora</i> não forma vesículas e cora menos com azul de tripano.</li> <li>4. Possui 1 espécie descrita.</li> </ol>
	<p style="text-align: center;">Gênero <i>Intraspora</i> (Sieverd. &amp; Toro) Oehl &amp; Sieverd</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Os esporos se desenvolvem dentro do pescoço de um sáculo esporífero a uma certa distância do sáculo e originam-se do conteúdo do sáculo;</li> <li>2. São globosos a subglobosos e frequentemente piriformes;</li> <li>3. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Parede do esporo composta por duas camadas;</li> <li>. Parede germinativa interna semiflexível e finamente laminada</li> </ul> </li> <li>4. Os esporos são encontrados isolados no solo;</li> <li>5. Os esporos possuem duas cicatrizes.</li> <li>6. Possui 01 espécie descrita.</li> </ol>
	<p style="text-align: center;">Gênero <i>Pacispora</i> (Oehl &amp; Sieverding, 2004)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Os esporos formam-se terminalmente numa hifa esporogênica semelhantemente aos esporos do gênero <i>Glomus</i>.</li> <li>3. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Parede do esporo composta por 3 camadas;</li> <li>. Parede germinativa interna com três camadas;</li> <li>. Na superfície da camada 1 da parede germinativa há a formação de um escudo germinativo, do qual emerge-se o tubo germinativo.</li> </ul> </li> <li>4. Os esporos são encontrados isolados no solo;</li> <li>5. Os esporos possuem duas cicatrizes.</li> <li>6. Possui 01 espécie descrita.</li> </ol>

...continua...

QUADRO 1, Cont.

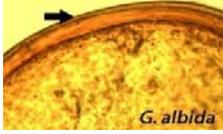
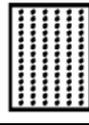
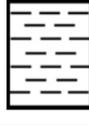
 <p>*</p>	<p>Gênero <i>Paraglomus</i> (Tul. &amp; C. Tul)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esporos formam-se terminalmente numa hifa fértil semelhantemente aos esporos de <i>Glomus</i> sp.;</li> <li>2. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Parede do esporo com duas ou três camadas contínuas com a parede da hifa de sustentação;</li> <li>. Germinação pelo lúmen da hifa suspensora ou parede do esporo;</li> </ul> </li> <li>3. Esporos morfologicamente semelhantes aos esporos de <i>Glomus</i> sp. diferindo-se nas propriedades de suas micorrizas;</li> <li>4. Possui 3 espécies descritas</li> </ol>
	<p>Gênero <i>Kuklospora</i> (Spain e Schenck)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Os esporos se desenvolvem dentro do pescoço de um sáculo esporífero e originam-se do conteúdo do sáculo;</li> <li>2. Organização subcelular: <ul style="list-style-type: none"> <li>. Parede do esporos com três camadas;</li> <li>. Duas paredes germinativas;</li> <li>. Presença de uma camada "beaded" na parede germinativa;</li> </ul> </li> <li>3. O sáculo esporífero origina-se terminalmente ou intercaladamente numa hifa extraradicular;</li> <li>2. Os esporos são encontrados isoladamente no solo;</li> <li>4. Os esporos possuem duas cicatrizes;</li> <li>5. Possui duas espécies descritas.</li> </ol>

\*Esquemas retirados do site [http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/Plant\\_Interactions/Mycorrhizas/Arbuscular/sporeTypes.html](http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/Plant_Interactions/Mycorrhizas/Arbuscular/sporeTypes.html)

De acordo com a terminologia de Walker (1983) os esporos são formados por “grupos de paredes” e as espécies identificadas através do estudo dos esporos e da função de sua parede e grupos de camadas que a compõe, foram desenvolvidos uma série de representações esquemáticas (murogramas) simulando as possíveis características das paredes dos esporos (Quadro 2).

Posteriormente, Berch (1987) propôs que as estruturas discretas dos esporos fossem “camadas” que faziam parte de uma “parede do esporo”, tratando as estruturas subcelulares de forma equivalentes, assim, o termo “grupo de paredes” de Walker foi substituído por “parede”, parede do esporo e parede interna, por consistirem estruturas de origem independente nos esporos e por serem identificáveis por sua posição durante a ontogenia dos esporos (Franke & Morton, 1994). O termo “parede” de Walker foi substituído por “camada”, que é definida como uma estrutura fenotipicamente discreta que se origina dentro da parede do esporo e da parede interna.

QUADRO 2 Representação esquemática das diferentes “paredes” que compõe o “grupo de paredes” de esporos de FMAs e suas principais características (Walker, 1983).

Tipos de Paredes (Walker, 1983)	Murograma	Foto
<p><b>Parede Unitária</b> Parede rígida, com uma camada apenas, claramente distinta das outras e consistente entre esporos no mesmo estágio de maturidade dentro de uma espécie.</p>		 <p><i>G. albida</i></p>
<p><b>Parede Laminada</b> Parede rígida formada por várias camadas que vão sendo depositadas à medida que o esporo amadurece.</p>		 <p><i>G. margarita</i></p>
<p><b>Parede Evanescente</b> Uma parede laminada ou unitária que vai se quebrando e cai à medida que o esporo amadurece.</p>		 <p><i>G. etunicatum</i></p>
<p><b>Parede Membranosa</b> Parede muito fina, geralmente sem cor que freqüentemente fica enrugada e colapsa em soluções hipertônica. Sendo flexível, ela geralmente não se quebra quando o esporo é quebrado.</p>		 <p><i>A. delicata</i></p>
<p><b>Parede Coriácea</b> Parede sem cor que é mais espessa que a parede membranosa, mas também é flexível e desta forma difícil de se quebrar. Tem uma aparência coriácea.</p>		 <p><i>S. rubra</i></p>
<p><b>Parede Amorfa</b> Parede sem cor dentro dos esporos que é bastante plástica quando se aplica uma pressão para quebrar os esporos em PVLG. No Melzer torna-se vermelho púrpura (pode ser bem escuro).</p>		 <p><i>S. rubra</i></p>
<p><b>Parede Germinativa</b> Parede mais interna que ocorre apenas nos esporos de <i>Gigaspora</i>. Fenótipo similar as camadas de uma parede laminada, mas possui protuberâncias em forma de verrugas ou papilas antes da germinação.</p>		 <p><i>G. margarita</i></p>
<p><b>Parede Expansiva</b> Parede unitária que expande e produz estriações em PVLG.</p>		<p>Foto disponível no site: <a href="http://invam.caf.wvu.edu/">http://invam.caf.wvu.edu/</a></p>

“Embora as espécies de FMAs apresentem diferenças morfológicas, essas diferenças não são sempre evidentes, demandando tempo e conhecimento taxonômico do técnico responsável pela identificação, além disso é difícil interpretar as características fenotípicas dos esporos, tais como: tamanho, forma, cor e aparência, forma e comprimento da hifa de sustentação, ornamentação, estrutura e espessura da parede. No caso da composição das paredes, por exemplo, geralmente se enrugam, dobram ou sobrepõem-se, separam-se facilmente, ou permanecem aderidas entre si, o que dificulta sua caracterização” (Silva & Colozzi Filho, 2007).

As primeiras tentativas de classificar os FMAs foram feitas no final do século XIX e início do século XX, incluindo-os inicialmente na família Endogonaceae, dentro do Filo Zigomycota, devido à semelhança de seus esporos com os de Zigomycetos (Gerdemann & Trappe, 1974). Nos últimos anos a sistemática dos FMAs vem sofrendo inúmeras modificações, devido principalmente à incorporação de estudos moleculares na filogenia destes fungos. Segundo Morton & Benny (1990), aproximadamente 150 espécies de FMAs conhecidas estão incluídas na ordem Glomerales da classe zigomycota, distribuídos em seis gêneros e três famílias: *Gigaspora* e *Scutellospora* (Família Gigasporaceae), *Glomus* e *Sclerocystis* (Família Glomaceae) e *Acaulospora* e *Entrophospora* (Família Acaulosporaceae).

A utilização de técnicas de biologia molecular têm superado as dificuldades da identificação *in-situ* dos FMAs, neste sentido, foram desenvolvidas várias estratégias baseadas em PCR, amplificando genes de rDNA para detectar FMAs em DNA extraído de raízes, solo, ou esporos (Helgason et al., 1998; Tuinen et al., 1998b; Kjoller & Rosendahl, 2000; Kowalchuk et al., 2002; de Souza et al., 2004; Ma et al., 2005; Renker et al., 2005). Tais estratégias permitem detectar esses fungos em todas as fases do ciclo de vida facilitando a compreensão da biologia e ecologia desse grupo de fungos.

O uso de PCR-DGGE na identificação de espécies de FMAs tem representado um avanço na pesquisa com os FMAs, uma vez que abre possibilidades para usá-la de maneira rápida e segura para detecção de contaminação em vasos de cultivos e para identificação das espécies de FMAs. Entretanto, essa estratégia para a identificação de FMA é dependente da disponibilidade de padrões de bandas conhecidos de todas as espécies a serem identificadas.

Morton & Redecker (2001), considerando caracteres morfológicos e incluindo pela primeira vez evidências moleculares, propuseram duas novas famílias, que apresentam-se como basais na árvore filogenética dos FMAs: a primeira é a *Archaeosporaceae*, representada pelo gênero *Archaeospora* e que inclui espécies anteriormente consideradas como *Acaulospora* e *Glomus* (*Glomus leptotichum*), e a segunda *Paraglomaceae* representada pelo gênero *Paraglomus* e que inclui espécies anteriormente consideradas como *Glomus*. Por outro lado o gênero *Sclerocystis* foi extinto e todas as espécies foram reclassificadas para o gênero *Glomus*.

Estudos moleculares posteriores, também baseados no 18S rDNA, tem demonstrado a natureza monofilética, ou seja, um grupo de espécies derivadas de um único ancestral, deste grupo de fungos, o que tem permitido incluí-los em um novo filo, o Glomeromycota (Schussler et al., 2001a; Schussler et al., 2001b; Schwarzott & Schussler, 2001; Schwarzott et al., 2001), o qual é composto por uma única classe, Glomeromycetes, que por sua vez compreende quatro ordens: a) A orden Glomerales, que inclui a maioria dos membros da antiga família Glomaceae. b) A orden Paraglomerales que possui uma única família Paraglomeraceae, antiga família Paraglomaceae. c) A orden Archaeosporales que engloba a família Geosiphonaceae (não micorrízica), e as famílias Appendicisporaceae e Archaeoporaceae. d) A orden Diversisporales que engloba as famílias Acaulosporaceae, Entrophosporaceae e Gigasporaceae,

Diversiporaceae e Pacisporaceae. É importante ressaltar que devido o Gênero *Glomus* apresentar características morfológicas e estruturais bem definidas, mostra divergências filogenéticas importantes que tem implicado em sua subdivisão em pelo menos três grupos, nos quais inclui a ordem Glomerales: Glomeraceae *Glomus*-Grupo A (fungos agrupados junto a *Glomus mosseae*), e Glomeraceae *Glomus*-Grupo B (fungos agrupados junto a *Glomus etunicatum*) e um terceiro em Diversisporales (*Glomus* C) (Schwarzortt et al., 2001).

A identificação de espécies ou gêneros usando técnicas moleculares são dependentes da obtenção de primers que podem ser específicos ou universais. Os numerosos microrganismos que vivem em esporos de FMAs dificultam o estabelecimento de novos marcadores de sequência para as subunidades ribossomais. Por outro lado o gene ribossomal por sua característica e função é muito conservado e devido a isso, a diferenciação de espécies utilizando esse gene, nem sempre é possível, o mesmo ocorre para a maioria dos organismos.

Para diferenciação de espécies outros genes ou regiões gênicas são mais indicadas. No entanto, os genes ribossomais tem sido largamente utilizados para reconstrução filogenética (Schüssler et al., 2001b; Schwarzott et al., 2001), citogenéticos (Harrison, 1999; Gianinazzi-Pearson et al., 2001), ecológicos (Helgason et al., 1998; Helgason et al., 2002; Husband et al., 2002a; Husband et al., 2002b; Kowalchuk et al., 2002), evolutivos (Sanders, 2002; Gandolfi et al., 2003) e funcionais desses organismos simbióticos obrigatórios, pois permitem uma identificação dos FMAS.

Souza et al. (2004) constataram que algumas identificações feitas com base na morfologia dos esporos não correspondem com os padrões de bandas, das estirpes de referência para a espécie, obtidas via DGGE. Assim, as espécies *G. ramisporophora* e *G. candida* que anteriormente foram consideradas pela análise morfológica sinônimas de, respectivamente, *Gigaspora margarita* e *Gigaspora rósea* (Bentivenga & Morton, 1995), através da análise via DGGE

verificou que essas espécies apresentam polimorfismo que as diferenciam claramente daquelas com as quais foram sinonimizadas. Baseado nesta análise, a espécie *G. ramisporophora* apresenta maior semelhança com *G. albida* do que com a *G. margarita*, apesar da morfologia não indicar isso. Indicando que a identificação via DGGE é mais confiável que a identificação morfológica, e que está última pode desencadear uma série de erros de identificação. Assim, os métodos ou estratégias que possam ser utilizadas para caracterizar FMAs sem o conhecimento prévio de sua morfologia serão certamente mais aplicáveis no futuro.

#### **2.4 Emprego de técnicas moleculares em estudos de FMAs.**

A maioria das técnicas moleculares empregadas na identificação de FMAs baseiam-se na utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), esta metodologia permite a amplificação exponencial e seletiva de um fragmento de DNA flanqueados por iniciadores, presentes em extratos de DNA em concentrações diminutas, ou seja, ela permite a amplificação do DNA a partir de uma pequena amostra do fungo. Esta técnica revolucionou o mundo científico e as suas aplicações são imensas: é usada no diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, testes de paternidade, identificação de “impressões digitais” genéticas, dentre outras. A PCR revolucionou várias áreas como a Biologia Molecular, Patologia, Farmácia, Botânica, Medicina Forense, Microbiologia e valeu o premio Nobel, em 1993, a Kary Mullis.

A finalidade da PCR é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima e para que isto ocorra, são necessários uma amostra de DNA que servirá de molde, quantidades adequadas de 2 oligonucleotídeos ou primers, que são as seqüências iniciadoras que determinarão as regiões a serem amplificadas, 4 deoxirribonucleotídeos,

dATP, dGTP, dGTT e dCTP, que formarão a fita complementar; a enzima DNA polimerase termoestável, que promoverá a síntese das novas fitas e um tampão Tris contendo MgCl<sub>2</sub> e KCl, que fornecerá as condições ideais para a atividade desta enzima (Mullis, 1990; Mullis et al., 1994).

Bruns & Gardes (1993), afirmam que a região ideal para realizar ampliações de PCR devem cumprir com os seguintes critérios: a) Estar presente em todos os fungos de interesse; b) Serem fáceis de amplificar; c) Amplificar preferencialmente o DNA do fungo, quando este se encontra junto com o DNA da planta; d) Ser suficientemente variável para permitir desenhar primers para numerosas hierarquias taxonômicas.

Os genes que codificam para o rDNA atende muitos desses critérios, por isso tem sido comumente utilizado neste tipo de estudo. Dentre estes genes, as regiões codificadoras (18S, 5.8S e 28S) são as mais conservadas, as regiões internas (ITS) mostram um certo grau de variação, e as regiões intergênicas (IGS) são as mais variáveis (Figura 1) (Lanfranco et al., 1998).

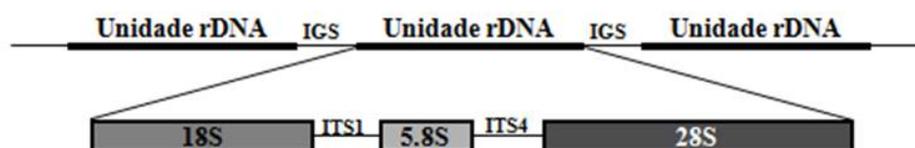


FIGURA 1 Representação esquemática dos genes ribossomais no genoma eucarioto. As unidades do rDNA se encontram repetidas em seqüência e separadas entre si por regiões intergênicas (IGS). Em detalhe cada unidade de genes ribossomais é composta pelos genes 18S, 5.8S e 28S e a região contida entre estes é chamada de regiões internas (ITS). Adaptação de Lanfranco et al. (1998) feita por Salles & de Souza, (1998).

As seqüências da subunidade menor do gene ribossomal (18S rDNA) evoluíram muito lentamente, por isso são utilizadas para estudar a distancia evolutiva entre organismos que apresentam grande distâncias filogenéticas (White et al., 1990). No caso de FMAs Simon e colaboradores (1992a; 1992b; 1993a; 1993b) foram os primeiros a aplicarem técnicas de PCR ao estudo de genes nucleares codificadores da subunidade 18S rDNA, desenhando o primer (oligonucleotídeo) “específico” de Glomales (atuais Glomeromicetos) capaz de amplificar o DNA fúngico em raízes colonizadas por este tipo de fungo. Estes autores realizaram também os primeiros estudos objetivando detectar polimorfismos neste grupo de fungos mediante SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples).

Uma vez ampliado os fragmentos de DNA, existe uma variedade de técnicas para separar a mistura de seqüências ampliadas baseadas na desnaturação de fragmentos de DNA (Sanders et al., 1995; Speksnijder et al., 2001; Kowalchuk et al., 2002). A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) é uma poderosa técnica de análise genética que pode ser usada para detectar diretamente modificações de uma única base e polimorfismos em DNA genômico, DNA clonal e DNA amplificado por PCR, trata-se de um método de separação eletroforético baseado em diferenças no comportamento de desnaturação de fragmentos de DNA de cadeia dupla. Esta separação se baseia em um princípio físico de que a mobilidade eletroforética do DNA em gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula, com respeito à sua conformação, que pode ser, helicoidal, parcialmente desnaturada ou em fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, compostas por partes em dupla hélice e partes em fitas simples, ao acaso, movimentam-se mais lentamente no gel do que as moléculas em fita dupla ou simples. Usando-se DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em

fragmentos com até 500 pares de bases (Myers et al., 1985). Esta porcentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (“GC-clamp”). Esse “grampo de GC”, quando anexado à extremidade 5’ de um dos iniciadores, é amplificado por PCR juntamente com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado, agindo como domínio de alta temperatura de desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas de DNA em fitas simples.

Seqüências de nucleotídeos obtidas podem ser comparadas com sequencias depositadas no GenBank. Os dados de sequencias podem ser usados então em análise filogenética para determinar relações evolutivas. Além disso, as seqüências podem ser usadas para refinar primers projetados para detectar uma gama de grupos taxonômicos a nível de gênero (para estudos de comunidade) para organismos isolados (para monitorar inóculo introduzido no solo).

Até obter mais conhecimento no campo da biologia molecular, a identificação dos FMAs ainda serão baseadas, fundamentalmente, na caracterização morfológica dos esporos. Isto torna a manutenção das coleções de espécies destes fungos de extrema importância para o avanço na identificação molecular em estudos futuros.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 A multiplicação dos FMAs

Para a realização do presente estudo, primeiramente criou-se uma planilha reunindo todas as informações disponíveis de cada isolado pertencente a Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência do Solo da Universidade federal de Lavras, a partir da qual selecionou-se 36 isolados (Tabela 1) dos quais foram coletadas amostras para avaliação de pureza e multiplicação dos isolados de FMAs. A avaliação da pureza foi feita mediante extração dos esporos de cada isolado selecionado, através do peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963). Após a extração dos esporos, estes foram transferidos para placa de petri e observados em microscópio estereoscópico, verificando se havia presença de morfotipos diferentes. Uma vez constatado a pureza do isolado procedeu-se com uma nova extração, de forma que obtivéssemos no mínimo 3000 esporos para efeito da padronização e formação da suspensão de esporos de cada isolado para inoculação das plantas, conforme será descrito em seguida. Em decorrência da dificuldade de obtenção dos esporos em tempo hábil para a implantação do experimento no mesmo dia, os esporos ficaram mantidos em câmara fria a 4°C.

Para o estudo, os isolados foram multiplicados em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras utilizando como planta hospedeira *Brachiaria decumbens* Stapf.. As plantas de *Brachiaria decumbnes* foram inicialmente crescidas em vermiculita estéril e posteriormente transplantadas, no momento da implantação do experimento, utilizando-se quatro plantas por vaso, colocadas na mesma cova.

TABELA 1 Lista dos isolados da coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Universidade Federal de Lavras empregados neste estudo.

<b>Código do vaso</b>	<b>Novo código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Origem do isolado</b>
852	DCS 01	<i>A. scrobiculata</i>	Cafê
29- 3SCFH3	DCS 02	<i>A. scrobiculata</i>	Poços de Caldas-MG
253-UFLA	DCS 03	<i>K. colombiana</i>	Cerrado natural
J2-24*	DCS 04	<i>Glomus Thin green</i>	Amazonas- capoeira
789	DCS 05	<i>G. gigantea</i>	<i>B. decumbens</i>
J2-24*	DCS 06	<i>Glomus Thin green</i>	Amazonas- mandioca
J3-38*	DCS 07	<i>G. etunicatum</i> “Yellow”	Amazonas -banana
527	DCS 08	<i>G. margarita</i>	Milho
1	DCS 09	<i>G. clarum</i>	U. Florida- <i>B. decumbens</i>
02-ULFA	DCS 10	<i>G. clarum</i>	Três Pontas-MG -Gramíneas
217-UFLA	DCS 11	<i>G. etunicatum</i>	Patrocínio - MG - café
64	DCS 12	<i>G. etunicatum</i>	S. Seb. do Paraíso-MG-café
408	DCS 13	<i>G. etunicatum</i>	Três Pontas – MG-café
212-UFLA	DCS 14	<i>G. etunicatum</i>	Lavras – MG-café
J4-50*	DCS15	<i>Glomus Thin green</i>	Amazonas - mandioca
95	DCS 16	<i>A. spinosa</i>	Cerrado natural
28- CTOG3	DCS 17	<i>A. spinosa</i>	Poços de Caldas-MG
4	DCS 18	<i>S. gregaria</i>	U. Florida- algodão
108-UFLA	DCS 19	<i>S. heterogama</i>	U. Florida
812	DCS 20	<i>S. pellucida</i>	Coleção do DCS - ESAL
J3-44*	DCS 21	<i>A. morrowiae</i>	Amazonas-floresta
03-UFLA**	DCS 22	<i>G. albida</i>	Três Marias -MG-gramíneas
14-UFLA**	DCS 23	<i>A. morrowiae</i>	Três Marias - MG-gramíneas
87-AM-UFLA*	DCS 24	<i>Glomus Thin green</i>	Amazonas-pastagem
864	DCS 25	<i>G. manihotis</i>	CIAT-sorgo
870	DCS 26	<i>G. calospora</i>	CIAT-sorgo
12-UFLA**	DCS 27	<i>G. rubiforme</i>	Três Marias -MG-gramíneas
133-UFLA	DCS 28	<i>G. mosseae</i>	Rio de Janeiro
47-UFLA	DCS 29	<i>A. longula</i>	Pimenta
260-UFLA	DCS 30	<i>A. longula</i>	Capim gordura, bracatinga
07-AM-UFLA*	DCS 31	<i>A. delicata</i>	Amazonas-floresta
234-UFLA	DCS 32	<i>P. occultum</i>	Gramíneas
50- AM-UFLA*	DCS 33	<i>A. delicata</i>	Amazonas-mandioca
66-AM-UFLA*	DCS 34	<i>G. etunicatum</i> “Yellow”	Amazonas-agrofloresta
24-AM-UFLA*	DCS 35	<i>Glomus Thin green</i>	Amazonas-agrofloresta
38-AM-UFLA*	DCS 36	<i>G. etunicatum</i> “Yellow”	Amazonas-capoeira nova

\*Projeto Conservation and sustainable management of belowground biodiversity.

\*\* Klauberg Filho (1999).

Para a multiplicação empregou-se uma mistura, aqui chamada de substrato, preparada a partir de um Latossolo Vermelho distrófico coletado em área sob fragmento de mata nativa sub-caducifólia, no campus da UFLA na camada superficial (0-20cm). O solo foi seco ao ar e peneirado em malha de 2mm, em seguida misturado com areia lavada na proporção de 2:1 (kg/kg) e devido à baixa saturação de bases foi feita uma calagem para elevar V até 60% mediante a aplicação de calcário dolomítico, foi aplicado 50mg de fosfato de rocha por kg de solo. O substrato foi tratado com brometo de metila (98% de brometo de metila + 2% de cloropicrina) na dosagem de  $393\text{cm}^3\text{m}^{-3}$  para eliminar os propágulos de FMAs nativos, amostras de solo, após a aplicação de calcário, nutrientes e fumigação, foram submetidas a análise química e apresentou as seguintes características químicas: pH (em água 2:1), 5,7; Ca,  $3,4\text{ cmolc dm}^{-3}$ ; Mg,  $1,0\text{ cmolc dm}^{-3}$ ; P,  $7,8\text{ mg.dm}^{-3}$ ;  $P_{\text{rem}}$ ,  $10,9\text{ Mg L}^{-1}$ ; K,  $12\text{mg.dm}^{-3}$ ; V, 44,2% e MO  $4,8\text{ dag kg}^{-1}$ .

Após o preparo do substrato este foi distribuído em vasos de 500mL e irrigados com solução de Mycoform<sup>TM</sup> previamente preparada a partir da diluição da substância em água levemente aquecida a no máximo 40°C, de modo que estivesse colocando 1mg por vaso, em seguida irrigou-se os vasos com água até que estes atingissem sua capacidade de campo. A inoculação foi feita através da pipetagem da suspensão de esporos, inoculando em torno de 200 esporos sobre as raízes das plantas de *Brachiaria decumbens*.

Os tratamentos constaram da aplicação de 1mg por vaso de Mycoform<sup>TM</sup> no ato do plantio (Myc 1), duas aplicações de 1mg por vaso de Mycoform<sup>TM</sup> (Myc 2), uma no ato do plantio e a outra dois meses após o plantio, e um controle (Myc 0), no qual não foi feita nenhuma aplicação de Mycoform<sup>TM</sup>, e 36 isolados da coleção de FMAs da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1), dispostos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com um esquema fatorial de 3x36 com 5 repetições, totalizando 540 vasos. Após 5 meses

do plantio, os vasos foram individualmente desmontados para que as raízes fossem coletadas. Em seguida o substrato foi seco a sombra e posteriormente homogeneizado, embalado em saco plástico e armazenado em câmara fria a 4°C. Os esporos foram extraídos de 25mL de solo retirado de cada vaso após a homogeneização, conforme descrito anteriormente. E em seguida foram contados sob microscópio estereoscópico. Avaliou-se também a percentagem de colonização das raízes pelo método da interseção em placa quadriculada em microscópio estereoscópico (Giovannetti & Mosse, 1980). Para isso, amostras de raízes foram coletadas de cada vaso, lavadas em água da torneira e conservadas em solução FAA até que fosse proceder com a coloração destas. Antes de iniciar a coloração das raízes, elas foram novamente lavadas para retirar a solução FAA, separando-se 1g de raiz de cada vaso e acondicionando-as em cápsulas plásticas, as quais foram mergulhadas em solução de KOH 10% e aquecidas a 60°C por 10 minutos, para clarificação; lavadas em água corrente; acidificadas com HCl 1% por 2 minutos; e aquecidas por 10 minutos em solução de glicerol ácido e azul de tripano 0,05% (Phillips & Hayman, 1970).

### **3.2 Caracterização morfológica dos isolados.**

Para o estabelecimento de estudos na identificação morfológica os esporos dos isolados que multiplicaram com sucesso pelo menos um dos 15 vasos montados foram fixados com PVLG e PVLG + reagente de Melzer (1:1) em lâminas para microscopia. Cada lâmina possuiu duas lamínulas, uma com PVLG, na qual manteve-se os esporos inteiros, e outra com uma mistura de PVLG e reagente de Melzer (1:1), na qual rompeu-se os esporos mediante a aplicação de uma leve pressão sobre a lamínula. A caracterização das espécies foi feita com base em critérios morfológicos, descritos nos sites do INVAM 2007 e do Blaskowski 2007, com utilização das descrições originais das espécies publicadas na literatura especializada. As imagens foram capturadas utilizando-

se o software de operação da câmera Motic Images Plus 2.0, através do qual também foi determinada as dimensões dos esporos dos FMAs. As cores dos esporos foram determinadas com a ajuda da carta de cores do INVAM.

### **3.3 Caracterização molecular dos isolados.**

Para a caracterização molecular, os esporos foram obtidos em uma nova extração conforme descrito anteriormente. Em seguida, os esporos foram cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico e submetidos a quatro sessões de ultra-som por 15 segundos, intercaladas por lavagens em água destilada estéril para eliminar partículas de solo e possíveis microrganismos aderidos superficialmente. Os esporos limpos, aparentemente perfeitos e sadios foram selecionados e transferidos para tubos de microcentrifuga de 1,5mL, separando-os em grupos de um e dez esporos por tubo, em seguida foram armazenados à -20°C. O DNA foi extraído mediante a quebra dos esporos em 2µL de água estéril com o auxílio de um micro-pestilo (Treff AG, Degershein, Suíça), garantindo a liberação de todo seu conteúdo na água para formação do extrato cru, e rapidamente acrescentado 40µL de tampão TE-tris edta 10:1mM, misturando bem com o micro-pestilo para que garantisse a quebra do esporo e em seguida adicionou 10µL de resina Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia Estados Unidos da América) a 20% em água ultra-pura. Após esta etapa, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido. Em seguida, os tubos foram incubados a 95°C durante 10 minutos, rapidamente resfriados em gelo, e centrifugados a 10000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo e armazenados a -20°C até o momento da análise. Em decorrência da dificuldade de obtenção do DNA de algumas espécies a partir de poucos esporos, outros métodos de extração foram testados. Assim, através de adaptação do kit “Wizard Genomic DNA purification kit”, foi feita a extração de DNA mediante a quebra de grande quantidade de esporos

dentro do próprio microtubo de 1,5mL utilizando um micropestilo acoplado a uma microretificadora. Após a maceração dos esporos, foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante para extração de DNA de plantas, com modificações.

Após extração o pelete de DNA foi seco ao ar colocando os tubos em posição invertida sobre um papel absorvente a temperatura ambiente “overnight”. Após a secagem do pelete adicionou-se 50µL de solução de rehidratação e os tubos foram incubados por 1 hora a 65°C, o DNA foi quantificado em “spectrophotometer Nano-Drop” e dividido em dois microtubos e armazenado um a 4°C e o outro a -20°C até o momento da análise.

O DNA dos esporos foram amplificados com o par de iniciadores NS1-ITS4 (Tabela 2), que permitem amplificar o DNA ribossomal (rDNA) do início do gene 18S até o início do gene 25S, abrangendo as duas regiões intergênicas e o gene 5.8S (White et al., 1990) (Figura 2). Para a realização das reações utilizou-se um volume final de 50µL sendo 3µL do DNA molde. A mistura do PCR foi composta de 200µM de cada um dos quatro deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,28µM de cada primer e 3,5 unidades de polimerase “Expand High Fidelity” (Roche diagnostics). O tampão de reação foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em termocicladores PCT-1148 MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO RAD). Para a amplificação do DNA dos esporos para serem utilizados na análise de DGGE, primeiramente foi amplificado o DNA de esporos das espécies da família *Gigasporaceae* de acordo com de Souza et al. (2004), assim, o DNA dos esporos foi amplificado inicialmente com o par de primers FM6 (de Souza et al., 2004) e GIGA5.8R (Redecker, 2000). As reações foram realizadas utilizando-se um volume total de 25µL sendo 2µL do DNA molde. A mistura do PCR foi composta de 200µM de cada um dos quatro deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), 1,5µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3µM de cada primer e 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase, Recombinante (Invitrogen), utilizando o tampão de

reação de acordo com as recomendações do fabricante e feitas em termocicladores PCT-1148 MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO RAD). O produto deste ciclo de amplificações foi diluído de acordo com a intensidade das bandas formadas, as amostras que não apresentaram bandas ou as bandas eram fracas não foram diluídas, quando as bandas eram fortes a diluição foi de 1:500 e bandas extremamente fortes foram diluídas de 1:1000. Um segundo ciclo de amplificações (“nested”) foi realizado utilizando-se 4µL destas diluições como DNA molde, utilizou-se também diluições dos produtos de PCR realizados com os primers NS1 e ITS4. Para esta segunda amplificação foi utilizado o primer senso NS7 (White et al., 1990) contendo um grampo GC em combinação com o anti-senso F1Ra (de Souza et al., 2004), a reação foi feita utilizando as mesmas condições descritas anteriormente para a enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), diferindo apenas no volume de reagentes que foi de 50µL, sendo 4µL do DNA molde. As análises de DGGE foram realizadas em aquário, utilizando-se géis com 7% de acrilamida e gradiente de 32 a 42% e 35 a 45% de desnaturante. A eletroforese foi realizada a 75v por 15 horas, utilizando-se um tampão 0,5 Tris-acetato-EDTA (TAE) a temperatura constante de 60°C, com corrente variando de 46 (inicial) a 50mA (final).

TABELA 2. “Primers” para rDNA, combinação de “primers”, grampo de GC e combinações do PCR empregados neste trabalho.

Primers	Seqüência	Primer reverso	Grupo Alvo	Condições para amplificação por PCR	Tamanho esperado (pb)
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGTC-3'	ITS4	Eucaritos	{94°C(60s), 55°C (160s)}x30	2300
FM6	5'-ACCTGCTAAATAGTCAGGCTA-3'	GIGA5.8R	Gigasporaceae	{94°C(60s), 59°C (45s)}x30	700
NS7-GC <sup>b</sup>	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	F1Ra	Eucaritos	{94°C(60s), 60°C (28s)}x30	400
ITS4	5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'	-	Eucariotos	-	-
GIGA5.8R	5'-ACTGACCCTCAAGCAKGTG-3'	-	Gigasporaceae	-	-
F1Ra	5'-CTTTACTTCCCTAAATGACC-3'	-	Fungos	-	-

Tabela retirada de Souza et al. (2004).

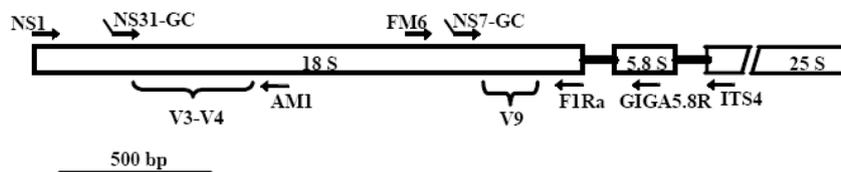


FIGURA 2 Representação esquemática do gene ribossomal (rDNA), focalizando no gene que codifica para o 18S. As posições aproximadas dos “primers” estão indicadas (setas), bem como as regiões variáveis analisadas via PCR-DGGE (colchetes). Setas quebradas indicam “primers” contendo grampo GC. (Retirada de de Souza et al., 2004.)

### 3.4 Análises

Em virtude da não multiplicação de todos os isolados inicialmente repicados, ou da contaminação de partes dos vasos, foram analisados apenas os dados dos isolados que obtiveram sucesso na multiplicação dos 15 vasos montados. Assim, após a contagem dos esporos e da determinação da taxa de colonização micorrízica radicular, os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR.

Os géis de DGGE foram submetidos a análise de similaridade entre os perfis de bandas dos isolados de FMAs através do programa Gelcompar-Coefficiente de Jaccard (Tol 1.0% -1.0%) ( $H > 0.0\%$   $S > 0.0\%$ )[0.05 – 100%].

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Esporulação dos isolados de FMAs

Dos 36 isolados 19 multiplicaram em pelo menos um vaso, sendo que 3 isolados apresentaram contaminação, e 17 isolados não apresentaram nenhum sinal de colonização e esporulação, sendo então descartados. A contaminação restringiu-se aos isolados DCS 05 (*Gigaspora gigantea*), DCS 11 (*Glomus etunicatum*) e DCS 22 (*Gigaspora albida*). Embora os vasos destes isolados continham a espécie original, foi verificada a presença de *Glomus clarum* em um dos vasos do isolado DCS 05 e *Glomus* sp. nos vasos dos demais isolados.

A taxa de colonização radicular, independentemente do isolado fúngico estudado e da aplicação ou não de Mycoform<sup>TM</sup>, foram bem elevadas e semelhantes, estando na faixa de 50% (Tabela 4), o que pode ser atribuído a utilização de uma única planta hospedeira, a *Brachiaria decumbens*, e pela baixa especificidade dos FMAs. Os isolados DCS 24 (*Glomus thin green*) e DCS 03 (*K. colombiana*) foram os isolados que promoveram os maiores valores de colonização na ausência do Mycoform<sup>TM</sup> e o isolado DCS06 (*G. thin green*) o que proporcionou menor taxa de colonização. Apesar dos fatores que controlam a taxa de colonização serem bastante complexos e dependentes da relação entre número de propágulos infectivos iniciais os isolados DCS 24 e DCS 06 apesar de pertencerem a mesma morfoespécie apresentaram diferenças na taxa de colonização radicular.

Com relação ao nível de efeito das aplicações de Mycoform<sup>TM</sup>, a comparação das médias indicou que apenas os isolados DCS 02 (*Acaulospora SP.*), DCS 06 (*Glomus thin green*) e DCS 09 e 10 (*G. clarum*) responderam a aplicação de formononetina, obtendo um incremento de colonização micorrízica superior a 20%. Pereira & Siqueira (1997) verificaram que a formononetina

aumentou a percentagem de colonização da soja por um desses isolados de *G. clarum* indicando um efeito consistente na colonização dessa espécie, independentemente da planta hospedeira. Entretanto, o efeito da formononetina sobre os isolados DCS 23 (*A. morrowiae*), DCS 19 (*S. heterogama*) e sobre um dos isolados de *G. etunicatum* não parece ser consistente, uma vez que estes isolados não responderam a aplicação da formononetina quando cultivados com *brachiaria decumbens* (Tabela 3), mas aumentaram a percentagem de colonização nas plantas da soja quando aplicada a formononetina (Pereira & Siqueira, 1997).

TABELA 3 Colonização radicular de *Brachiaria decumbens* aos 150 dias após plantio e produção média de esporos por isolados de FMAs na ausência e presença de formononetina.

Isolado	% Colonização			Nº Esporos		
	Myc0	Myc1	Myc2	Myc0	Myc1	Myc2
<i>G. clarum</i> - 09	54 <b>Bb</b>	71 <b>Aa</b>	71 <b>Aa</b>	2264 <b>Ab</b>	3358 <b>Aa</b>	3108 <b>Aa</b>
<i>G. clarum</i> - 10	55 <b>Bb</b>	69 <b>Aa</b>	75 <b>Aa</b>	2552 <b>Ab</b>	3317 <b>Aa</b>	2288 <b>Ab</b>
<i>G. thin green</i> - 06	38 <b>Db</b>	61 <b>Ba</b>	55 <b>Ca</b>	1591 <b>Bb</b>	2816 <b>Aa</b>	1369 <b>Cb</b>
<i>G. Thin Green</i> - 24	61 <b>Aa</b>	57 <b>Ba</b>	58 <b>Ba</b>	1288 <b>Ba</b>	991 <b>Da</b>	1326 <b>Ca</b>
<i>G. etunicatum</i> - 12	54 <b>Ba</b>	63 <b>Aa</b>	63 <b>Ba</b>	938 <b>Cb</b>	1753 <b>Ca</b>	954 <b>Cb</b>
<i>G. etunicatum</i> - 13	55 <b>Ba</b>	59 <b>Ba</b>	60 <b>Ba</b>	1310 <b>Ba</b>	1453 <b>Ca</b>	1204 <b>Ca</b>
<i>P. occultum</i> - 32	52 <b>Ba</b>	54 <b>Ba</b>	53 <b>Ca</b>	1703 <b>Ba</b>	1566 <b>Ca</b>	1460 <b>Ca</b>
<i>Acaulospora sp.</i> - 02	48 <b>Cb</b>	60 <b>Ba</b>	60 <b>Ba</b>	1289 <b>Ba</b>	1178 <b>Da</b>	1775 <b>Ba</b>
<i>Acaulospora sp.</i> - 30	52 <b>Ba</b>	57 <b>Ba</b>	64 <b>Ba</b>	1558 <b>Bb</b>	2071 <b>Ba</b>	2740 <b>Aa</b>
<i>A. delicata</i> - 31	53 <b>Ba</b>	53 <b>Ba</b>	59 <b>Ba</b>	1579 <b>Bb</b>	1005 <b>Db</b>	2189 <b>Ba</b>
<i>A. morrowiae</i> - 23	51 <b>Ba</b>	54 <b>Ba</b>	59 <b>Ba</b>	465 <b>Ca</b>	776 <b>Da</b>	782 <b>Da</b>
<i>K. colombiana</i> - 03	60 <b>Aa</b>	66 <b>Aa</b>	70 <b>Aa</b>	1315 <b>Bb</b>	2490 <b>Ba</b>	2072 <b>Ba</b>
<i>S. heterogama</i> - 19	45 <b>Ca</b>	47 <b>Ba</b>	41 <b>Da</b>	260 <b>Ca</b>	312 <b>Da</b>	274 <b>Da</b>

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Skott Knott.

A análise de variância da densidade de esporos (Tabela 3) indicou que os isolados DCS 09 e 10 (*G. clarum*), independente da ausência ou presença do Mycoform<sup>TM</sup>, foram os isolados que mais esporularam e os isolados DCS 19 (*S. heterogama*), DCS 12 (*G. etunicatum*) e DCS 23 (*A. morrowiae*) os que menos esporularam. As condições de multiplicação pode ter favorecido a alta taxa de multiplicação dos isolados de *G. clarum*, estes isolados têm tido alta esporulação (dados não publicados) nas multiplicações de rotina do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, e tem sido um dos principais contaminantes dos vasos de outros isolados. A esporulação dos FMAs é bastante heterogênea e depende do fungo, da planta, de fatores do solo e da sazonalidade (Cardoso et al., 2003), sendo que a sensibilidade ou tolerância aos componentes dos ecossistemas, tais como tipo de solo, pH, umidade, fertilidade natural e outros é bastante específica. Schultz et al. (1999) encontrou evidências que a densidade de esporos de fungos difere de acordo com a época, com alguns fungos esporulando no fim da primavera e outros esporulando ao término do verão. Além disso, diferenças na esporulação de espécies podem ser em função da quantidade de biomassa requerida para a formação de um esporo, determinada pelo tamanho de cada isolado, no entanto, deve-se levar em consideração a posição taxonômica de cada isolado, assim, a menor esporulação de *G. etunicatum*, que apesar de possuir diâmetro menor que *G. clarum* esperando-se uma maior esporulação que este, pode ser atribuída a sua posição filogenética, pois *G. etunicatum* pertence a *Glomus* grupo B e *G. clarum* ao *Glomus* grupo A. *S. heterogama* requer maior biomassa para a formação de seus esporos que *G. clarum* por isso é aceitável sua menor esporulação.

Dos isolados que apresentaram esporulação e estavam puros, houve efeito da aplicação do Mycoform<sup>TM</sup> na esporulação da maioria dos isolados avaliados. A comparação das médias indicou que a aplicação de Mycoform<sup>TM</sup>

foi eficiente para elevar a esporulação dos isolados DCS 03 (*Kuklospora colombiana*), DCS 06 (*Glomus "thin green"*), DCS 09 (*Glomus clarum*), DCS 10 (*G. clarum*), DCS 12 (*G. etunicatum*), DCS 30 (*Acaulospora* sp2.) e DCS 31(*A. delicata*). Sendo que o isolado DCS 31 (*A. delicata*) respondeu somente após duas aplicações obtendo um incremento de 54% no número de esporos. Três estirpes que responderam a primeira aplicação, não apresentaram diferenças para uma segunda aplicação (DCS 10 -*G. clarum*, DCS 12-*G. etunicatum* e DCS 06-*Glomus "thin green"*) que com apenas uma aplicação de Mycoform<sup>TM</sup> obtiveram um incremento de 31, 46 e 51%, respectivamente, em sua esporulação.

A distribuição generalizada da simbiose micorrízica arbuscular na maioria das espécies de plantas e a não especificidade do fungo micorrízico arbuscular para colonizar plantas (Smith & Read, 1997) sugere que alguns exudados de plantas, como flavonóides, sirvam como sinais moleculares gerais para todos os fungos micorrízicos arbusculares. Porém, comparando os dados disponíveis no crescimento pré-simbiontico de FMAs, Vierheilig et al. (1998) sugerem que flavonóides exibem efeitos específicos para gênero e até mesmo para espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

Neste trabalho, além das diferenças do efeito do maycoform, o qual é uma formulação mais solúvel do flavonóide formononetina (Nair et al., 1997), nos isolados de diferentes espécies, pode-se observar que esta especificidade pode existir até mesmo em diferentes isolados da mesma espécie, assim, apesar do isolado DCS 12 (*Glomus etunicatum*) ser morfológicamente semelhante ao DCS 13 (*Glomus etunicatum*), a aplicação do Mycoform<sup>TM</sup> proporcionou um efeito diferente para cada isolado, desta forma, embora duas aplicações tenham sido suficientes para promover um aumento de 46% na densidade de esporos do isolado DCS 12, nem mesmo duas aplicações foram suficientes para estimular o isolado DCS 13, no entanto, na ausência do Mycoform<sup>TM</sup> este isolado esporulou

mais que o isolado DCS 12 que atingiu a mesma magnitude de esporulação quando aplicado o Mycoform™.

Davies et al. (2005), estudando a influência do flavonóide formononetina na atividade micorrízica e na produtividade de batata, verificou um aumento de três vezes no número de esporos de fungos micorrízicos indígenas pertencentes aos gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Glomus*, constatando que a formononetina teve maior efeito na produção de esporos do gênero *Gigaspora*, considerando que *Glomus* era mais abundante no solo natural, neste mesmo trabalho ele não encontrou diferença significativa da formononetina na colonização total, indicando que o efeito na esporulação é independente do efeito na colonização. Desta forma podemos constatar que a formononetina estimula a esporulação principalmente quando os esporos estão em baixa quantidade. No entanto, essas diferenças obtidas na esporulação entre os isolados de mesma espécie podem ter ocorrido em decorrência das diferenças no potencial de inóculo inicial, principalmente porque os esporos utilizados como inóculo foram obtidos de vasos com idades diferentes, assim, os esporos de alguns isolados podem não ter funcionado como propágulos caso eles estivessem inativos, devido às condições da época de implantação ou por estarem no período natural de dormência.

Para cada isolado estudado, exceto DCS 09, o efeito sobre a produção de esporos foi independente do efeito sobre a colonização micorrízica, indicando que os flavonóides podem estar envolvidos em algumas etapas do desenvolvimento fúngico e em outras não, demonstrando que um mesmo flavonóide possa promover efeitos diferenciados para determinadas espécies de FMAs.

Infelizmente, quase todos os dados de efeito de flavonóides em FMAs foram obtidos em experimentos com diferentes condições experimentais, como por exemplo, em diferentes sistemas *in vitro*, diferentes combinações de

concentrações, e com diferentes espécies de FMAs e diferentes plantas hospedeiras, em fases diferentes de crescimento pré-simbiótico (Morandi 1996, Vierheilig et al. 1998). Conseqüentemente, nenhuma conclusão clara sobre a especificidade do flavonóide testado pode ser afirmada, sendo necessário a condução de vários experimentos utilizando-se os mesmos isolados para concluir sobre o efeito e especificidade do Mycoform™.

No entanto, os resultados obtidos são promissores e indicam que a aplicação de formoneta pode favorecer o aumento na produção de esporos podendo vir a ser empregada na produção em larga escala de inóculo de FMA. Para isso, pesquisas adicionais são necessárias para clarificar o papel e o momento mais propício para aplicação desse composto, bem com, a padronização da qualidade e quantidade de inóculo a ser utilizado nos experimentos testes.

#### **4.2 Caracterização morfológica dos isolados de FMAs**

Apesar dos esporos terem sido selecionados quanto ao estado de maturação, dando preferência aqueles que se encontravam maduros, foi possível estabelecer a correspondência entre os isolados da mesma espécie e agrupá-los em um único morfotipo. Os caracteres morfológicos identificados e caracterizados neste trabalho foram baseados nos dados propostos pelos sites <http://invam.caf.wvu.edu/> e [www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/index.html](http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/index.html), comparando as imagens adquiridas com aquelas disponíveis nos sites e utilizando-se as descrições originais das espécies publicadas na literatura especializada. Nesse sentido, o tamanho e as cores dos esporos dos isolados analisados neste trabalho estão dentro do alcance descritos nos sites do INVAM 2007 e no site do Blaskowski 2007 (Tabela 4), havendo uma pequena variação na tonalidade das cores, isso provavelmente ocorre em função das diferenças no solo utilizado como substrato. Da mesma forma, a organização subcelular dos

esporos apresenta-se de forma similar às descrições contidas nesses sites.

TABELA 4 Distribuição do tamanho, média e erro padrão do diâmetro de 50 esporos e cores dos isolados de FMAs da coleção da Universidade Federal de Lavras e de suas respectivas espécies nos sites do INVAM e Blaszkowski.

Isolado	Distribuição do tamanho			Coloração dos esporos em água			
	.....µm.....			Fórmula=% Ciano/magenta/amarelo/preto			
	UFLA	INVAM	Blaszkowski	UFLA		INVAM	
<i>G. clarum</i> -09	100-202 (147±2,99)	100-260 (182)	70-106 (150)	0/10/20/0	0/10/60/0	0/10/20/0	0/10/60/0
<i>G. clarum</i> -10	100-198 (147±3,30)	-----	-----	0/10/20/0	0/10/60/0	0/10/20/0	0/10/60/0
<i>G. etunicatum</i> -11	82-145 (103±2,08)	60-160 (129)	75-95 (135)	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>G. etunicatum</i> -12	77-198 (104±3,21)	-----	-----	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>G. etunicatum</i> -13	75-118 (99±1,19)	-----	-----	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>G. diaphanum</i> -06	65-93 (80±1,31)	60-120 (93)	50-130 (90)	Hialino	-----	Hialno	Branco
<i>G. diaphanum</i> -24	70-113 (86±1,42)	-----	-----	Hialino	-----	Hialno	Branco
<i>G. diaphanum</i> -31	63-100 (78±1,22)	-----	-----	Hialino	-----	Hialno	Branco
<i>G. diaphanum</i> -32	69-99 (90±0,89)	-----	-----	Hialino	-----	Hialno	Branco
<i>A. delicata</i> -02	63-100 (95±1,80)	80-120 (99)	-----	0/0/20/0	0/0/30/0	0/5/10/0	0/5/20/0
<i>A. delicata</i> -30	87-107 (96±0,68)	-----	-----	0/5/10/0	0/0/30/0	0/5/10/0	0/5/20/0
<i>A. morrowiae</i> -23	65-95 (75±1,03)	60-100(75,6)	70-120 (80)	0/5/60/0	0/15/60/0	0/10/0/0	0/15/60/0
<i>K. colombiana</i> -03	88-141 (113±1,63)	100-140 (121)	-----	0/20/60/10	0/40/60/10	0/20/60/0	0/10/60/0
<i>S. heterogama</i> -19	149-204 (182±1,84)	120-200 (159)	-----	0/60/100/10	40/80/100/0	0/60/100/10	40/80/100/10
<i>S. gregária</i> -18	289-368 (334±3,04)	380-520 (473)	-----	40/80/80/0	80/80/100/10	20/80/100/10	40/80/80/0
<i>S. rubra</i> -27	148-198(176±1,03)	140-220 (180)	-----	40/80/80/0	40/80/100/10	0/60/100/0	20/80/100/0
<i>G. gigantea</i> -05	240-411 (377±4,87)	240-400 (324)	250-300 (380)	0/10/40/0	10/0/100/0	10/0/100/0	20/0/100/0
<i>G. margarita</i> -08	204-369 (254±5,92)	260-400 (321)	260-357 (405)	0/0/5/0	0/10/40/0	0/5/30/0	0/10/40/0
<i>G. albida</i> -22	194-273 (241±3,66)	200-280 (250)	-----	0/0/15/0	0/0/20/0	0/0/15/0	5/0/20/0

A Figura 3 mostra as diferenças no tamanho dos esporos dos diferentes isolados estudados nesse trabalho. Os isolados apresentaram pouca variação no diâmetro dos esporos (Tabela 4), as maiores variações no tamanho dos esporos ocorreram nos isolados do gênero *Gigaspora*, onde os isolados DCS 08 (*Gigaspora margarita*) e DCS 05 (*Gigaspora gigantea*) foram os isolados que mais variaram, obtendo uma amplitude de 204 a 368,9µm e 240 a 406µm com erro padrão da media de 50 esporos de ±5,92 e ±4,87, respectivamente, e o isolado DCS 22 (*Gigaspora albida*) o que menos variou, tendo uma amplitude de 193,7 a 273,6 µm e erro padrão ± 3,66, por outro lado, os isolados DCS 13 (*G. etunicatum*), DCS 31 (*G. diaphanum*) e DCS 03 (*Kuklospora colombiana*),

foram os que menos variaram em torno da media, possuindo amplitude de 74,6 a 117,8 $\mu$ m, 63,3 a 100,4 $\mu$ m, 88 a 141 $\mu$ m e erro padrão de  $\pm 1,19$ ,  $\pm 1,22$  e  $\pm 1,63$ , respectivamente.

Os diferentes isolados geográficos de *G. clarum* tiveram pouca variação do diâmetro de seus esporos e apresentaram distribuições semelhantes do tamanho dos esporos variando de 100 a 150 $\mu$ m. Apesar dos diferentes isolados geográficos de *G. etunicatum* terem obtido diâmetros médios de 50 esporos bastante semelhantes, variando de 99,27 a 103,91 $\mu$ m, a variabilidade do diâmetro foi diferente dentro de cada isolado, sendo o isolado DCS 12 (*G. etunicatum*) o isolado com maior variação, indo de 76,9 a 197,8 $\mu$ m com erro padrão de  $\pm 3,21$ , seguido do isolado DCS 11 (*G. etunicatum*) que variou de 81,8 a 144,5 $\mu$ m com erro padrão de  $\pm 2,08$  e o isolado DCS 13 (*G. etunicatum*) que teve menor variação, indo de 74,6 a 117,8 $\mu$ m com erro padrão de  $\pm 1,19$ .

Dentre os dois isolados do gênero *Scutellospora*, o isolado DCS 18 (*Scutellospora gregaria*) foi o que teve maior variação, obtendo uma amplitude de 289,20 a 368,40 $\mu$ m com erro padrão de  $\pm 3,04$  e o isolado DCS 19 (*Scutellospora heterogama*) a menor variação, com amplitude de 149,2 a 203,7 $\mu$ m e erro padrão de  $\pm 1,84$ .



FIGURA 3 Comparação entre o tamanho dos esporos de 19 isolados da Coleção de FMAs do Departamento de Ciência do solo da Universidade Federal de Lavras. Gi=*Gigaspora*; S=*Scutellospora*; A=*Acaulospora*; G=*Glomos*. Aumento de 10X.

#### **4.2.1 DCS 02 e 30 – isolados de *Acaulospora delicata* (Walker, Pfeiffer e Bloss, 1986)**

Os isolados DCS 02, DCS 30 foram anteriormente identificadas como sendo *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora spinosa* e *Acaulospora longula*, respectivamente. No entanto através da caracterização morfológica estes isolados foram re-identificados como sendo *Acaulospora delicata*. Estas diferenças na identificação destes isolados pode ter sido em decorrência de erro na identificação inicial ou devido à contaminação dos vasos de cultivo por *Acaulospora delicata* durante as repicagens, o que pode ter suprimido a espécie inicialmente identificada. Estes isolados não apresentaram diferenças em seus caracteres morfológicos (Figura 4), o que não permitiria uma separação destes, caso ocorresse contaminação dos vasos de cultivo. Os esporos possuem um tamanho variável entre 63,3 a 100,4µm de diâmetro, com coloração amarelo claro, com matriz esverdeada. Sua forma variou de globosa a sub-globosa. A parede do esporo é composta por duas camadas (L1, L2) (Figura 4), a camada externa (L1) trata-se da parede do pescoço do sáculo esporífero e possui características de parede evanescente. A L1 é uma camada externa hialina que pode ser degradada ficando com um aspecto de camada granular. A L2 consiste em subcamadas de coloração amarelo claro (0-0-10-0) e frequentemente difíceis de serem distinguidas.

A camada germinativa (gw) trata-se de duas camadas internas flexíveis e hialinas (gw1 e gw2). A gw2 consiste em duas camadas (L1 e L2) firmemente aderidas. A superfície da L1 é uniformemente coberta com excrescências (ou "pontas granulares"), camada "beaded". A L2 normalmente adquire coloração rosada clara (0-5-0-0) para ligeiramente rosada mais escura (0-10-20-0) em reagente de Melzer. Os esporos possuem uma cicatriz, de forma circular ou ovóide, formada no ponto de conexão do esporo com o pescoço do sáculo esporífero.

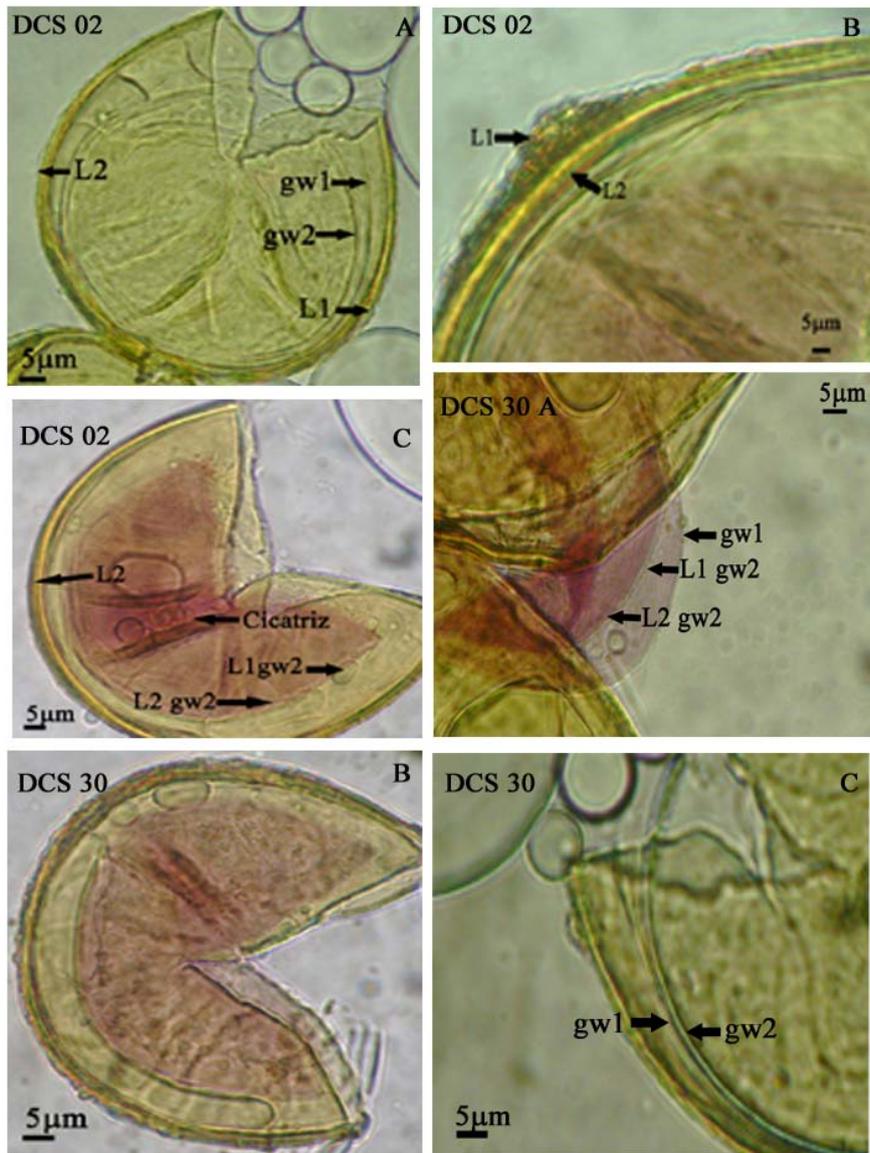


FIGURA 4 *Acaulospora delicata* (DCS 02 e 30). Esporo individual evidenciando camadas da parede do esporo (DCS 02 A, B). Camadas da parede germinativa (gw1, L1 gw e gw2) (DCS 02 A e C, DCS 30 A e C) e cicatriz (DCS 02 C).

#### 4.2.2 DCS 23 – *Acaulospora morrowiae* (Spain & Schenck)

Os esporos possuem um tamanho variável entre 65 a 95 $\mu$ m de diâmetro, com coloração amarelo claro. Sua forma variou de globosa a sub-globosa. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2 e L3) (Figura 5). A L1 é uma camada externa hialina contínua com a parede do sáculo esporífero, e fina e que frequentemente produz rugas dando uma aparência de “rugoso” ao esporo. A L2 consiste em subcamadas firmemente aderidas que só se separam quando os esporos são f vigorosamente esmagados.

A camada germinativa (gw) trata-se de duas camadas internas flexíveis e hialinas (gw1 e gw2) (Figura 5D). Os esporos possuem uma cicatriz, de forma circular ou ovóide, formada no ponto de conexão do esporo com o pescoço do sáculo esporífero.

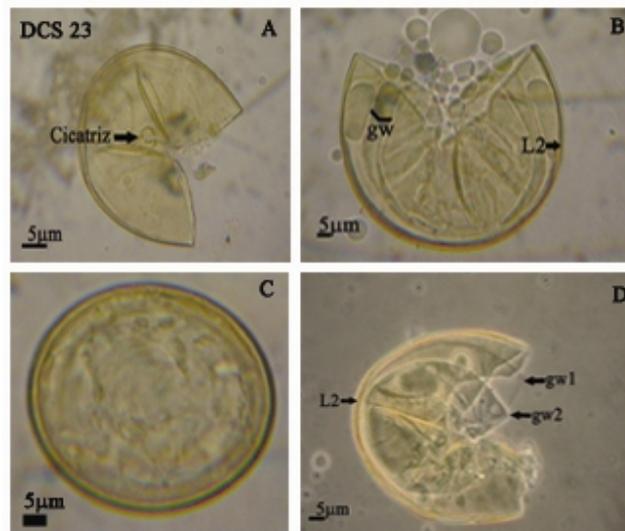


FIGURA 5 *Acaulospora morrowiae* (DCS 23). Esporo individual evidenciando as camadas (L2 e gw) da parede do esporo (A, B). Camadas da parede germinativa (gw1 e gw2) (D), visão de um esporo (C) e cicatriz (B).

#### 4.2.3 DCS 03 -*Kuklospora colombiana* (Spain & Schenck) Oehl & Sieverding

*Kuklospora colombiana* foi originalmente descrita como *Entrophospora colombiana* Spain e Schenck. Os principais argumentos usados para retirar este fungo do gênero *Entrophospora* e transferi-lo para o gênero, recentemente estabelecido, *Kuklospora*, um gênero irmão da *Acaulospora* Gerd. & Trappe (Sieverding & Oehl, 2006), tem sido a formação de três paredes de esporo em *Kuklospora spp.* assim como em *Acaulospora spp.*, e não de duas paredes como em *Entrophospora spp.*. A presença de uma camada “beaded” em sua parede de germinação, idêntica àquelas encontradas em esporos da maioria das espécies do gênero *Acaulospora*, em contraste da camada relativamente espessa encontrada na parede germinativa interna de esporos de *Entrophospora spp.*. E por sua maior relação filogenética com membros do gênero *Acaulospora* do que com a espécie *Entrophospora infrequens*, a única espécie deste gênero com propriedades moleculares conhecidas (Sieverding & Oehl, 2006).

Os esporos analisados apresentaram coloração castanho (0-20-60-0), a laranja mais escuro (0-40-60-0), com forma globosa e tamanho variando de 88 a 141µm, os esporos apresentam uma única parede de esporo com três camadas (L1, L2 e L3) (Figura 6), a L1 é uma camada hialina externa que é contínua com a parede do sáculo esporífero e a camada interna é a camada que iniciou a origem do esporo. A L2 é consiste em subcamadas (laminas) originadas da L1 quando o esporo expande, possui coloração amarelo-alaranjado.

A L3 é uma camada única difícil de ser visualizada devido à pequena espessura. Sua posição é altamente variável e depende de quanto o esporo foi quebrado, isso foi a causa de muitos anos de confusão na interpretação se ela fazia parte da parede do esporo ou não. Raramente pode ser visualizada quando está aderida a parede do esporo e quando a separação é uniforme em torno da parede do esporo, esta camada pode ser mal interpretada como uma parede

interna flexível. Porém, é ligeiramente mais rígida que paredes internas flexíveis porque pode quebrar junto com a parede do esporo (INVAM, 2007).

Esporos maduros de *Kuklospora colombiana* possuem duas paredes germinativas, estas são paredes hialinas, flexíveis e internas (gw1 e gw2) que podem ser vistas em todos os esporos quando as camadas se separam após o rompimento dos esporos. A gw1 e gw2 tendem a separar muito mais na mistura de PVLG com reagente de Melzer que em apenas PVLG. Estas paredes formam-se separadamente e consecutivamente depois da diferenciação completa da parede de esporo.

A gw1 normalmente aparece como uma camada única, mas ela parece consistir em duas camadas muito finas que quase sempre são aderentes.

A gw2 é uma camada flexível que consiste em duas camadas firmemente aderidas. A L1 da gw2 é hialina com excrescência ou "pontas granulares". A L2 da gw2 é hialina e plástica suficientemente para ser chamada de amorfa. Adquire coloração avermelhada em reagente de Melzer. Esta camada é não reativa quando em formação e gradualmente se torna mais reativa com a diferenciação completa do esporo (INVAM, 2007).

O sáculo esporífero possuiu coloração salmão quando jovem, gradualmente ficando branco e então hialino, seu conteúdo é transferido para o esporo em formação. Possui forma subglobosa para ligeiramente oblongo.

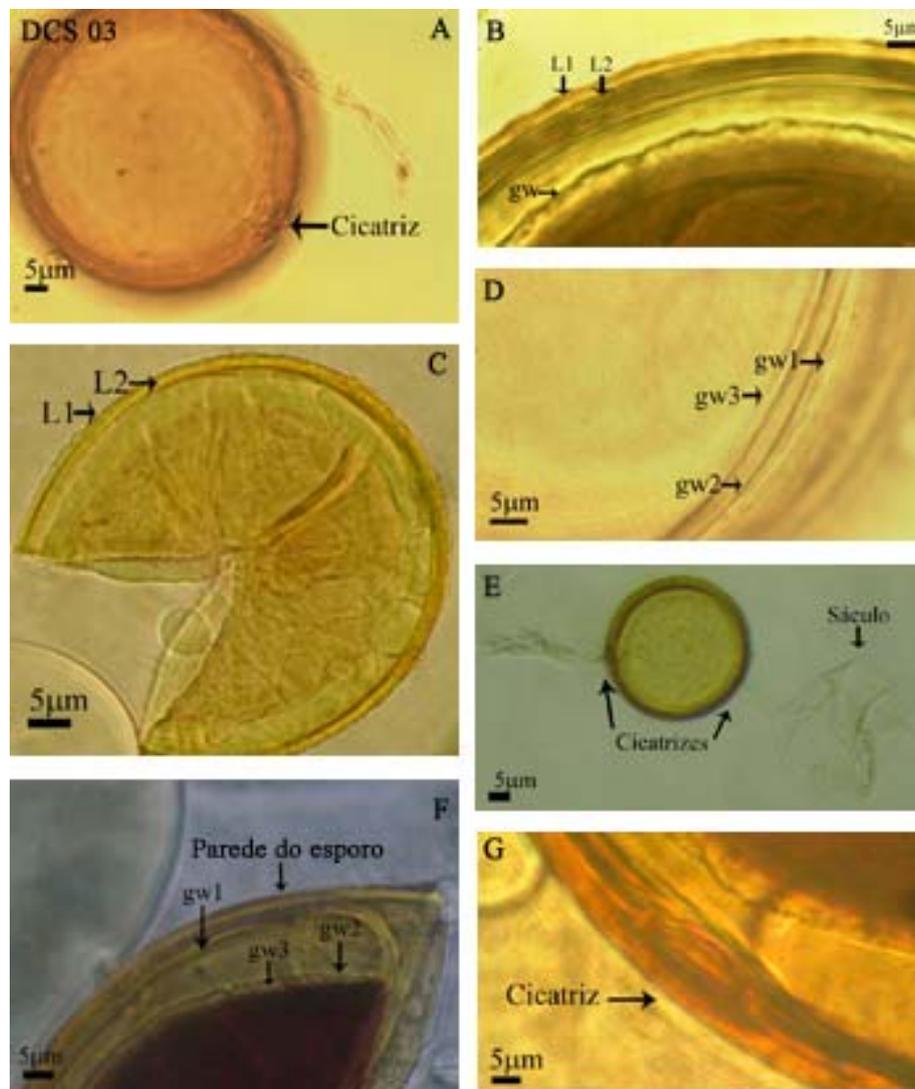


FIGURA 6 *Kuklospora colombiana* (DCS 03). Esporo individual mostrando a cicatriz (A e G), detalhes das camadas da parede do esporo (B, C, D e F) sáculo e hifa de sustentação (E).

#### **4.2.4 DCS 11, 12 e 13 - Isolados de *Glomus etunicatum* (Becker & Gerdemann, 1977)**

Os diferentes isolados de *Glomus etunicatum* estudados não apresentaram diferenças em seus caracteres morfológicos, o que não permitiria uma separação destes, caso eles fossem misturados em decorrência de contaminação. Os esporos analisados estavam maduros o que permitiu a visualização das camadas L1 e L2 (Figura7). A L1 é a primeira camada a ser formada e compõe a parede da hifa de sustentação de esporos jovens, ela consiste numa camada exterior mucilaginosa e hialina, com alguma plasticidade e superfície exterior desigual, reage com reagente de melzer apresentando a coloração rosa (0-60-30-10) ou avermelhado-púrpura (20-80-60-0), em esporos maduros ela pode encontrar-se como uma camada granular em decorrência de sua fácil degradação com a idade do espora (INVAM, 2007). A camada L2 é inicialmente formada por uma camada única e se espessa com a formação de novas subcamadas com as mesmas propriedades fenotípicas, formando uma camada laminada da parede do espora (INVAM 2007).

Na maioria dos esporos analisados, a camada mucilaginosa (L1) ainda foi encontrada, no entanto apareciam em fase de degradação, estando com aparência de camada granular. Os esporos variaram de 74-198µm em diâmetro. Foi possível a visualização da hifa suspensora, a qual apresenta uma forma cilíndrica ligeiramente afunilada tendo sua parede composta pelas duas camadas (L1 e L2) contínuas com as duas camadas da parede do espora, no entanto, a camada exterior (L1), normalmente apresenta-se apenas na base da hifa suspensora sem prolongar-se por toda hifa. É através do lúmen da hifa suspensora que o tubo germinativo se desenvolve promovendo a germinação do espora.

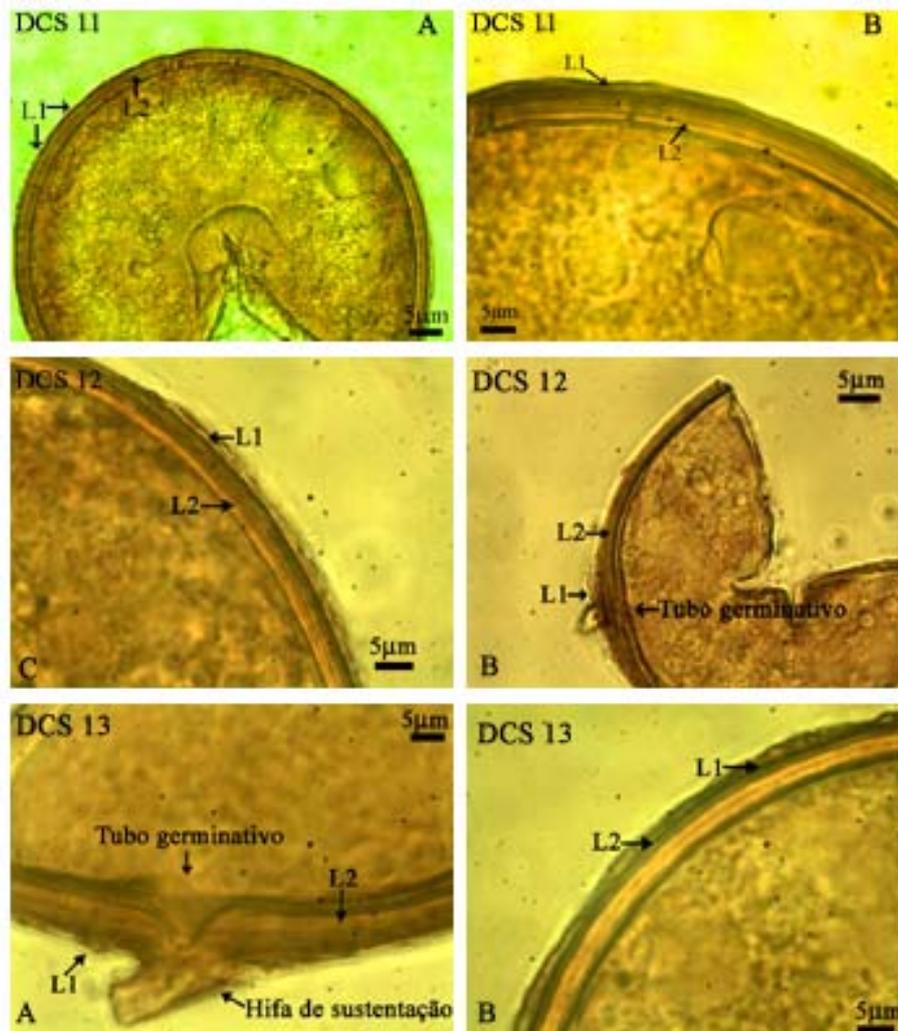


FIGURA 7 *Glomus etunicatum* (DCS 11, 12 e 13). Detalhes das camadas da parede do esporo (L1 e L2) (DCS 11 A e B, 12 A e 13 B) hifa de sustentação e tubo germinativo (DCS 12 B e 13 A).

#### **4.2.5 DCS 09 e 10 - Isolados de *Glomus clarum* (Nicolson & Schenck, 1979)**

Os esporos de *Glomus clarum* se formam isolados ou agrupados no solo, freqüentemente também são formados dentro das raízes. Os esporos analisados possuem um diâmetro de 100 a 260 $\mu$ m, com coloração branco a um amarelo-marrom (0-10-60-0). Com um conteúdo de glóbulos lipídicos de tamanhos variados, sua forma varia de globosa a semi-globosa. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3) (Figura 8), a L1 forma um contínuo desde a hifa de sustentação, decompondo à medida que o esporo vai se desenvolvendo (INVAM, 2007). As diferentes camadas se unem estreitamente entre si, exceto a L3 que quando o esporo apresenta-se em estado maduro é possível separá-la dependendo da pressão aplicada ao esporo (Nicolson & Schenck, 1979; INVAM, 2007).

Os diferentes isolados de *Glomus clarum* analisados não apresentaram diferenças em seus caracteres morfológicos (Figura 8), o que também não permitiria uma separação destes, caso ocorresse contaminação dos vasos de cultivo. Os esporos estavam maduros o que permitiu a visualização de seus caracteres morfológicos, apresentando formas globosas e sub-globosas com coloração branca. A coloração amarelada da camada mais interna envolta por um alo transparente trata-se de uma característica típica desta espécie e pode ser facilmente visualizada em esporos maduros. Foi possível a visualização da parede do esporo e das três camadas (L1, L2 e L3) que a compunha. Estas camadas formam consecutivamente com a diferenciação da parede do esporo (INVAM, 2007). O diâmetro dos esporos analisados variou de 100 a 200 $\mu$ m, o tubo de germinação parece surgir do interior da subcamada da hifa de sustentação.

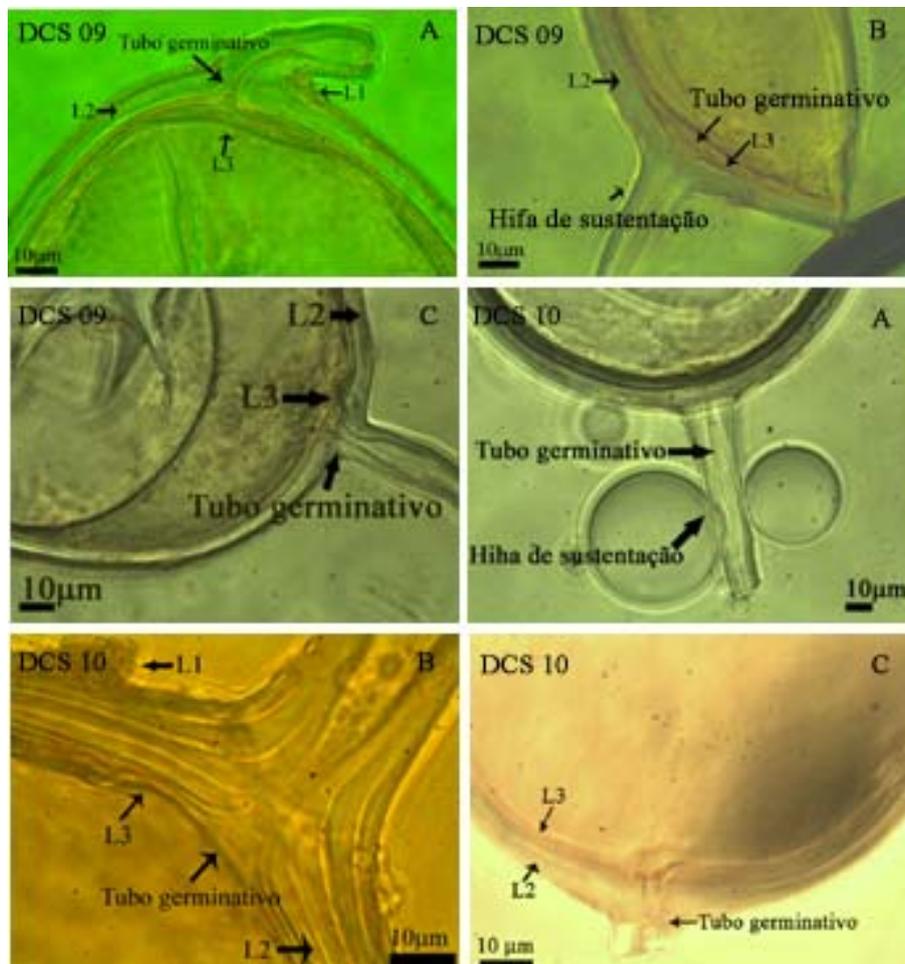


FIGURA 8 *Glomus clarum* (DCS 10 e DCS 09). Detalhes das camadas da parede do esporo, hifa de sustentação e tubo germinativo (DCS 10 e 09 A, B e C).

#### **4.2.6 DCS 06, 24, 31 e 32 - Isolados de *Glomus diaphanum* (Morton & Walker, 1984)**

Os isolados DCS 06 e DCS 24 foram inicialmente chamados de “*Glomus thin Green*”, e os isolados DCS 31 e DCS 32 foram anteriormente identificados como sendo *Acaulospora delicata* e *Paraglomus occultum*, respectivamente. No entanto através da caracterização morfológica todos estes isolados foram re-identificados como sendo *Glomus diaphanum*. Estas diferenças na identificação destes isolados pode ter sido em decorrência de erro na identificação inicial ou devido à contaminação dos vasos de cultivo por *Glomus diaphanum* durante as repicagens anteriores na coleção, o que pode ter suprimido a espécie inicialmente identificada.

Os diferentes isolados de *Glomus diaphanum* analisados (DCS 06, 24, 31 e 32) não apresentaram diferenças em seus caracteres morfológicos (Figura 9), o que não permitiria uma separação destes, caso ocorresse contaminação dos vasos de cultivo. Os esporos analisados possuem um diâmetro variando de 60 a 100µm, apresentando formas globosas e sub-globosas com coloração hialino brilhante. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3), a L1 é difícil de ser observada devido a sua decomposição à medida que o esporo vai se desenvolvendo (INVAM, 2007). A L2 é composta por sub-camadas firmemente aderidas (laminada) e a L3 possui uma protrusão para o interior da hifa de sustentação, o tubo germinativo parece surgir do interior da subcamada da hifa de sustentação. A parede da hifa de sustentação parece ser composta por três camadas contínuas com a parede do esporo.

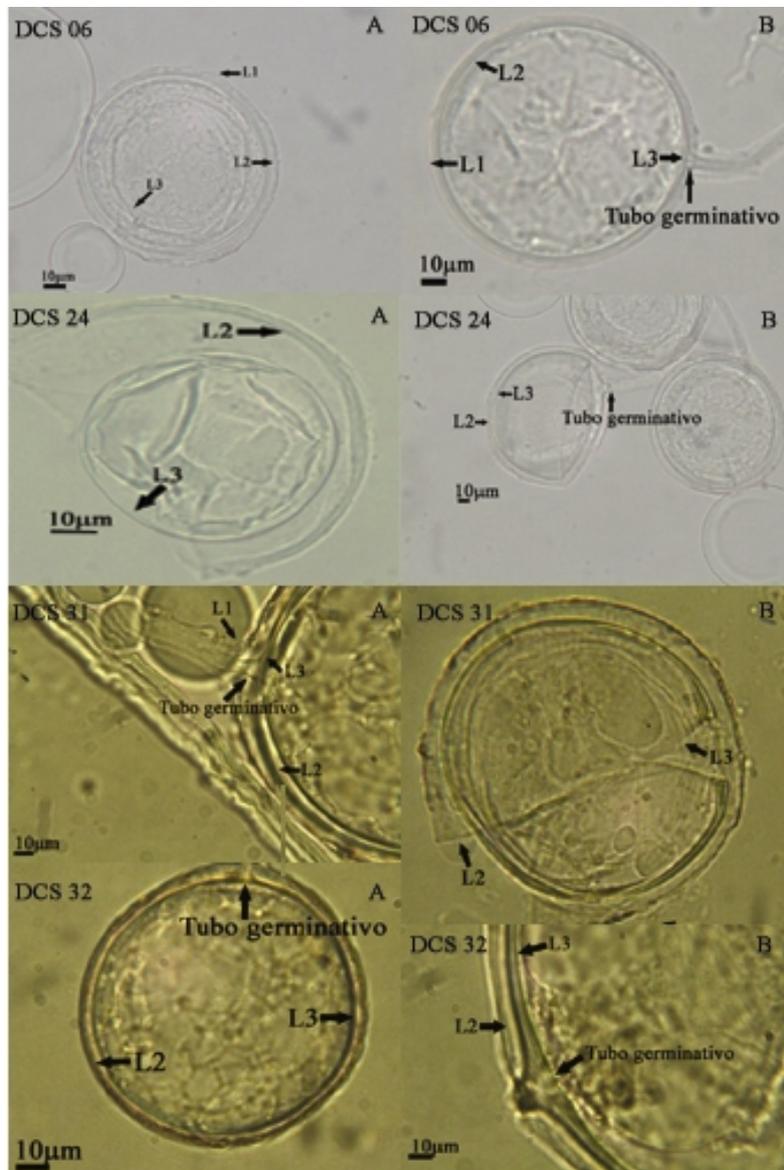


FIGURA 9 *Glomus diaphanum* (DCS 06, 24, 31 e 32). Esporo individual, mostrando as camadas da parede do esporo (DCS 06 A, 24 A, 31 B e 32 B). Esporo individual mostrando as camadas da parede do esporo e o tubo germinativo (DCS 06 B, 24 B, 31 A e 32 A).

#### **4.2.7 DCS 08 - *Gigaspora margarita* (Becker & Hall, 1976)**

Os esporos de *Gigaspora margarita* se desenvolvem basicamente de uma célula bulbo suspensora formada na posição terminal de uma hifa fértil conectada a uma raiz colonizada por este fungo (Bentivenga & Morton 1995; Walker & Sanders 1986). Os esporos analisados possuem forma variando de globosa a sub-globosa com 260µm (252-268) diâmetro médio, coloração branco perolado (0-0-5-0) e amarelo (0-10-40-0). A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3) (Figura 10 F e G), as duas primeiras possuem a mesma espessura e encontram-se aderidas quando em esporos jovens (INVAM, 2007). A L1 é uma camada externa rígida, lisa, ou seja, sem ornamentações, e aderida a L2. A L2 é uma camada semi-plástica que consiste em subcamadas hialinas que reagem com o reagente de Melzer adquirindo uma coloração vermelho-marrom (60-80-70-10). A L3 é uma camada germinativa verrugosa, da qual surgem os tubos germinativos. Esta parede está firmemente aderida à superfície interna da camada da parede do esporo laminada (L2). A célula bulbo possui uma parede composta por duas camadas hialinas (L1 e L2) que provavelmente são contínuas com as primeiras duas camadas da parede de esporo, mas apenas a L2 é prontamente visível.

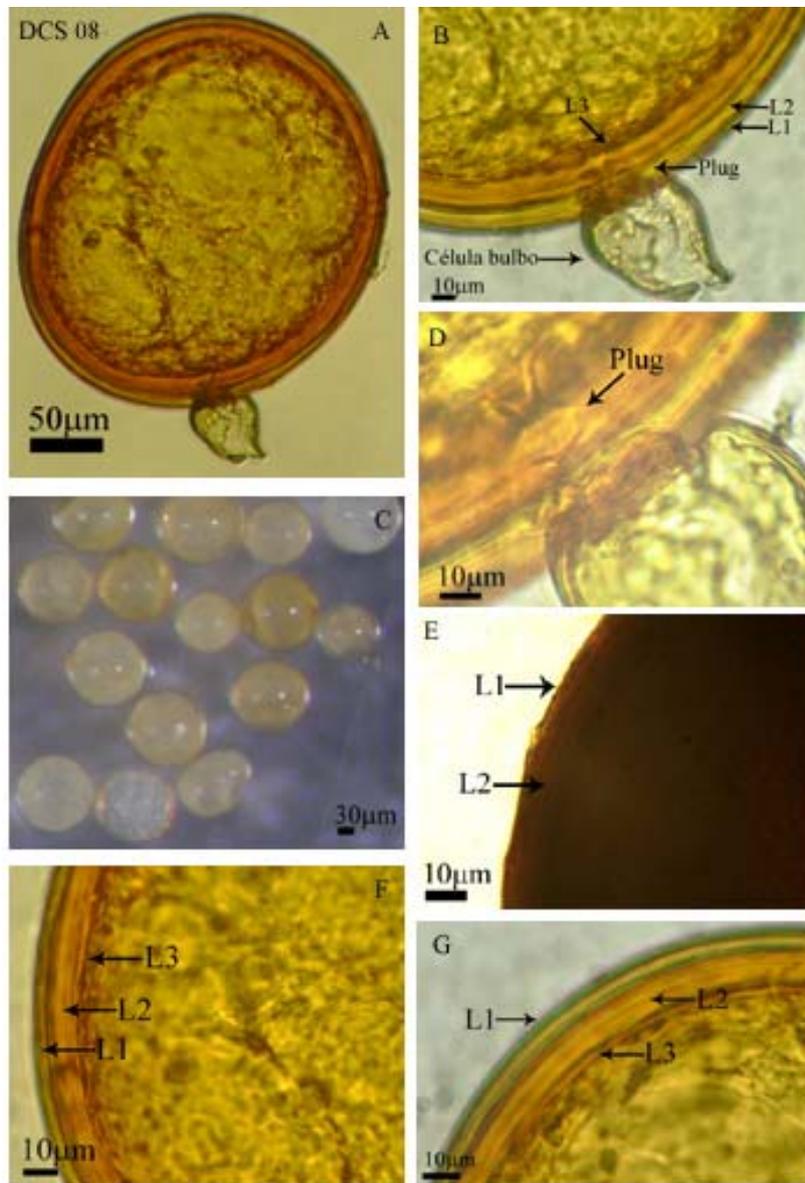


FIGURA 10 *Gigaspora margarita* (DCS 08). Esporo individual (A). Detalhe das camadas da parede do esporo (B, D, E e F), célula bulbo e plug (B, D). Grupo de esporos em água (C).

#### 4.2.8 DCS 22 - *Gigaspora albida* (Schenck & Smith, 1982)

Os esporos analisados tiveram forma variando de globosa a sub-globosa, com 246 $\mu$ m diâmetro médio, com coloração creme (0-0-15-0) a (0-0-20-0). A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3) (Figura 11). A L1 é uma camada externa rígida, hialina (0-0-5-0) a amarelo claro (0-0-10-0), lisa, ou seja, sem ornamentações. A L2 consiste em subcamadas de coloração amarelo (0-10-60-0) corando em reagente de Melzer adquirindo uma coloração vermelho-marrom (60-80-70-10). A L3 é uma camada germinativa verrugosa, da qual surgem os tubos germinativos. Esta parede está firmemente aderida à superfície interna da L2. A célula bulbo possui uma parede composta por duas camadas hialinas (L1 e L2) que provavelmente são contínuas com as primeiras duas camadas da parede de esporo, mas apenas a L2 é prontamente visível.

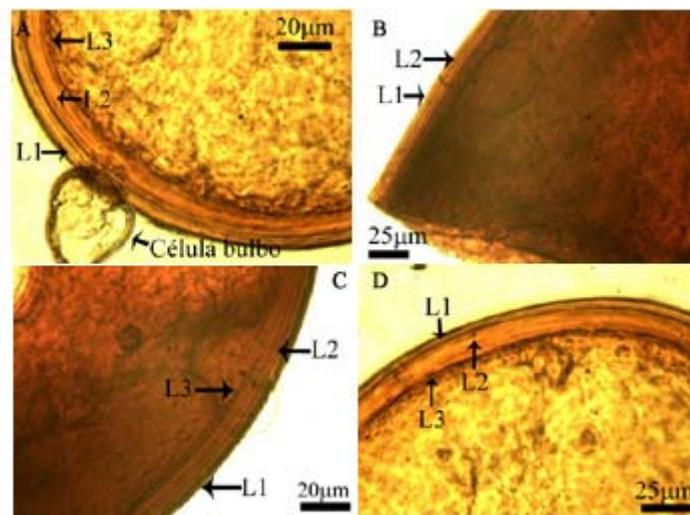


FIGURA 11 *Gigaspora albida* (DCS 22). Detalhe da célula bulbo (A) e camadas da parede do esporo (A, B, C e D).

#### **4.2.9 DCS 05 - *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe, 1974.**

Os esporos analisados possuem tamanhos variando entre 240 a 411µm, com coloração amarelo brilhante esverdeado, no entanto, a coloração não está somente na parede do esporo, como é comum para outras espécies, estando presente também no citoplasma. Sua forma varia de globosa a sub-globosa. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3) (Figura 12). A L1 é uma camada externa rígida, lisa, ou seja, sem ornamentações. A L2 é uma camada semi-plástica que consiste em subcamadas amarelas que reagem com o reagente de Melzer adquirindo uma coloração vermelho-marrom escuro (60-80-70-10). A L3 é uma camada germinativa verrugosa, da qual surgem os tubos germinativos. Esta parede está firmemente aderida à superfície interna da camada L2 (camada laminada). A célula bulbo suspensora (célula esporogênica) possui uma parede composta por duas camadas hialinas (L1 e L2) que provavelmente são contínuas com as primeiras duas camadas da parede de esporo, mas apenas a L2 é prontamente visível (IVAM, 2007). No entanto, não foi possível a visualização da célula bulbo, pois ela não estava presente nos esporos analisados, podendo ter sido perdida no processo de extração dos esporos.

Esta estirpe foi isolada de áreas de cultivo de café em Lavras-MG e possui características morfológicas similares às de *Gigaspora gigantea*, no entanto, Souza et al. (2004), estudando um método de identificação de espécies do gênero *Gigaspora*, baseando-se na discriminação do polimorfismo inter e intra-específico da região V9 do 18S rDNA técnica do PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) encontrou um padrão de bandas que permitiu a diferenciação deste isolado, não somente das outras estirpes de *Gigaspora gigantea*, como também, de todas as estirpes de *Gigaspora* conhecidas. Sugerindo que este isolado constitua uma espécie não descrita e que possivelmente será descrita como *Gigaspora lutea* (Souza, Siqueira & Walker).

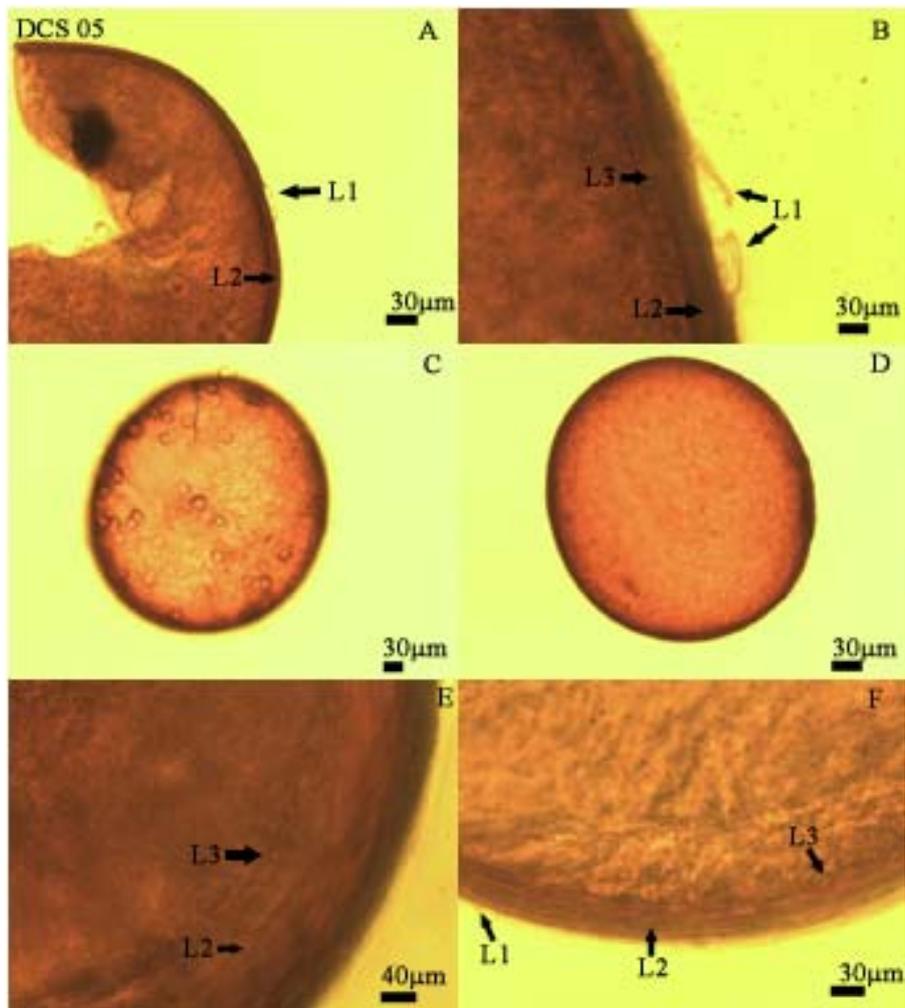


FIGURA 12 *Gigaspora gigantea* (DCS 05). Detalhes das camadas da parede do esporo (A, B, E e F) e esporos individuais (C e D).

#### **4.2.10 DCS 19-*Scutellospora heterogama* (Walker & Sanders, 1985)**

Os esporos de *Scutellospora heterogama* se desenvolvem basicamente de uma célula bulbo formada no fim de uma hifa fértil conectada a uma raiz colonizada por este fungo (Bentivenga & Morton 1995; Walker & Sanders 1986). Os esporos possuem um diâmetro variando de 149 a 104µm, com coloração variando de laranja-marrom (0-60-100-10) a um vermelho-marrom (40-80-100-0). Com forma oblonga. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2 e L3) (Figura 13 H). A L1 é uma camada externa rígida e permanente com ornamentações que consistem em curtas verrugas (INVAM, 2007), estas ornamentações não foram encontradas nos esporos analisados, esta camada possui coloração marrom claro (0-30-50-10). A L2 é uma camada que consiste em subcamadas que reagem com o reagente de Melzer adquirindo uma coloração vermelho-marrom escuro. A L3 é uma camada flexível hialina e muito fina, pode ser vista em esporos vigorosamente esmagados, normalmente próxima ao plug de oclusão da célula bulbo, essa camada não foi visualizada com boa definição nos esporos analisados.

Duas paredes germinativas estão presentes (gw1 e gw2), elas são duas camadas flexíveis internas e hialinas, são formadas separadamente da parede do esporo. A gw1 é formada por duas camadas (L1 e L2) firmemente aderidas. A L1 é menor que 0,5 µm em espessura; A L2 é ligeiramente mais espessa (0,8-1,5 µm). Ambas as camadas são finas o suficiente para estarem firmemente aderidas, elas aparecem como uma única camada. Porém, às vezes a L1 separa em pedaços e se assemelha a "verrugas" ou ondulações na parede (INVAM, 2007). A gw2 é formada por duas camadas (L1 e L2) firmemente aderidas. A L1 possui 0,5-0,8µm em espessura; A L2 possui 0,9-1,8µm em espessura. Ambas as camadas são finas suficiente para aparecer como uma única camada em PVLG. Porém, só a L2 adquire coloração rosa em reagente de Melzer. O escudo germinativo possui forma oblonga (Figura 12 A, B, C, D e E).

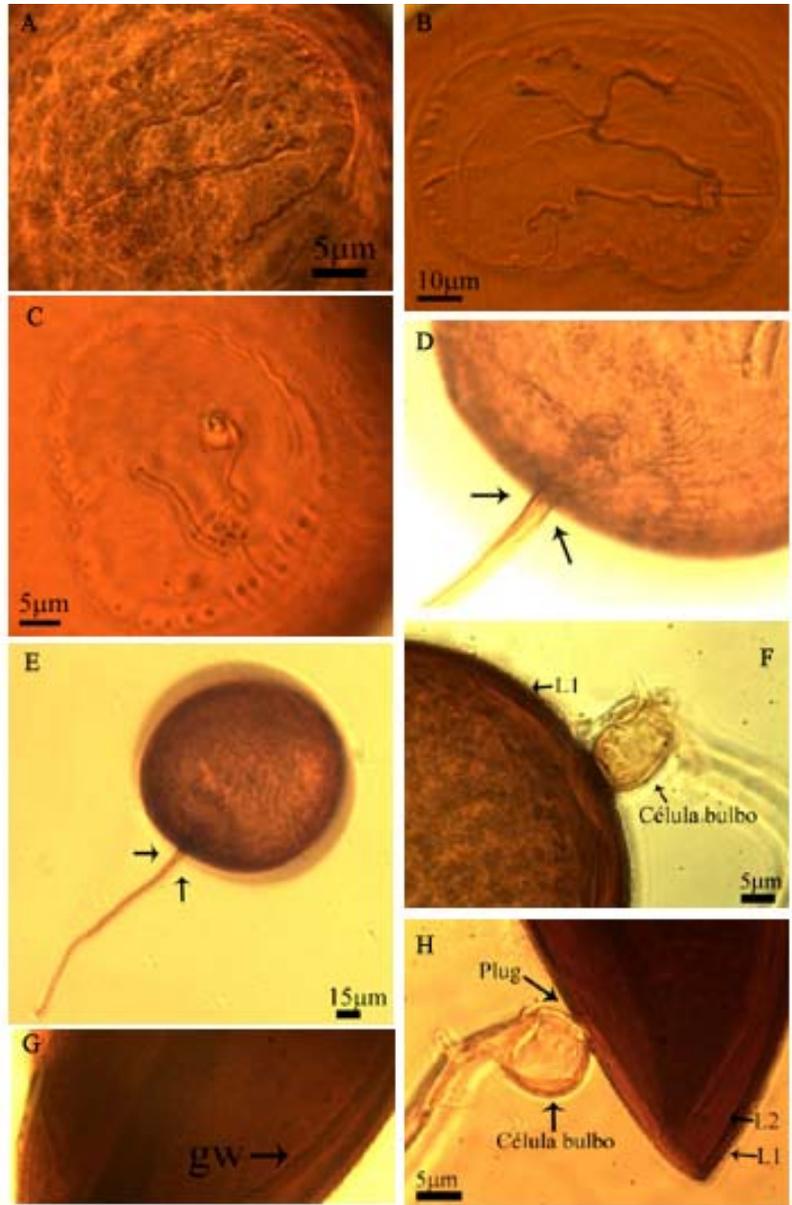


FIGURA 13 *Scutellospora heterogama* (DCS 19). Detalhe do escudo germinativo (A, B, C, D e E), célula bulbo e camadas da parede do esporo (F e H).

#### 4.2.11 DCS 18- *Scutellospora gregária* (Schenck & Nicolson) Walker & Sanders (1986)

Os esporos analisados possuem tamanhos variando de 289 a 368 $\mu$ m, com coloração vermelho-marrom (40-80-80-0) variando um pouco na tonalidade. Sua forma varia de globosa a sub-globosa. A parede do esporo é composta por duas camadas (L1 e L2) (Figura 14). A L1 é uma camada externa rígida e permanente, vermelho- marrom escura com ornamentações (verrugas arredondadas). A L2 é uma camada que consiste em subcamadas, que parecem marrom escuro devido à cobertura da L1, no entanto parecem ser hialinas ou amarelo claro que reagem com o reagente de Melzer adquirindo uma coloração vermelho-marrom escuro. Possui apenas uma parede germinativa (gw1) que é uma camada flexível interna e hialina formada independente da parede do esporo e da hifa de sustentação (INVAM, 2007), com duas camadas aderentes (L1 e L2) não sendo observado nenhuma reação em reagente de Melzer.

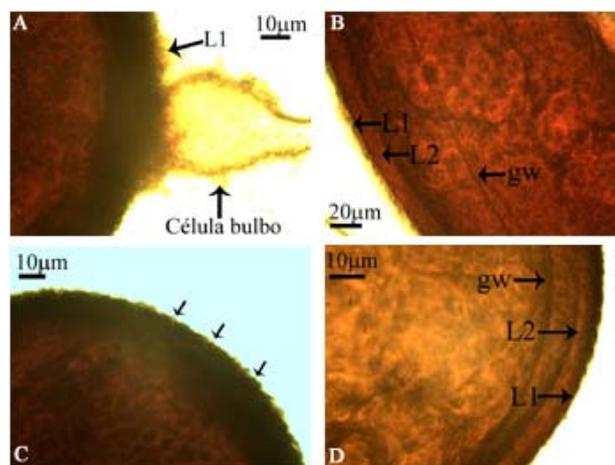


FIGURA 14 *Scutellospora gregária* (DCS 18). Detalhe da célula bulbo (A), camadas L1 e L2 da parede do esporo, camada germinativa (B e D) e ornamentação da parede do esporo (C).

#### 4.2.12 DCS 27- *Scutellospora rubra* (Stürmer & Morton, 1999)

Este isolado estava registrado nos cadernos de registros da coleção do DCS-UFLA como *Glomus rubiforme*. No entanto, com a caracterização morfológica ele foi identificado como sendo *Scutellospora rubra*. Os esporos analisados possuem tamanhos variando de 130 a 200 $\mu$ m, com coloração vermelho-marrom (40-80-80-0). Possui forma globosa. A parede do esporo é composta por três camadas (L1, L2, L3) (Figura 15). A L1 é uma camada externa rígida e permanente, vermelho- marrom clara. A L2 é uma camada que consiste em subcamadas. Possui duas paredes germinativas (gw1 e gw2) formadas por duas camadas cada (L1 gw e L2 gw).

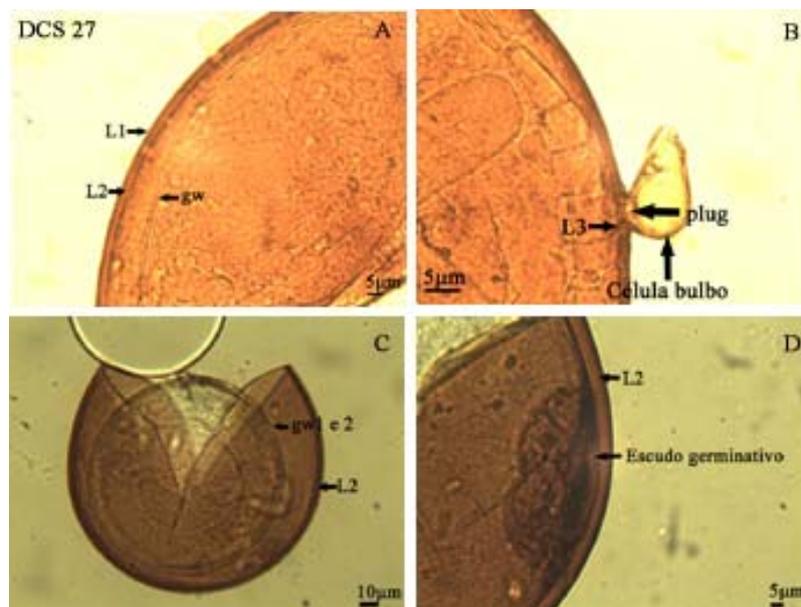


FIGURA 15 *Scutellospora rubra* (DCS 27). Detalhes das camadas da parede do esporo (A), célula bulbo (B), camadas germinativas da parede do esporo (A e C) e escudo germinativo (D).

### 4.3 Análise de PCR-DGGE

A análise de DGGE das ampliações utilizando-se os iniciadores NS7-GC e F1Ra foi eficiente para separação das espécies (Figura 16), inclusive espécies pertencentes ao mesmo gênero, demonstrando que a região amplificada apresenta polimorfismo entre as espécies analisadas e que de acordo com o número e posição das bandas no gel de poliacrilamida é possível diferenciar as espécies de FMAs testadas.

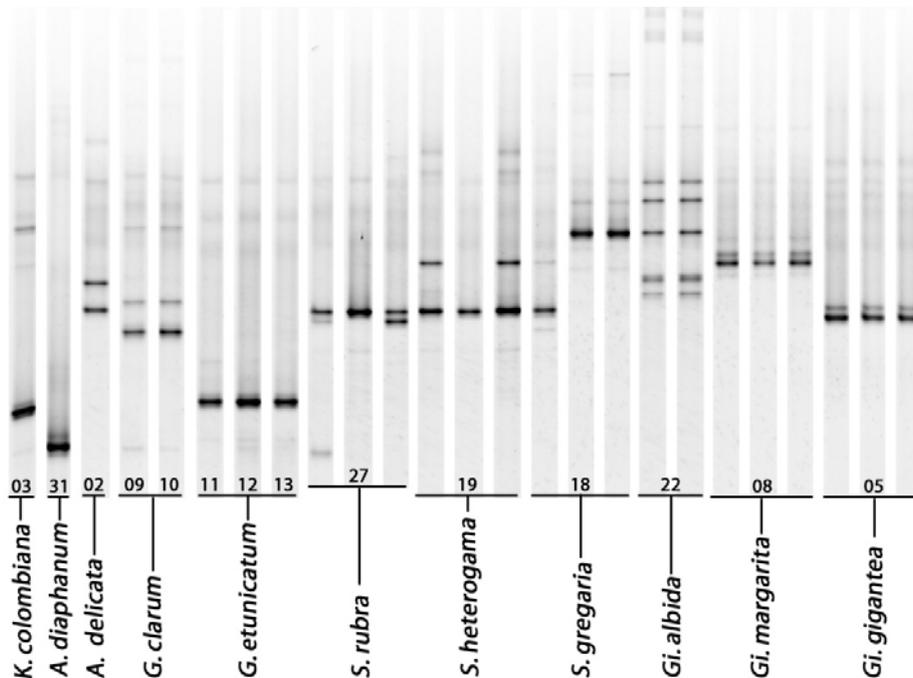


FIGURA 16 Perfis de DGGE da região V9 da subunidade menor do gene ribossomal (18S rRNA) de 14 isolados da coleção de FMAs do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Gel com 7% de acrilamida e gradiente de 32 a 42%.

No entanto, o emprego desta técnica aplicada a esta região não mostrou diferenças nos padrões de bandas obtidas para os diferentes isolados de *G. clarum* que obtiveram 100% de similaridade (Figura 17), estes isolados migraram sempre na mesma proporção no gel e não poderiam portanto serem distinguidos. O mesmo ocorreu entre os diferentes isolados de *G. etunicatum* (Figura 17) e *G. diaphanum* (Figura 18), duas bandas intensas foram detectadas para os isolados de *G. clarum* e uma banda intensa foi obtida pelos isolados de *G. etunicatum* e *G. diaphanum*, sendo que *G. diaphanum* migrou mais no gel que *G. etunicatum*. Souza et al. (2004) utilizando-se da mesma técnica e região do 18S rDNA (região V9) encontrou diferenças claras no padrão de bandas de vários isolados geográficos de *Gigaspora albida*, *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita*, inclusive de dois isolados de *G. gigantea* isolados do mesmo sítio na Califórnia do Norte, Estados Unidos, indicando a capacidade da técnica em separar diferentes isolados de uma mesma espécie. Assim, pode-se sugerir que o agrupamento dos diferentes isolados de *G. clarum*, *G. diaphanum* e *G. etunicatum* pode ter sido em decorrência da ausência de polimorfismos entre os diferentes isolados de mesma espécie na região gênica analisada. Outras regiões gênicas ou genes devem ser analisados para que se possa concluir se existem diferenças genéticas entre esses isolados.



FIGURA 17 Dendrograma mostrando a similaridade entre perfis de bandas de PCR-DGGE de 6 estirpes de *Glomus*. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas através do Coeficiente de Jaccard (Tol 1.0% -1.0%) (H>0.0% S>0.0%)[0.05 – 100%].

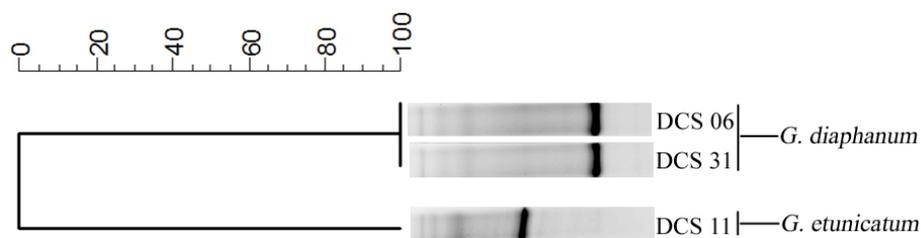


FIGURA 18 Dendrograma mostrando a similaridade entre perfis de bandas de PCR-DGGE de 3 estirpes de *Glomus*. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas através do Coeficiente de Jaccard (Tol 1.0% -1.0%) (H>0.0% S>0.0%)[0.05 – 100%]. Gel com 7% de acrilamida e gradiente de 35 a 45% de desnaturante.

A análise de agrupamento dos padrões de bandas obtidos por diferentes esporos do mesmo vaso dos isolados DCS 05 (*G. gigantea*), DCS 08 (*G. margarita*) e DCS 22 (*G. albida*) (Figura 19) sugere que estes vasos estavam puros obtendo 100% de similaridade entre os diferentes esporos do mesmo isolado. Esta técnica de PCR-DGGE basea-se na discriminação do polimorfismo inter e intra-específico da região V9 do 18S rDNA, foi desenvolvida por Souza et al. (2004) como um método sensível e eficiente para identificação de espécies do gênero *Gigaspora*. O desenvolvimento de métodos moleculares para discriminação de espécies é extremamente importante e de grandiosa utilidade, uma vez que existem poucos caracteres morfológicos úteis para discriminação entre as espécies na maioria dos gêneros de FMA. Um exemplo é o caso da *Gigaspora*, as espécies conhecidas apresentam grandes semelhanças morfológicas, e grande sobreposição de caracteres, como cor e tamanho dos esporos. Além disso, essas características são passíveis de serem alteradas por pressões do ambiente (pH, conteúdo de argila, etc), o que dificulta ainda mais a discriminação (Bentivenga & Morton, 1995). A análise de similaridade do padrão de bandas dos isolados de *Gigaspora* (Figura 19) faz uma evidente distinção das espécies deste gênero permitindo sugerir uma fácil detecção de

contaminação caso houvesse alguma contaminação entre estes isolados, o que seria extremamente trabalhoso constatar através de técnicas baseadas na morfologia dos esporos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que essa técnica também pode ser utilizada para a identificação de espécies pertencentes a outros gêneros.

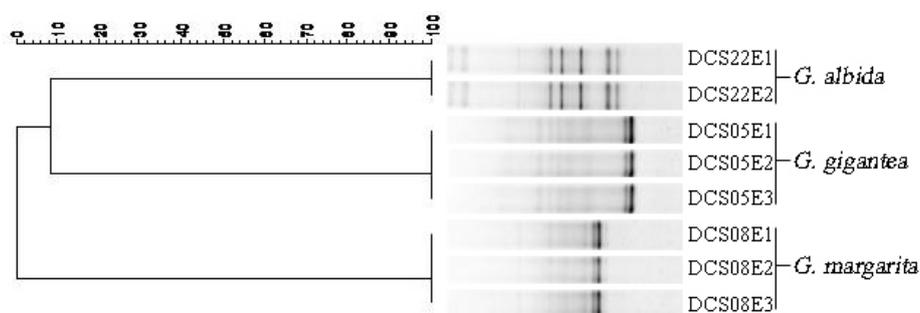


FIGURA 19 Dendrograma mostrando a similaridade entre perfis de bandas de PCR-DGGE de 3 estirpes de *Gigaspora*. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas através do Coeficiente de Jaccard (Tol 1.0% -1.0%) (H>0.0% S>0.0%)[0.05 – 100%].

O padrão de banda obtido por um dos esporos (DCS18R3) do isolado DCS 18 (*S. gregaria*) (Figura 20) difere completamente dos padrões obtidos pelos outros esporos deste isolado (DCS18R1 e DCS18R2) possuindo maior similaridade com o isolado DCS 19 (*S. heterogama*), o mesmo ocorreu com o padrão obtido por um dos esporos do isolado DCS 19 (*S. heterogama*) (DCS19E2) que se diferiu do padrão obtido pelos demais esporos deste isolado (DCS19E1 e DCS19E3). Isso sugere que os isolados DCS 18 e DCS 19 podem estar contaminados com diferentes morfoespecies não detectadas na caracterização morfológica. O mesmo ocorreu com o isolado *Scutellospora rubra* (DCS 27) o qual apresentou padrões de bandas diferentes para cada esporo analisado (Figura 20). Trabalhos adicionais podem/devem ser conduzidos a fim

de detectar se o ocorrido foi em virtude de contaminação ou se foi devido à existência de polimorfismo dentro da espécie.

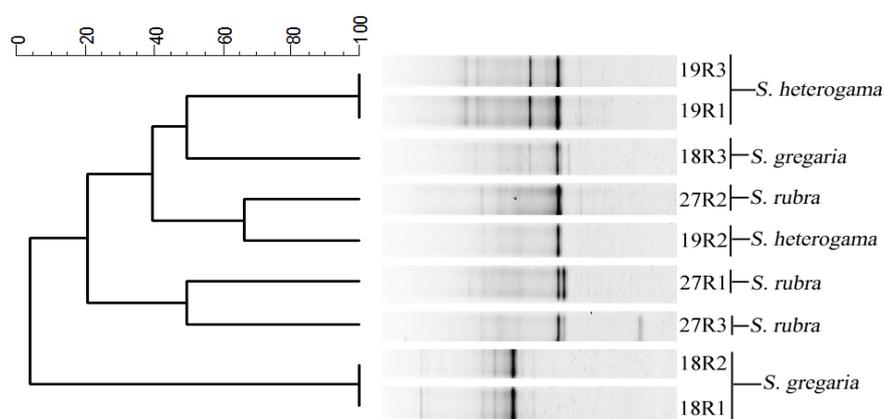


FIGURA 20 Dendrograma mostrando a similaridade entre perfis de bandas de PCR-DGGE de 3 estirpes de *Scutellospora*. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas através do Coeficiente de Jaccard (Tol 1.0% -1.0%) (H>0.0% S>0.0%)[0.05 – 100%].

Não existem dúvidas sobre a importância da correta identificação taxonômica para a pesquisa com FMA, principalmente para condução de estudos sobre genética e ecologia desses fungos. Além disso, embora os FMAs não apresentem especificidade em relação ao hospedeiro, eles são altamente específicos em relação a seus efeitos nas plantas. Essa especificidade pode ser observada não somente no nível de espécies, mas também de isolados (Paula et al., 1988). O que torna fundamental que os pesquisadores conheçam a identidade dos fungos com os quais estão trabalhando, para que possam comparar resultados e possibilitarem sua reprodução por outros grupos. A técnica de PCR-DGGE demonstrou-se como sendo um método bastante rápido e confiável para a identificação e caracterização de espécies de FMAs.

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação de Mycoform™ mudou o padrão de colonização e esporulação dos isolados de Fungos Micorrízicos Arbusculares estudados. A aplicação do produto aumentou a colonização e a esporulação, mas este efeito não ocorreu em todos os isolados avaliados. Apenas 31% e 54% destes responderam positivamente ao produto para colonização e esporulação, respectivamente.

Os isolados de FMAs da coleção DCS-UFLA avaliados apresentaram características morfológicas similares às encontradas para espécies descritas.

O uso de PCR-DGGE permitiu a diferenciação das espécies e mostrou nenhuma diferença entre os isolados da mesma espécie, que foram estudados e permitiu detectar contaminações não observadas pela caracterização fenotípica

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.D. J.; BROUILLETTE, J.; BECARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v.121. p.263-272, 1999.
- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p.949-958, 2000.
- BAREA, J.M. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: TOUTANT, J.P., BALAZS, E. (Ed.), **Biological resource management: Connecting Science and Policy** (OECD). Berlin: Springer, 2000. p. 110–125.
- BÉCARD, G.; KOSUTA, S.; TAMASLOUKHT, M.; SÉJALON-DELMAS, N.; ROUX, C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.1186-1197, 2004.
- BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, Dordrecht, v.112, p.77-83, 1989.
- BENTIVENGA, S.P.; MORTON, J.B. A monograph of the genus *Gigaspora* incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia**, v.87, p.720-732, 1995.
- BERCH, S.M. Endogonaceae: taxonomy specificity, fossil record phylogeny. In: MUKERJI, K.G.; SINGH, V.P. (Ed.). **Frontiers of applied microbiology**. Luknow: Print House, 1987. p.161-188.
- BERCH, S.M.; KOSKE, R.E. *Glomus pansihalos*, a new species in the Endogonaceae, Zygomycetes. **Mycologia**, v.78. p.832-836, 1986.
- BECKER, W.N.; GERDEMANN, J.W. *Glomus etunicatus* sp. **Mycotaxon**, Ithaca, v.6, p. 29-32, Nov. 1977.
- BECKER, W.N.; HALL, I.R. *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. **Mycotaxon**, Ithaca, v.4, p.155–160, 1976.

BRUNS, T.D.; GARDES, M. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-Taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Molecular Ecology**, v.2, p.1–10, 1993.

CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agrofor. Syst.**, v.58, p.33-43, 2003.

DAVIES Jr., F.T.; EGILLA, J.N.; MILLER Jr., J.C.; SARAIVA GROSSI, J.A. Influence of mycorrhiza and an isoflavonoid on plant growth and gas exchange of potatoes started from minitubers. **Scientia Horticulturae**, v.34, n.3, p.498, 1999.

DAVIES Jr., F.T.; CALDERÓN, C.; HUAMAN, Z.; GÓMEZ, R. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru, **Scientia Horticulturae**, v.106, n.3, p.318-329, 2005.

DECLERCK, S.; RISEDE, J.M.; RUFYIKIRI, G.; DELVAUX, B. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on severity of root rot of bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. **Plant Pathology**, v.51, p.109-115, 2002.

DOUDS, D.D.; MILLNER, P.D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.77-93, 1999.

FITTER, A.H.; GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant and Soil**, v.159, p.123-132, 1994.

FRANKE, M.; MORTON, J.B. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions and phylogenetic hypothesis. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.122-134, 1994.

GANDOLFI, A.; SANDERS, I. R.; ROSSI, V.; MENOZZI, P. Evidence of recombination in putative ancient asexuals. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.20, p.754-761, 2003.

GERDEMANN, J.N.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of British Mycorrhizal Society**, Cambridge, v.46, p.235-244, 1963.

- GERDEMANN, J.W.; TRAPPE, J.M. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. **Mycologia Memoir**, New York, v. 5, p.1-76, 1974.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; VAN TUINEN, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; DULIEU, H. Exploring the genome of Glomalean fungi. In: HOCK, B. (Ed.). **The mycota, fungal associations**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p.3-17.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, 1980.
- GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C. Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. **Mycorrhiza**, v.8, p.123–130, 1998.
- GUPTA, R.; KUMAR, P. Mycorrhizal plants in response to adverse environmental conditions. In: MUKERJI, K.G.; CHAMOLA, B.P.; SINGH, J. (Ed.). **Mycorrhizal biology**. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2000. p.67-84.
- HARRISON, M. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.19-42, 2005.
- HARRISON, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.361-389, 1999.
- HECKMAN, D.S.; GEISER, D.M.; EIDELL, B.R.; STAUFFER, R.L.; KARDOS, N.L.; HEDGES, S.B. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, v.293, p.1129-1133, 2001.
- HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Ploughing up the wood-wide-web? **Nature**, v. 394, n.394, p.431, 1998.
- HELGASON, T.; MERRYWEATHER, J.W.; DENISON, J.; WILSON, P.; YOUNG, J.P.W.; FITTER, A.H. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. **Journal of Ecology**, Oxford, v.90, p.371-384, 2002.

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; TURNER, S.L.; GALLERY, R.; YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2669-2678, 2002a.

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; YOUNG, J.P.W. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, p.131-136, 2002b.

INVAM. **International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi**. Species Description. Morgantown: West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station, 2000. Disponível em: <<http://www.invam.caf.wvu.edu>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza: structure, function, molecular biology**. 2<sup>nd</sup>ed. Berlin: Springer, 1999. p.535-542.

JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. In: BETHANFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. ASA, 1993. p.71–100. (ASA Special Publication, 54).

JUGE, C.; SAMSON, J.; BASTIEN, C.; VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.; PICHE, Y. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. **Mycorrhiza**, v.42, p.12-37, 2002.

KJOLLER, R.; ROSENDAHL, S. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.226, p.189-196, 2000.

KLAUBERG FILHO, O. **Ecologia e atividade de fungos micorrizicos arbusculares em solos poluído com metais pesados**. 1999. 161p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KOIDE, R.T.; LANDHERR, L.L.; BESMER, Y.L.; DETWEILER, J.M.; HOLCOMB, E.J. Strategies for mycorrhizal inoculation of six annual bedding plant species. **Scientia Horticulturae**, v.34, p.1217–1220, 1999.

KOWALCHUK, G.A.; SOUZA, F.A. de; VEEN, J.A. van. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v.11, p.571-581, 2002.

KOSKE, R. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.76, p.328-330, 1981.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. VA mycorrhizal inoculation of Hawaiian plants: a conservation technique for endangered tropical species. **Pac. Science**, v.49, p.181-191, 1995.

KOSUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D.G.; BECARD, G. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v.131, p.952-962, 2003.

LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; LONGATO, S.; MELLO, A.; COMETTI, V.; BONFANTE, P. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza manual**. Berlin: Springer, 1998. p.353-372.

LU, X.H.; KOIDE, R.T. The effect of mycorrhizal infection on components of plant-growth and reproduction. **New Phytologist**, v.128, p.211-218, 1994.

MA, W.K.; SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.1589-1597, 2005.

MOREIRA, F.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia bioquímica do solo**. 2.ed. atual. e ampl. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MORTON, J.B. There new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminium, low pH soils in West Virginia. **Mycologia**, v.78, p.641-648, 1986.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, with an emendations of Glomaceae. **Mycotaxon**, 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 Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, v.93, p.181-195, 2001.
- MORTON, J.B.; WALKER, C. *Glomus diaphanum*: A new species in the Endogonaceae common in West Virginia. **Mycotaxon**, v.21, p.431-440, 1984.
- MORANDI, D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. **Plant and Soil**, v.185, p.241-251, 1996.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, p.36-43, 1990.
- MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. (Ed.). **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhauser, 1994.
- MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-45, 1985.
- NAIR, M.G.; SAFIR, G.R.; SCHUTZKI, R.E.; NIEMIRA, B.A. Alkali metal formononetin and method of mycorrhizal stimulation. **U.S. Patent**, #5,691,275; Nov. 25, 1997.
- NAIR, M.G.; SAFIR, G.N.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.2, p.434-439, 1991.
- NICOLSON, T.H.; GERDEMANN, J.W. Mycorrhizal endogone species. **Mycologia**, v.60, p.313-325, 1968.
- NICOLSON, T.H.; SCHENCK, N.C. Endogonaceous mycorrhizal endorhytes in: Florida. **Mycologia**, v.71, p.178-198, 1979.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E. Pacispora, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the glomeromycetes. **Journal of Applied Botany & Food Quality-Angewandte Botanik**, v.78, p.72-82, 2004.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de população de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.12, p.25–31, 1988.

SILVA-JÚNIOR, J. P. ; SIQUEIRA, J. O. . Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.9, n.1, p.35-41, 1997.

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**, v.55, n.1, p.158-161, 1970.

PIROZYNSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. The origin of land plants: A matter of mycotropism. **BioSystems**, v.6, p.153-164, 1975.

RENKER, C.; BLANKE, V.; BUSCOT, F. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. **Environmental Pollut**, v.135, p.255–266, 2005.

REDECKER, D.; MORTON, J.B.; BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.14, p.276-284, 2000.

SALLES, J.F.; SOUZA, F.A. de. **Revisões em micorriza I: técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia/Embrapa-CNPAB, 1998. 24p. (Série Documentos, 69).

SANDERS, I.R. Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. **American Naturalist**, Illinois, v.160, p.S128-S141, 2002.

SANDERS, I.R.; ALT, M.; GROPE, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**, Oxford, v.130, p.419-427, 1995.

SCHENK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: University of Florida, 1988. 242p.

SCHENCK, N.C.; SMITH, G. Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. **Mycologia**, New York, v.74, p.77-92, 1982.

SCHULTZ, P.A.; BEVER, J.D.; MORTON, J. *Acaulospora colossica* sp. nov. from an old field in North Carolina and morphological comparisons with similar species, *A. laevis* and *A. koskei*. **Mycology**, v.91, p.676-683, 1999.

SCHUBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v.105, p.1413-1421, 2001a.

SCHUBLER, A.; GEHRIG, H.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. **Mycological Research**, v.105, p.5-15, 2001b.

SCHWARZOTT, D.; SCHUSSLER, A. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. **Mycorrhiza**, v.10, p.203-207, 2001.

SCHWARZOTT, D.; WALKER, C.; SCHUSSLER, A. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.21, p.190-197, 2001.

SIEVERDING, E.; OEHL, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. **Journal Applied Botanic Food Quality**, v.80, p.69-81, 2006.

SILVA, M.M.; COLOZZI FILHO, A. Emprego de técnicas moleculares na taxonomia e em estudos sobre ecologia e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p.127-152.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.291-295, 1992a.

SIMON, L.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Rapid quantitation by PCR of endomycorrhizal fungi colonising roots. **PCR Methods and Applications**, v.2, p.76–80, 1992b.

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. 1993a.

SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and Diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, v.363, p.67-69, 1993b.

SIMON, L. Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. **New Phytologist**, v.133, p.95-101, 1996.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Review Plant Science**, v.10, p.63-121, 1991.

SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.; GIBSON, J.; HUBBEL, D. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal Microbiology**, v.31, p.965–997, 1985.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2.ed. New York: Academic, 1997. 604p.

SOUZA, F.A. de; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; VEEN, J.A. van.; SMITH, E. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus Gigaspora. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.3, p.1413-1424, 2004.

SPEKSNIJDER, A.G.C.L.; KOWALCHUK, G.A.; JONG, S.de; KLIN, E.; STEPHEN, J.R.; LAANBROEK, H.J. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.469-472, 2001.

STÜRMER, S. L. ; MORTON, J. B. *Scutellospora rubra*, a new arbuscular mycorrhizal species from Brazil. **Mycological Research**. v.103, p.949-954, 1999.

TRAPPE, J. M. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G. R. (Ed.). **cophysiology of VA mycorrhizal plants**. Boca Raton: CRC, 1987. p.5-25.

TUINEN, D.; JACQUOT, E.; ZHAO, B. van; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.879-887, 1998a.

TUINEN, D.; ZHAO, B. van; GIANINAZZI-PEARSON, V. NPCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhizal manual**. Berlin: Springer, 1998b. p.387-400.

VIERHEILIG, H.; BAGO, B.; ALBRECHT, C.; POULIN, M. J.; PICHE, Y. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. **Advantage Experimental Medicine Biology**, v.439, p.9-33, 1998.

WALKER, C. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall concepts in species descriptions. **Mycotaxon**, v.18, p.443- 455, 1983.

WALKER, C.; PFEIFFER, C.M.; BLOSS, H.E. *Acaulospora delicata* sp. nov. -- an endomycorrhizal fungus from Arizona. **Mycotaxon**, v.25, p.621-628, 1986.

WALKER, C.; SANDERS, F.E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. **Mycotaxon**, v.27, p.169-182, 1986.

WANG, G.M.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B.; WALKER, C. Effects of pH on arbuscular mycorrhiza. 1. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. **New Phytol**, v.124, p.465-472, 1993.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenies. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p.315-322.

XAVIER, L.J.C.; GERMIDA, J.J. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.181-188, 2002.

