ECOFISIOLOGIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM *Araucaria angustifolia*

MILENE MOREIRA DA SILVA ROSA DE SOUZA
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof^ª Dr^ª **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Souza, Milene Moreira da Silva Rosa de

Ecofisiologia de fungos micorrízicos arbusculares em *Araucária angustifolia* / Milene Moreira da Silva Rosa de Souza. - - Piracicaba, 2000.
108 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Ecofisiologia 3. Fósforo 4. Fungo micorrízico 5. Pinheiro-do-paraná
6. Raiz I. Título

CDD 634.9751

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor

Ofereço,

ii

A DEUS

Aos meus pais, Iraci e Carlos (*in memoriam*)
as minhas irmãs, e especialmente ao meu querido
irmão Carlos Eduardo (*in memoriam*)

Dedico,

Ao meu marido José e a minha querida filha Giovanna,
que em todos os momentos sempre acreditaram e
incentivaram meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, por muitas oportunidades oferecidas, incentivo constante, confiança e amizade dedicada a mim em todos os momentos.
- À Dra. Sandra Farto Botelho Trufem, do Instituto de Botânica de São Paulo e à Dra. Sandra Maria Gomes da Costa, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá - PR, pelo treinamento e identificação dos fungos micorrízicos.
- Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo pela liberação de coletas do material de estudo e, ao Diretor João E. de Melo Neto, Waldir Joel de Andrade e Adriana Moreira Tempest do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, pela acomodação, hospitalidade e apoio durante as coletas.
- À Dra. Paola Bonfante pela oportunidade de treinamento em biologia molecular e especialmente as amigas Dra. Érica Lumini, Dra. Daniela Minerdi, Dra. Isabelle Lacourt, Dra. Laura Bardi e Dra. Luisa Lanfranco pelos ensinamentos e amizade.
- Ao Dr. Arnaldo Colozzi-Filho pelos ensinamentos e apoio, mesmo à distância.
- À Denise de Lourdes Colombo Mescolotti e Luís Fernando Baldesin, do laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ, pelo incansável apoio técnico e amizade.
- Ao amigo Marco Antônio Nogueira, pelo auxílio constante e amizade.
- Aos amigos: Lúcia, Paulo, Júlio, Maria Izabel, Guiliana e Edna e, também à muitos colegas do curso pela convivência e amizade.
- À ESALQ e à CAPES pelo auxílio e pela oportunidade.

APRESENTAÇÃO

A presente Tese foi redigida em “Forma de Publicação”, de acordo com as Normas para Elaboração de Dissertações e Teses da ESALQ/USP (1997) e é composta pelos seguintes trabalhos científicos:

1. Biodiversidade de fungos micorrízicos arbusculares em mata de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.
2. Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze sob níveis de fósforo.
3. Identificação de esporos e *in planta* de fungos micorrízicos arbusculares utilizando PCR-*primers* específicos.
4. Germinação precoce de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Antecedendo a apresentação dos referidos trabalhos encontram-se uma Introdução e uma Revisão de Literatura de caráter geral.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	04
2.2 Associação micorrízica	06
2.3 A presença de fungos MA em <i>A. angustifolia</i>	07
2.4 Determinação do grau de dependência de <i>A. angustifolia</i> de FMA	11
2.5 Caracterização e identificação dos fungos MA	12
2.6 Métodos moleculares e identificação dos fungos MA	14
2.6.1 Simbiose e biologia molecular	14
2.6.2 Proposta molecular para o estudo taxonômico de fungos MA	16
2.6.3 Análise da sequência do rDNA para estudos de fungos MA	18
3 BIODIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM MATA DE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	21
3.1 Resumo	21
3.2 Summary	21
3.3 Introdução	22
3.4 Material e Métodos	23
3.5 Resultados e Discussão.....	27
3.6 Conclusões	41
4 DEPENDÊNCIA MICORRÍZICA de <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. KTZE SOB NÍVEIS DE FÓSFORO	42
4.1 Resumo	42
4.2 Summary	43

4.3 Introdução	44
4.4 Material e Métodos	45
4.5 Resultados e Discussão	47
4.6 Conclusões	57
5 IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS E <i>IN PLANTA</i> DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES UTILIZANDO PCR- <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS.....	
5.1 Resumo	58
5.2 Summary	59
5.3 Introdução	59
5.4 Material e Métodos	62
5.5 Resultados e Discussão.....	67
5.6 Conclusões.....	75
6 GERMINAÇÃO PRECOCE DE SEMENTES DE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	
6.1 Resumo	76
6.2 Summary	76
6.3 Introdução	77
6.4 Material e Métodos	78
6.5 Resultados e Discussão.....	80
6.6 Conclusões.....	83
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Ecofisiologia de fungos micorrízicos arbusculares em

Araucaria angustifolia

Autora: MILENE MOREIRA DA SILVA ROSA DE SOUZA

Orientadora: Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., o pinheiro do Paraná, é uma espécie nativa ameaçada de extinção e, dentro de suas matas, encontra-se uma grande diversidade biológica que corre o risco de desaparecer. Por causa disso e diante da escassêz de literatura sobre esta espécie, torna-se necessário aprofundar o conhecimento sobre a ecologia da araucária e os estudos sobre a diversidade biológica de fungos MA (micorrízicos arbusculares) que estão presentes na sua rizosfera e em suas raízes. Visto que não há informações seguras sobre estes aspectos, procurou-se avaliar neste trabalho a possível dependência do pinheiro-do-paraná de fungos MA e identificar as espécies desses fungos que colonizam as raízes. As amostras de raízes e solo rizosférico foram coletados de floresta nativa e área de replantio de araucária, localizadas no Parque Estadual de Campos do Jordão, Campos do Jordão, Estado de São Paulo, Brasil. Destas

amostras foi determinada a porcentagem de colonização radicular e o número de esporos no solo, em duas épocas do ano (fevereiro e setembro), correspondendo às estações chuvosa e de seca, respectivamente. Foi feita também, a identificação de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) encontrados na rizosfera da araucária, com base nas características morfológicas dos esporos. Fez-se um levantamento das espécies de fungos MA presentes em condições de campo, por meio da multiplicação dos esporos encontrados. Para isso, plantas de sorgo foram utilizadas como hospedeiras durante dois ciclos de multiplicação em casa de vegetação, possibilitando o aumento da quantidade de esporos encontrados em campo, o que auxiliou na classificação taxonômica. Já em condições de casa-de-vegetação foi montado um experimento com plantas de *A. angustifolia*, fazendo-se inoculação com os fungos micorrízicos *Gigaspora rosea*, *Glomus intraradices* (provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP) e inóculo nativo, proveniente da mata de araucária, mantendo-se um tratamento sem inoculação (controle). No experimento foram utilizados quatro níveis de P (0, 20, 50 e 150 mg de P kg⁻¹ de solo), determinando-se qual tratamento apresentou melhor desenvolvimento das plantas. Observou-se que a inoculação com *Gi. rosea*, ao nível de 20 mg kg⁻¹ de P foi o tratamento que mais se destacou com relação ao desenvolvimento das plantas e pela economia de insumos. Plantas não inoculadas com FMA (fungos micorrízicos arbusculares) diferiram de plantas inoculadas. Fez-se, também, a identificação de esporos de fungos MA através de técnicas moleculares. O produto da PCR foi sequenciado e fez-se a homologia com as seqüências descritas no GenBank, em seguida, foram desenhados “primers” específicos para *Gigaspora rosea* e pôde-se verificar que esta espécie estava colonizando raízes de *A. angustifolia*. Outro

aspecto estudado foi a avaliação de método para auxiliar na germinação precoce de sementes de *A. angustifolia*, visto que a sua germinação lenta retarda o estabelecimento da planta e favorece o desenvolvimento de fungos que prejudicam as plântulas. Após a escarificação mecânica das sementes desinfestadas foi possível obter plântulas mais homogêneas de boa qualidade e, com maior precocidade.

Os principais objetivos deste trabalho foram, conhecer a biodiversidade das espécies de fungos MA que se associam a *Araucaria angustifolia* e obter isolados de fungos MA mais eficientes na produção de mudas, com baixos níveis de P no solo.

Ecophysiology of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Author: MILENE MOREIRA DA SILVA ROSA DE SOUZA

Advisor: Prof. Dr. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

SUMMARY

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze, known as the “pine of Paraná”, is a native Brazilian plant specie that is threatened with extinction. The microorganisms associated with this pine are also endangered. Few studies have documented the interaction observed between arbuscular mycorrhizal fungi and *A. angustifolia* (Milanez & Monteiro, 1950; Oliveira & Ventura, 1952), and very little is known about the dependence of this pine on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Moreover, nothing has been documented about the biodiversity of AMF in the rhizosphere or the association of AMF with the roots of this tree. Therefore, to better understand the association of AMF with *A. angustifolia*, we conducted studies to evaluate the possible mycorrhizal dependence of the pine of Paraná, as well as to identify some of these fungal species that colonize its roots. Root samples were collected from a native forest located at the

“Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ)”, Campos do Jordão, in the state of São Paulo, Brazil. The percentage of roots colonized and the number of spores found in the rhizosphere was evaluated during the wet (February) and dry (September) seasons. AMF species were identified based upon the morphological characteristics of the harvested spores that were propagated on sorghum (*Sorghum bicolor* Moench, cv. L.) plants, which were used as a host during two multiplication cycles done in greenhouse. This procedure increased the amount of spores collected from the field and facilitated their taxonomic classification. To evaluate the absorption of phosphorus (P) under greenhouse conditions, *A. angustifolia* plants were inoculated with *Gigaspora rosea*, *Glomus intraradices* (both were from the collection at the Soil Microbiology Laboratory – ESALQ/USP), and with native AMF inoculum, which was collected from the respective forest. Four levels of P were tested (0, 20, 50 and 150 mg P kg⁻¹ of soil) to determine the best level for the development of the plants. It was observed that *Gi. rosea* in combination with 20 mg kg⁻¹ P was the treatment that combined the best plant development with the lowest fertilizer cost. Inoculated plants differed significantly from non-inoculated plants. Molecular techniques (PCR) were also applied to identify the AMF spores using the ITS and 18S primers. With the sequences of the amplifications in hand we found homology of the segments of interest in GenBank, and primers specific for *Gi. rosea* were used to confirm that this was the specie that was colonizing the roots of *A. angustifolia*. Successful seedling development for *A. angustifolia* was obtained through mechanic scarification of surface sterilized seeds, which allowed an earlier, faster and uniform germination, thus making it possible to work with healthier and homogeneous batches of plants.

Therefore, the objectives of this study were to discover the biodiversity of AMF species that were associated with *A. angustifolia* and to select highly efficient AMF isolates that adapted to low P conditions.

1 INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia, o pinheiro-do-Paraná, já foi uma das espécies nativas mais exploradas no Brasil. Por isso mesmo o reflorestamento e a manutenção das poucas matas que existem é de suma importância, tanto no âmbito da biodiversidade ecológica como a nível econômico. Por ser uma espécie ameaçada de extinção, torna-se obrigatória sua conservação (Portaria IBAMA 06-N), além do que a floresta de *Araucaria* abriga uma rica fauna e flora silvestres, também ameaçadas de extinção. No interior do sub-bosque encontramos espécies economicamente viáveis, como a erva-mate, imbuia, canela, etc. Estas poucas matas de *Araucaria* que ainda existem, podem ser manejadas de forma auto-sustentável.

Outro ponto importante é o replantio da *Araucaria*, ressaltando seu valor econômico, pois ela se presta para indústria madeireira, com a madeira de qualidade superior às demais utilizadas atualmente, como o eucalipto e o pinus. O domínio de *Pinus* e *Eucalyptus* nos projetos de monoculturas de essências madeiras hoje é realidade, enquanto que o plantio de *Araucaria* se resume, na melhor das hipóteses, quase que

unicamente à obrigatoriedade dos 10% de área de reflorestamento para espécies nativas, sendo que muitas vezes não se trata de plantios, mas de área de mata natural. Isto ocorre devido a alegação que o *Pinus* e *Eucalyptus* apresentam crescimento mais rápido, com menores exigências nutricionais e qualidade do solo.

No entanto, estas informações podem não ser totalmente corretas pois. estudos de inter-relações entre solo-nutrição-crescimento são raros, não se comparando com o conhecimento alcançado com outras coníferas (Haag, 1983). Existem poucas pesquisas com a espécie araucária, sendo que em 1997 somente cinco artigos foram publicados. Torna-se, assim, fundamental conhecer mais sobre a *A. angustifolia*, principalmente em relação à qualidade da muda no viveiro, que é um dos fatores mais importantes na implantação de um reflorestamento, tanto comercial como para preservação da espécie, devido ao caráter perene da cultura. Também é conhecido que a grande maioria dos solos agricultáveis brasileiros é pobre em P e tem alto poder de imobilização deste nutriente (Cardoso, 1985). Por esta razão, é importante aumentar o aproveitamento de P pelas plantas e, atualmente, uma das técnicas que vem sendo estudada é a inoculação de plântulas com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Silveira, 1992).

Estudos mostram que mudas de essências florestais micorrizadas têm maior capacidade de absorver nutrientes e água, maior sobrevivência das plantas em condições naturais e maior crescimento (Marx, et al, 1984). Por isso, têm melhor desenvolvimento no viveiro e no campo, apresentando também resistência ao estresse hídrico, isso, comparado com mudas produzidas sem inoculação com fungos micorrízicos (Mikola, 1973; Lopes et al. 1983).

O objetivo do inóculo do fungo nativo no viveiro ou da introdução fungos simbiontes mais eficientes ou competitivos é para que maiores benefícios sejam obtidos da associação (Mosse et al. 1981). Os benefícios podem ser obtidos através de atividades do estabelecimento, desenvolvimento e nutrição das plantas (Azcón-Aguilar & Barea, 1992).

No Brasil, existem alguns relatos sobre a colonização de *A. angustifolia* com fungos MA (Milanez & Neto, 1950) e também existe a descrição da presença de “pseudo-nódulos”, localizados nas raízes (Oliveira & Ventura, 1952; Souza et al., 1998).

Estes “pseudo-nódulos” são estruturas bastante interessantes, pois estão intimamente ligadas às raízes e seria de interesse entender sua função na raiz de *Araucaria*. Também é importante ressaltar que estes pseudo-nódulos, em geral, acomodam grande quantidade de hifas micorrízicas (Souza et al., 1998).

De acordo com essas informações, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a possível dependência da *A. angustifolia* em relação aos fungos MA e, posteriormente, identificar as espécies desses fungos; construir *primers* específicos para identificar o fungo colonizando as raízes; encontrar fungos eficientes para o desenvolvimento da planta e avaliar se ocorrem respostas à inoculação, em relação ao nível de P: finalmente, obter mudas de araucária mais precoces e saudáveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

A família *Araucariaceae* apresentava uma dispersão paleogeográfica diferente da ocupação atual (Haag, 1983). Constatou-se, recentemente, a ocorrência de fósseis (fragmentos de caules) em terrenos juracretácicos no nordeste brasileiro, evidenciando que dentro da “plataforma brasileira” encontravam-se *Coniferales*. Tais fósseis são também encontrados em pontos isolados da borda sul do Planalto Meridional, como, por exemplo, em Santa Maria da Boca do Monte (Rio Grande do Sul). Mas, como o vulcanismo iniciado nesta área no Cretáceo e terminado no Terciário Superior, foi o responsável pelo despovoamento vegetal do Planalto Meridional, a hipótese de que a *A. angustifolia* atualmente aí existente penetrou através do “Escudo Atlântico”, que se achava unido à grande plataforma afro-brasileira no Paleozóico, parece estar comprovada (Haag, 1983).

A vegetação da mata de pinheiros brasileiros não constitui uma formação homogênea e contínua, e sim, formações vegetais com múltiplas associações e agrupamentos que vão variar de acordo com o local e o estágio da sucessão (Klein,

1960). As araucárias encontram-se espaçadas de tal forma que suas copas apenas se tocam, sendo assim, o estrato mais alto da floresta.

É uma espécie característica da floresta subtropical brasileira, conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná ou araucária. A região de araucárias encontra-se principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Hueck, 1972). No Rio de Janeiro e Minas Gerais há ocorrências isoladas e na Argentina há uma pequena área. Sua ocorrência natural ocupa altitudes que variam entre 500 e 1.500 metros e só é encontrada entre os paralelos 21° e 30° de latitude sul. Segundo Mack (1968) citado por Haag (1983), a araucária constitui uma parte especial da mata pluvial subtropical, cujo desenvolvimento está relacionado com a altitude. Desenvolve-se em regiões de clima temperado, onde a temperatura média anual varia de 13 a 18°C, e que se caracterizam por verões frescos e invernos relativamente frios, com temperaturas mínimas de até -8°C (Golfari, 1967).

A maioria das matas de Pinheiro do Paraná, atualmente, são matas secundárias, matas já parcialmente ou completamente exploradas, onde restam alguns pinheiros. Matas primárias raramente são encontradas em maciços extensos (Machado et al., 1980). As populações naturais têm sofrido uma progressiva extinção, devido ao seu alto valor econômico (madeireiro, resinífero e alimentar). O IBAMA o classificou como espécie da flora brasileira ameaçada de extinção (Brasil, IBAMA, 1992).

A. angustifolia ocorre sobre os mais variados tipos de solo, desde os mais pobres, como os dos campos gerais do Paraná (derivados de arenitos), até os solos escuros e férteis (derivados de basalto) que ocorrem no sudoeste do Paraná e oeste de Santa

Catarina (Romariz, 1973). O pinheiro brasileiro necessita de solos profundos e bem estruturados para um maior rendimento (Golfari, 1970). Esta necessidade está relacionada à exigência desta espécie de altos níveis de umidade no solo. Solos arenosos e rasos não retêm a umidade do solo exigida, podendo provocar períodos de estresse (Golfari, 1970).

Alguns fatores contribuem para a vulnerabilidade da espécie, como a carência de dados técnicos relacionados à sua ecologia (Milanez & Neto, 1950). A dispersão natural é dificultada pelo peso de suas sementes, aliado, ainda, à curta longevidade natural, por serem recalcitrantes à germinação e por sofrerem predação por avifauna, roedores e primatas. Além disso, as sementes só germinam quando encontram uma clareira (Lorenzi, 1992). As árvores apresentam flores masculinas ou femininas (portanto são dióicas), as quais só aparecem a partir dos quinze anos de idade, quando atingem a maturidade.

2.2 Associação micorrízica

A micorriza arbuscular constitui a mais disseminada destas associações, ocorrendo em cerca de 80% das espécies de plantas. Caracteriza-se pela intensa colonização do tecido cortical das raízes, onde as hifas penetram inter e intracelularmente, formando estruturas efêmeras, semelhantes a haustórios, denominadas arbúsculos (Bonfante-Fasolo, 1984). Os arbúsculos são responsáveis pela troca de nutrientes e talvez pelas comunicações com sinais químicos entre os simbiontes. Os fungos MA são atualmente classificados na Classe Zigomicotina, ordem Glomales, compostas das famílias

Glomaceae, *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae*. A taxonomia clássica destes fungos é baseada nas características fenotípicas de seus esporos assexuais, como cor, tamanho, forma e outras características morfológicas.

Sabe-se que os fungos MA estimulam o crescimento das plantas nos solos de baixa fertilidade. Plantas micorrizadas geralmente apresentam maior absorção de água e nutrientes (Bowen, 1973), especialmente daqueles relativamente imóveis ou de baixa mobilidade que se encontram fora do alcance da raiz, sobretudo o P (Cardoso, 1985, 1996) Zn (Pacovsky et al. 1986) e Cu (Pacovsky, 1986). A micorriza pode proteger o sistema radicular contra patógenos (Schenck, 1981), sendo que a planta micorrizada produz mais biomassa e maior tolerância ao ferro e alumínio (Vogt et al. 1987), a estresses hídricos (Mosse et al. 1981) e a valores extremos de pH (Safir & Duniway, 1982). Além disso, as micorrizas desempenham função importante na ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais (Vogt et al., 1991). Por isto, a inoculação com fungos MA pode ser um fator importante na recuperação de áreas degradadas, especialmente em culturas que tenham fase de viveiro, em que possa ser feita a inoculação, como nas essências florestais. Normalmente, os efeitos da inoculação são mais pronunciados em solos com baixa disponibilidade de nutrientes (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Silveira, 1992).

2.3 A presença de fungos MA em Araucária

Vários estudos têm mostrado a importância do reflorestamento com espécies nativas, no sentido de garantir o desenvolvimento ecológico, embora a nível econômico.

Em geral, as mudas de espécies florestais são fracas, com deficiência de P e, freqüentemente, ocorre morte das mesmas (Rifle & Boosalis, 1979). Estes problemas podem muitas vezes ser superados através de inoculação com fungos MA no viveiro (Menge, 1983).

Poucos estudos mostram a presença de fungos MA em plantas de *Araucaria* e *Podocarpus*. Em *Podocarpus* foi demonstrada a ocorrência de pseudo-nódulos, já em 1870 (van Tieghem, 1870), e vários pesquisadores acreditavam que estes nódulos poderiam ser formados em função de fungos endofíticos (Becking, 1965); outros autores afirmavam que seriam induzidos pela bactéria rizóbio das leguminosas (Spratt, 1912; Phillips, 1932). Estudos realizados por Baylis et al. (1963) e Baylis (1969) sugeriram que se tratava de uma resposta à colonização da raiz por fungo MA, entretanto dados preliminares do presente trabalho não confirmaram tal suposição, pelo menos em araucária, visto que os pseudo-nódulos estão presentes em raízes micorrizadas e não-micorrizadas.

Até o momento, não está bem definida a função destas estruturas na planta. Mas, de acordo com observações de Souza et al. (1998), estas estruturas estão intimamente ligadas às raízes e podem acomodar grande quantidade de hifas micorrízicas. Santos (1951), em levantamento da ocorrência de fungos MA em talhões de espécies vegetais, incluindo *A. excelsa* e *A. angustifolia*, observou radículas em formato de contas, arredondadas e semelhantes a nódulos. Mas, relata não se tratar de nódulos e sim de raízes de formato e tamanho modificados, que acomodam fungos endofíticos do tipo FMA. No entanto, Souza et al. (1998) verificaram que mesmo plantas não inoculadas

com fungos micorrízicos apresentam a formação destes pseudo-nódulos.

Em relação à dependência da araucária dos fungos MA pouco se conhece. Sabe-se que ela é colonizada, mas não havia informações sobre seu micotrofismo. Algumas características anatômicas das raízes das plantas micorrizadas têm sido utilizadas como indicadores da dependência micorrízica (Pope et al., 1983). Plantas com sistema radicular dominado por raízes curtas, grossas e com poucos pêlos absorventes são consideradas altamente micotróficas, pois dependem do fungo micorrízico para a absorção de nutrientes do solo. Sabe-se, também, que plantas micorrizadas apresentam um sistema radicular proporcionalmente menor que uma planta não micorrizada (Cardoso & Freitas, 1992; Hayman & Mosse, 1971). Isso significa que o fungo micorrízico contribui para a economia de energia da planta, permitindo o investimento desta energia na produtividade da biomassa aérea (Cardoso & Freitas, 1992).

Milanez & Monteiro, 1950 e Oliveira & Ventura, 1952, verificaram a presença de fungos MA nas raízes finas de *A. angustifolia* e comentaram que estas provavelmente tenham uma significativa importância na ciclagem de nutrientes, influenciando na decomposição da liteira e na nutrição de P e N, como foi estudado em outras espécies do gênero *Araucaria* (Bowen et al., 1974, 1975). Para *Araucaria araucana*, encontrada no sul do Chile, Godoy et al., (1994), verificaram a associação com fungos MA e relataram que *Glomus intraradices* proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas.

Thapar & Khan (1973) encontraram colonização de fungo MA do tipo *Endogone* em *A. cunninghamii*. Nesta colonização, as hifas do fungo eram profusas na parte interna do córtex radicular; as vesículas e os arbúsculos estavam restritos a camadas de células

bem definidas e raramente juntos na mesma célula. Thapar & Khan (1985), após inoculação com fungos MA em plantas de *A. cunninghamii*, verificaram aumentos no seu crescimento, mas não indicaram as espécies fúngicas utilizadas.

Muchovej et al. (1992) estudaram a influência da inoculação com fungo MA e fungos ectomicorrízicos em *Araucaria* e concluíram que ambos os tipos de fungos apresentaram baixa capacidade de colonização radicular e que não tiveram efeito positivo para as plantas, em relação à produção de matéria seca de raízes e partes aéreas e ao acúmulo de N, P, K, Ca e Mg nas partes aéreas. Deve ser ressaltado que este experimento foi conduzido em casa de vegetação, por um período curto, de 140 dias. Outros fatores que podem ter influenciado o resultado seriam a instalação em vasos de 2 litros, onde o sistema radicular pode ter sido comprometido e a utilização de fungos isolados de campo agrícola e não de uma mata natural. Possivelmente, utilizando inóculos da mata natural de araucária, haveria maior adaptação mútua entre fungos e plantas.

Oliveira et al. (1992) estudaram, em *A. angustifolia*, o efeito da inoculação de fungos micorrízicos com diferentes percentuais de inóculos nativos. Segundo estes autores o inóculo contendo os fungos micorrízicos foi coletado em povoamentos adultos de *Pinus taeda*. Entretanto, deve ser salientado o fato de que tal inóculo conteria principalmente fungos ectomicorrízicos, fato que talvez tenha escapado aos autores citados. Os tratamentos constaram de inóculos de fungos nativos na proporção de 0, 10, 20 e 30% do volume do substrato utilizado em cada vaso. Os autores não citam as espécies de fungos MA, mas concluíram, após oito meses de inoculação, que os níveis

de 10 e 20% de inóculo micorrízico proporcionaram maior taxa de colonização e consequentemente maior desenvolvimento das mudas.

2.4 Determinação do grau de dependência de *A. angustifolia* de fungos MA

A dependência micorrízica é definida por Gerdemann (1975) como o grau pelo qual a planta depende do fungo para o crescimento ou produção máxima, a um dado nível de fertilidade do solo. Várias espécies arbóreas como *Liquidambar styraciflua*, com ocorrência no sudeste dos Estados Unidos, apresentam dependência micorrízica obrigatória para crescimento (Kormanik, et al. 1977). Espera-se que várias espécies arbóreas tropicais também se comportem assim.

Além dos efeitos no crescimento inicial e na qualidade das mudas (Janos. 1980), evidências indicam que a colonização micorrízica afeta as futuras fases sucessionais das espécies (Herrera et al. 1993) e a estruturação das comunidades vegetais (Miller & Jastrow, 1992). Desse modo, os fungos MA são importantes para o florestamento artificial (Perry et al. 1987), especialmente em solos de baixa fertilidade, onde eles poderão reduzir os requerimentos externos de nutrientes das espécies e os custos de implantação e garantir a sucessão vegetal no ecossistema em restauração (Janos. 1983; Jasper, 1994).

Em casa-de-vegetação, mudas de espécies arbóreas nativas, como o cedro (*Cedrela fissilis*) e o angico vermelho (*Piptadenia peregrina* Benth), inoculadas com FMA, acumularam maiores quantidades de nutrientes e os utilizaram de forma mais eficiente (Tótola, 1994).

Os métodos utilizados para constatar e quantificar a ocorrência dos fungos MA nas raízes baseiam-se na proporção do tecido do hospedeiro ocupado pelo fungo, o que pode ser observado em raízes coloridas através do método de Phillips & Hayman (1970) que, apesar de algumas adaptações, continua sendo o método mais utilizado como princípio básico para os demais métodos de coloração, que estão sendo desenvolvidos e aprimorados, como, por exemplo, os métodos de Read & Hodsgson (1976), Hepper (1977), Kormanik & McGraw (1982), entre outros.

2.5 Caracterização e identificação dos fungos MA

As associações entre fungos MA e espécies arbóreas nativas do Brasil são pouco conhecidas. Também são escassos os trabalhos realizados no país sobre a inoculação de plantas nativas utilizadas para recuperação de áreas degradadas.

Trabalhos de caracterização de fungos MA para novas áreas de plantio são importantes para o reconhecimento da ocorrência das espécies fúngicas que poderão ser úteis em futuros programas de inoculação, bem como no estudo das relações ecológicas entre o fungo simbiote e a planta hospedeira. Desta forma, os efeitos de clima e solo sobre as taxas de colonização e esporulação dos fungos poderão ser melhor compreendidos.

Não se encontraram informações sobre nenhum desses aspectos, referentes a araucária em nossa região. Entretanto, existem alguns estudos que visam o eucalipto, outra essência florestal também suscetível à colonização por fungos MA.

De acordo com a literatura, em áreas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn, em

Minas Gerais, observou-se que a percentagem de colonização de raízes por fungos MA aumentou, nas três regiões estudadas, no período seco, enquanto o número de esporos no solo apresentou aumento no período mais chuvoso do ano, o que correspondeu ao mês de fevereiro. Foram identificados esporos de fungos MA como *Acaulospora longula*, *Scutellospora pellucida* e *Glomus microcarpum*, nas três regiões pesquisadas (Coelho et al. 1997). Num estudo semelhante, em povoamentos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*, no estado de São Paulo, foram identificados esporos de *Glomus macrocarpum*, *G. constrictum*, *G. aggregatum*, *G. diaphanum*, *G. inermayanum*, *G. etunicatum*, *Acaulospora morrowae* e *A. scrobiculata*. De maneira geral, o número de esporos aumentou no período chuvoso e de temperaturas mais altas (Coelho et al., 1997). Outras pesquisas semelhantes mostram a mesma tendência em relação ao aumento do número de esporos, quando no período de maior precipitação pluvial (Schwan, 1984; Caldeira, 1981).

Dados sobre densidade de esporos podem ser úteis na avaliação do potencial de inóculo dos fungos micorrízicos. No entanto, não são uma medida confiável da sua atividade (Allen & Allen, 1980). Sabe-se que algumas espécies de fungos MA têm maior capacidade de produzir esporos que outras, sendo que fatores ambientais afetam significativamente a produção de esporos e a colonização de raízes (Saif & Khan, 1975, Ferguson & Menge, 1982).

É possível que a *Araucaria* tenha grande dependência dos fungos MA, pois, sabe-se que, em geral, as matas de araucária se encontram em solos ácidos e de baixa fertilidade. Em levantamento realizado na área do Jardim Botânico em São Paulo, foram

encontradas 15 espécies de FMA na rizosfera de *A. angustifolia* (Bononi et al., 1989).

A identificação do fungo MA é baseada na morfologia das estruturas fúngicas no solo, onde ocorre a fase extramatricial dos fungos, composta por esporos, esporocarpos e hifas. Essas estruturas são extraídas do solo de acordo com a metodologia proposta por Gerdemann & Nicolson (1963) e Jenkins (1964). Posteriormente, são feitas observações microscópicas do material e identificação estrutural específica dos esporos. A classificação taxonômica das espécies é feita com base nas características morfológicas dos esporos (Morton & Benny, 1990).

2.6 Métodos Moleculares e a identificação dos fungos MA

2.6.1 Simbiose e biologia molecular

A simbiose representa um sistema experimental complexo e, até pouco tempo atrás, havia poucas ferramentas para se estudar este fenômeno. Por muito tempo o único método mais utilizado foi a descrição morfológica e a análise da sua interação (Scannerini, 1988). Somente para alguns sistemas, como, por exemplo, o rizóbio, a partir de 1980, foi possível estudar este processo através da genética, regulação metabólica e da fisiologia, incluindo, mais recentemente, métodos moleculares.

O desenvolvimento da técnica molecular tem estimulado muito os estudos dos sistemas simbióticos e está permitindo novas perspectivas. A técnica de biologia molecular tem permitido uma maior segurança na identificação do microssimbionte, revelando a estrutura dos ácidos nucleicos e de proteínas, mostrando diferenças ou

semelhanças através das seqüências de DNA (Perotto et al., 1999).

Nos últimos dez anos, no campo da sistemática molecular, foram desenvolvidas novas técnicas como a PCR (*Polymerase chain reaction*), reação em cadeia da polimerase. Esta permite obter uma grande quantidade de DNA através de amplificações e, em seguida, possibilita o estudo do genoma (Kleppe et al., 1993; Mullis & Faloona, 1987).

Esta técnica pode ser aplicada em estudos taxonômicos, necessitando às vezes de uma outra metodologia complementar. Algumas podem apresentar-se muito eficazes ou até limitadas, e isto varia de acordo com as necessidades e problemas que podem existir (Moritz & Hillis, 1996). Um exemplo: para análise dos ácidos nucleicos existem diferentes métodos mas, podem-se utilizar métodos que geram fragmentos de DNA. No caso, este método prevê que a variação da seqüência dos fragmentos gerados seja examinada por via indireta, através da análise eletroforética, na qual se pode verificar se há ou não diferenças no tamanho dos fragmentos. Este método consiste na análise de fragmentos por meio de enzimas de restrição (RFLP, *Restriction fragment length polymorphism*); nesta análise utiliza-se o DNA obtido de amplificações com oligonucleotídeos curtos de seqüência casual (RAPD; *Random amplification polymorphic DNA*); ou ainda através de amplificação da região contendo mini e microssatélites, onde a seqüência será constituída de 15-30 pb ou de 2-10 pb, respectivamente. Outra possibilidade de análise da estrutura dos ácidos nucleicos pode ser representada pelo sequenciamento do DNA e do RNA. Ainda, um outro método utilizado, é avaliar diretamente a variação da seqüência dos ácidos nucleicos e a hibridação DNA-DNA ou DNA-RNA (Moritz & Hillis, 1996).

2.6.2 Proposta molecular para o estudo taxonômico de fungos MA

O estudo taxonômico dos fungos MA tem recebido, nestes últimos anos, uma contribuição mais consistente com o desenvolvimento de técnicas moleculares. Estas técnicas foram eficientes em certos casos onde as características morfológicas são insuficientes ou causam dúvidas. Também permitem classificar os fungos MA durante a fase da simbiose, na qual os métodos tradicionais não permitem identificá-los e relacioná-los a nível de taxon.

Diversos autores (citados por Bago et al., 1998) têm estudado a sistemática molecular dos fungos MA. Estes estudos referem-se principalmente à análise do DNA. Sabe-se que até o momento não é possível realizar com sucesso uma cultura pura de fungo MA, sem a presença de raízes da planta (Hijri et al., 1999). Esta situação cria uma certa dificuldade em conseguir material biológico adequado.

A técnica da análise do DNA, baseada em PCR, representa um sistema muito vantajoso, principalmente por permitir a utilização de uma alíquota muito pequena de DNA, e, em seguida à amplificação do material, obtem-se uma boa quantidade. Uma segunda vantagem é que, através da análise do DNA, pode-se selecionar uma região específica do genoma e, com técnicas apropriadas, verificar a homologia com outros organismos. Bruns & Gardes (1993) verificaram que a região ideal para ser escolhida num experimento de PCR deve apresentar as seguintes características: 1) estar presente em todos os fungos de interesse; 2) ser facilmente amplificável; 3) no caso de estarem presentes o DNA da planta e do fungo, o do fungo deve ser preferencialmente amplificável; 4) ser variável, de modo que permita o desenvolvimento de sondas

específicas para diferentes níveis taxonômicos (isolado, espécie, gênero). Para cada objetivo utiliza-se uma técnica específica: no caso, o RAPD e a amplificação da região contendo mini e microssatélites são utilizadas para discriminar o indivíduo a nível intra-específico e para determinação de um único isolado dentro de uma população. Já a técnica mais utilizada para verificar a relação taxonômica e filogenética entre organismos baseia-se na amplificação e caracterização da parte específica do gene ribossomal, ou seja, através da análise RFLP e análise da sequência obtida (Lanfranco et al., 1998).

No genoma dos eucariotos (como em procariotos) os genes ribossomais encontram-se repetindo numerosas cópias (Smith, 1976), dispostas em blocos de repetições (começo e fim). Nos fungos estão individualmente copiados em repetições com números variáveis, entre 40 e 400 por genoma haplóide (Bollon, 1982) e cada unidade de rDNA é composta de diferentes regiões. Distinguem-se regiões codificantes altamente conservadas e regiões variáveis: a subunidade 18S, 5.8S e 25S são identificadas como altamente conservadas em todos os eucariotos, mas a região ITS (*Internal transcribed spacer*) e IGS (*Intergenic spacer*) mostram pequena ou nenhuma homologia entre genomas divergentes (Brown et al., 1972).

A dimensão do rDNA fúngico varia de 7 a 50 kb (Van Heerikhuizen et al., 1985), em função dos números de cópias repetidas ou da repetição posterior localizada nas regiões variáveis (Hosny et al., 1999).

A repetição característica dos genes ribossômicos garante a uma célula em crescimento a capacidade de produzir quantidade adequada de RNA ribossomal (rRNA), para fazer frente à necessidade do ribossomo (Long & Dawid, 1980). Do ponto de vista

experimental, a disponibilidade de numerosas cópias constitui uma vantagem na amplificação PCR.

2.6.3 Análise da sequência do rDNA para estudos dos fungos MA

Pouco se conhece sobre a estrutura do rDNA e, também, sobre o interior do genoma de *Glomales* (Hosny et al., 1999). A técnica molecular, baseada na análise da sequência do rDNA, está ainda apontando em direção a um aprofundamento e ampliação dos conhecimentos deste domínio. Estes conhecimentos permitirão o desenvolvimento de estudos de biodiversidade dos fungos MA e de suas relações filogenéticas.

Como sabemos, a subunidade do gene ribossomal que codifica o rDNA está em uma das zonas mais conservadas entre todos os organismos. Já os espaçadores, particularmente o espaçador intergênico IGS (*Intergenic spacer*), podem variar significativamente na sua sequência, até mesmo ao nível intraespecífico.

Simon et al. (1992; 1993 a, b) foram os primeiros a estudar a utilização da técnica de PCR para estudos de fungos MA, analisando a sequência da subunidade 18S do rDNA. Os dados das sequências obtidas permitiram construir “primers” específicos para 12 isolados. Diferentes espécies de fungos MA foram utilizados para estudar a relação filogenética existente (Simon et al., 1993a). Os resultados permitiram a construção de uma árvore filogenética, que mostrou semelhanças com a classificação de fungos MA estabelecida pela análise morfológica. Neste estudo, ainda foi possível estimar a idade dos *Glomales* e o momento de separação em famílias e gêneros,

considerando a divergência na sequência gênica como um “relógio molecular” (Simon et al., 1993a, Simon 1996).

Clapp et al. (1995) estudaram a composição de uma comunidade fúngica, obtida de raízes micorrizadas recolhidas no campo, dentro do intervalo 18S rDNA específico, a nível de gênero. Em particular, foi observado que a presença de fungo endofítico não está sempre correlacionada com a presença de propágulos (esporos) na rizosfera ao redor da raiz e, salientou-se a importância das técnicas moleculares, pois a identificação baseada nas características morfológicas seria muito pouco precisa neste caso.

Bago et al. (1998) identificaram grupos diferentes dentro do gênero *Gigaspora*, caracterizados por um “sinal” molecular na região 18S rDNA. Recentemente, Simon (1996) localizou um número de sítios variáveis ao longo da subunidade menor (SSU, *small subunit*) dos Glomales: estes sítios podem ser utilizados, como também demonstram os resultados de Bago et al. (1998), como sinal molecular para discriminar e reagrupar isolados dentro de diversos gêneros. Também, a subunidade maior do rDNA (LSU, *large subunit* ou 25S rDNA) apresenta uma variabilidade que permite a discriminação a nível de taxons mais precisos, por exemplo, a nível de espécie. Van Tuinen et al. (1998) mostraram, através da variabilidade da extremidade 5' de LSU, a identificação de diversas espécies de fungos MA em raízes de cebola e alho poró.

A região ITS (região que compreende a porção codificante 5.8S e as duas regiões ITS1 e ITS2) é muito usada para estudar a relação filogenética de grupos de fungos ectomicorrízicos (Lanfranco et al., 1998). Nestes últimos anos foram analisadas as regiões ITS de algumas espécies de *Glomus*, *Gigaspora* e *Scutellospora* (Sanders et al.,

1995; Franken & Gianinazzi-Pearson, 1996; Hijri et al., 1999; Lanfranco et al., 1999).

Todas análises partem de um grupo muito uniforme de esporos, com um único grupo morfológico ou, ainda, de um único esporo. Foi mostrado que existe uma notável variabilidade da região ITS, seja entre diferentes espécies, seja entre isolados de uma mesma espécie, ou ainda, no interior de um único esporo. Todavia, é evidente um polimorfismo de sequência, sendo possível selecionar a área da região ITS que permite uma identificação a nível de espécie (Lanfranco et al., 1998). A análise das sequências do rDNA permite a identificação dos organismos a partir da categoria de espécie até um táxon de ordem superior e a elaboração da árvore filogenética.

3 Biodiversidade de fungos micorrízicos arbusculares em mata de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

3.1 Resumo

Em uma reserva de mata nativa e em uma área de replantio de *Araucaria angustifolia*, situadas no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, foram delineadas seis parcelas inteiramente ao acaso, quatro referentes à mata e duas em área de replantio, com plantas de 8 a 12 anos. Foram coletadas amostras de solo rizosférico e raízes em duas épocas do ano, correspondentes à estação chuvosa (fevereiro de 1998) e à estação seca (setembro de 1998) para quantificar e identificar as espécies de fungos MA. Simultaneamente à primeira coleta no campo, foi montado um experimento em casa-de-vegetação para multiplicação dos esporos encontrados no campo (mata e replantio), por duas gerações consecutivas. Verificou-se que *A. angustifolia* é colonizada por fungos MA, apresentando um número elevado de esporos na sua rizosfera. Foram encontradas 22 espécies de fungos MA. Nos vasos de recuperação algumas espécies não se multiplicaram, enquanto outras tiveram sua multiplicação favorecida.

3.2 Summary: Evaluation of the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

The biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with *A. angustifolia* was evaluated in native and reforested soils with *Araucaria angustifolia*. The studied

area was located at the “Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ)”, Campos do Jordão, in the state of São Paulo, Brazil. The experiments were randomized blocks design with four plots established in native forest and two in the replanted area. Each plot contained five 8- to 12-years-old trees. Soil samples from the rhizosphere and roots were collected during the wet (February of 1998) and dry (September of 1998) seasons to evaluate the number of spores and to identify AMF species. *A. angustifolia* was colonized by 22 different species of AMF and their spores were found in high numbers in the rhizosphere. Simultaneously, an experiment was established in the greenhouse to multiply the spores collected from the studied fields during two consecutive generations. Our data showed that under greenhouse conditions several species did not sporulation, while a few others showed a favored spore multiplication.

3.3 Introdução

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze., conhecida como pinheiro do Paraná, é uma espécie nativa ameaçada de extinção. Dentre os inúmeros fatores que obrigam a preservação da araucária, está seu valor econômico a nível madeireiro, resinífero e alimentício, além de encontrar-se associada a grande diversidade biológica, que também corre o risco de desaparecer. Poucos estudos relatam a simbiose entre fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e esta espécie (Milanez & Monteiro, 1950; Oliveira & Ventura, 1952) e nada se conhece sobre sua dependência micorrízica. Igualmente, quase nada é conhecido sobre a biodiversidade destes fungos junto à araucária. Pela gravidade dessa situação e diante da escassêz de pesquisas sobre esta espécie, torna-se importante aumentar o conhecimento sobre a relação existente entre a araucária e os fungos

aumentar o conhecimento sobre a relação existente entre a araucária e os fungos micorrízicos, bem como sobre a diversidade desses fungos MA a ela associados.

Normalmente os locais escolhidos para plantio de espécies florestais no Brasil são áreas com baixa disponibilidade de nutrientes, o que dificultaria ainda mais o estabelecimento das novas plantas. Sendo assim, a presença de fungos MA pode ser considerada fundamental para a sustentabilidade desse ecossistema (Janos, 1980), por auxiliar no estabelecimento das plantas. Em programas de revegetação, a utilização de mudas vigorosas é importante. No entanto, as mudas de espécies florestais geralmente são fracas, com deficiência de fósforo e, com frequência, ocorre sua morte após o transplante (Rifle & Boosalis, 1979). Estes problemas podem ser atenuados através da inoculação de fungos MA no viveiro, quando se conhecem as espécies mais eficientes (Menge, 1983).

O objetivo deste trabalho foi conhecer a diversidade e abundância de fungos endomicorrízicos associados com *Araucaria angustifolia*, em condições de mata nativa e em florestas replantadas e, também, determinar se ocorre interação entre a araucária e o fungo micorrízico arbuscular.

4. Material e Métodos

Levantamento de fungos MA

O local das coletas foi em mata nativa de *Araucaria angustifolia* e em área reflorestada de *A. angustifolia* e *Pinus eliotti* de aproximadamente 10 anos, localizadas no Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ), município de Campos do Jordão, São Paulo, cujas coordenadas geográficas são 22° 45' de longitude oeste de Greenwich. O

clima local é determinado pela classificação de Koeppen como Cfb, que significa: clima subtropical de altitude, mesotérmico e úmido, sem estiagem, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22°C (altitude 1.400 m).

Para a coleta de amostras no campo, o delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados com 6 parcelas, sendo cada parcela representada por 5 árvores de araucária com idade entre 8 e 12 anos, com 4 a 6 m de altura, num total de 30 árvores. As parcelas 1, 2, 3 e 4 estavam localizadas na área de mata natural, enquanto as parcelas 5 e 6 na área de replantio.

A área estudada em Campos do Jordão é montanhosa, apresentando solos rasos. As características químicas das duas áreas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo das áreas estudadas, com 5 amostras compostas por área . O solo foi coletado à profundidade de 0-20 cm.

Áreas	pH (CaCl ₂)	MO g dm ⁻³	P (resina) mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	Al	H + Al
				-----		mmol _c dm ⁻³	-----	
Mata	3,7	61,7	10,0	2,3	11,5	3,3	18,2	122
Replanteio	3,4	54,0	4,5	2,0	1,0	1,0	21,5	122

As árvores de *A. angustifolia* escolhidas tinham altura entre 4 e 6 metros (8 a 12 anos). Foram coletadas, também, amostras de folhas, numa altura de 3 a 4 metros, escolhendo todas as faces de exposição aos sol (norte, sul, leste e oeste), para análises de nutrientes.

As raízes foram coletadas numa profundidade de 0 a 20 cm de profundidade do

solo e estas também foram coletadas de vários pontos em torno da planta. Cada amostra era composta de aproximadamente 20 g de raízes. As raízes de araucária distinguem-se por apresentar uma coloração vermelha e também apresentam “pseudo-nódulos” (Oliveira & Ventura, 1952; Souza et al. 1998), o que facilita distingui-las de outras raízes presentes no solo da mata.

Em duas épocas do ano (fevereiro e setembro), correspondendo ao período de chuvas e de seca, respectivamente, foram coletadas amostras de solo rizosférico e raízes de *Araucaria angustifolia*. O solo próximo às raízes foi coletado em diferentes pontos ao redor da planta, o que resultou em amostras compostas de aproximadamente 300g, que foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a 4°C até serem utilizadas para extração dos esporos.

Identificação de esporos de fungos MA

A extração dos esporos foi feita por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), a partir de uma alíquota de 100 g de solo de cada árvore e centrifugação em sacarose 70% (Jenkins, 1964). A quantificação dos esporos foi feita sob microscópio estereoscópio com aumento de 200X, em placas caneladas. Após obtenção do número total, os esporos foram separados em grupos, de acordo com sua morfologia. Com a ajuda de uma pipeta pasteur, os esporos foram transferidos da placa para lâminas semi-permanentes, onde foram incluídos em resina de álcool polivinílico e glicerol (PVLG), mantendo-se sempre parte dos esporos intactos e outra quebrada para visualização das paredes (Morton et al., 1993). Com o auxílio do microscópio óptico, com aumentos variando de 200 a 400 vezes, foram feitas observações das características como

tamanho, forma, cor, tipo de hifa esporígena, estrutura e ornamentação de parede e modo de germinação. A identificação das espécies foi feita com auxílio do manual de Schenck & Pérez (1988) e descrições fornecidas pelo banco de dados do INVAM.

Para cada grupo morfológicamente distinto de fungos MA foram avaliados o número de esporos e a frequência de ocorrência. A densidade total de esporos refere-se ao número total encontrado em cada área de estudo.

Multiplicação dos esporos

Utilizaram-se 50g de cada amostra de solo, provenientes das diferentes parcelas, como inóculo para vasos semeados com sorgo (*Sorghum bicolor* Moench. L.), a fim de multiplicar e facilitar a identificação dos endófitos presentes (Stutz & Morton, 1996). Cada vaso continha 3 kg de solo (areia quartzosa paredão vermelho e areia lavada de rio na proporção de 2:3) autoclavado. As sementes de sorgo foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 5 minutos. Após 10 dias da semeadura do sorgo, fez-se o desbaste e manteve-se a planta mais vigorosa, que permaneceu por 160 dias, tempo suficiente para ocorrer a colonização radicular e esporulação dos fungos micorrízicos na rizosfera. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo que, após determinação do número de esporos do primeiro plantio, novos vasos foram instalados como descrito anteriormente, e cada um recebeu como inóculo 50g de terra dos vasos do plantio anterior.

A determinação do número de esporos e sua identificação seguiu a mesma metodologia aplicada aos esporos coletados em condições de campo.

Os resultados de biodiversidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA)

e teste *t* (Student), enquanto as médias da multiplicação de esporos foram comparadas pelo teste de Tukey.

3.5 Resultados e Discussão

Levantamento de fungos MA

Todos os segmentos de raízes de *A. angustifolia* analisados estavam colonizados por fungos MA, fato que pôde ser comprovado pela observação de hifas, vesículas, arbúsculos e células auxiliares no interior das e/ou ligados às raízes. Muitas amostras de raízes provenientes da mata nativa apresentaram somente células auxiliares, o que vem confirmar a informação de que as Gigasporaceas podem, às vezes, colonizar as espécies arbóreas com certa exclusividade. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Breuninger et al. (2000), em áreas de *A. angustifolia*, no sul do país.

Observou-se, também, nas parcelas correspondentes, um elevado número de esporos de *Gigaspora* ou *Scutellospora* spp. No entanto, em plantas da área do replantio foram observadas muitas vesículas arredondadas e pequenas, em quase todos os segmentos de raízes, o que significa que deveriam estar sendo colonizadas por espécies do gênero *Glomus*, *Acaulospora* ou *Entrophospora*.

As raízes de plantas da mata nativa apresentaram colonização radicular (CR) maior que plantas da área de replantio, nas duas épocas avaliadas (fevereiro e setembro) (tabela 2). A amplitude de variação da taxa de colonização radicular da araucária variou de 7.2 a 48.3% nas plantas da mata nativa e de 4.4 a 15.8% nas plantas da área de replantio. A média geral de colonização radicular na primeira coleta (fevereiro/98) foi de 22%,

enquanto em setembro/98 a média geral foi menor (17%). Sabe-se que o pH e a concentração de nutrientes no solo podem influenciar na colonização radicular.

Tabela 2. Porcentagem de colonização radicular de *A. angustifolia* por fungos MA em duas épocas do ano (fevereiro/98 e setembro/98, época chuvosa e seca respectivamente). Parcelas 1,2,3 e 4 correspondem a mata nativa e parcelas 5 e 6 área de replantio.

Locais	% de colonização radicular Fev/98	% de colonização radicular Set/98
Parcela 1	28.8 a *	20.6 a
Parcela 2	21.2 ab	19.5 a
Parcela 3	21.2 ab	22.0 a
Parcela 4	28.2 a	21.4 a
Parcela 5	13.9 b	10.3 b
Parcela 6	17.3 b	9.4 b

(*) letras minúsculas distintas nas parcelas diferem entre si pelo teste *t* a $P < 0.05$ e letras maiúsculas comparam épocas entre si, pelo teste *F* a $P < 0.05$. Médias de 5 repetições.

Geralmente a baixa concentração de nutrientes, especialmente de P, contribui para aumentar a colonização radicular (Koide & Li, 1990). Neste presente caso, o solo foi muito ácido nas duas áreas, mais pronunciadamente na de replantio, e, ainda, o solo da mata apresentou teores de P, Ca e Mg pouco maiores que a área do replantio, embora

relativamente baixos. Este fato pode ter contribuído para a maior colonização radicular nas plantas presentes na mata. Observa-se, ainda, que as araucárias parecem estar se beneficiando desta simbiose, pois as plantas mais colonizadas apresentaram concentrações sensivelmente mais elevadas de N, P, Ca e Mg nas folhas (tabela 3), embora esta diferença não tenha sido ao nível de 5%, estes aspectos são relevantes do ponto de vista prático. Concluiu-se, também, que houve uma tendência na média da CR ser sensivelmente menor em setembro para as duas áreas estudadas. Fontenla et al. (1998), estudando florestas da Argentina e do Chile, observaram que não houve diferenças entre taxas de colonização radicular e números de esporos nas duas florestas estudadas, mas houve efeito entre estações do ano, ou seja, a colonização radicular diminuiu em setembro e o número de esporos foi maior neste período. Muitos fatores podem contribuir para estes resultados, como esporulação sazonal (Sutton & Baron, 1972), variação sazonal para o desenvolvimento de plantas hospedeiras (Giovanetti, 1985) e disponibilidade de nutrientes (Louis & Lim, 1987).

O número de esporos de fungos MA mostrou tendência de ser maior na mata, possivelmente devido à alta diversidade de espécies vegetais encontradas neste ecossistema. Dados sobre densidade de esporos podem ser úteis na avaliação do potencial de reprodução dos fungos micorrízicos. No entanto, não são uma medida confiável da sua atividade (Allen & Allen, 1980). Sabe-se que algumas espécies de FMA tem maior capacidade de produzir esporos que outras, sendo que fatores ambientais afetam significativamente a produção de esporos e a colonização das raízes (Saif & Khan, 1975; Ferguson & Menge, 1982).

Tabela 3. Concentração de macronutrientes (g kg^{-1}) em folhas de *A. angustifolia* para condições de mata nativa (parcelas 1 a 4) e para área de replantio (parcelas 5 e 6).

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
	----- (g kg^{-1}) -----					
mata nativa	3.7	1.9	19,1	4,9	2.8	1,4
replântio	1.9	1.3	18.4	3.2	2.2	1,0

Para condições de mata nativa foram encontrados, em média, 812 esporos 100g^{-1} solo em fevereiro e 732 esporos 100g^{-1} solo em setembro; já para a área de replantio, foram encontrados, em média, 584 esporos 100g^{-1} solo em fevereiro e 458 esporos 100g^{-1} solo em setembro. Em estudos em áreas de araucária no Rio Grande do Sul foram encontrados em média para condições de campo 360 esporos 100g^{-1} solo e 600 esporos 100g^{-1} solo para condições de floresta e na rizosfera de plantas adultas (Breuninger et al., 2000), e estes números foram apenas um pouco menores que os encontrados no presente estudo (Campos do Jordão – SP). Observa-se que em áreas florestais o número de esporos é bem maior que em áreas agrícolas, pois as densidades de esporos encontrados em plantação de milho (monocultura) variaram de 26 a 251 esporos 100g^{-1} solo (Maia & Trufem (1990); Graciolli (1992). Também, Read et al. (1976) verificaram, em ecossistema de mata de regiões temperadas, que o número de esporos variou de 11 a 384 esporos 100g^{-1} solo. Comparados com estes dados, pode-se afirmar que na mata de

araucária ocorre elevado número de esporos de fungos MA. Trufem & Bononi (1985) mostram que algumas espécies ocorrem na maioria dos hospedeiros durante o ano todo; outras ocorrem em grande densidade no solo, mas são restritas a poucos hospedeiros e a certas épocas do ano, ainda outras apresentam baixa densidade populacional, mas sem restrições a hospedeiros ou épocas do ano e, finalmente, algumas espécies ocorrem com baixa densidade populacional e são restritas a alguns hospedeiros e a certas épocas do ano.

Na rizosfera de plantas de araucária, situadas na floresta nativa, foi encontrado um total de 20 espécies de fungos MA identificados e outras 3 espécies que não puderam ser identificadas, isto para as duas épocas amostradas (tabela 4).

O gênero *Glomus* apresentou o maior número de espécies (9), seguido de *Acaulospora* (4), *Scutellospora* (3), *Gigaspora* (2) e *Entrophospora* (1). Considera-se que a diversidade de espécies de fungos MA encontrados na rizosfera da *A. angustifolia* na mata, foi alta (tabela 4), confirmando dados de Sieverding (1991), que relata que a diversidade biológica de populações de fungos endomicorrízicos em ecossistemas naturais é elevada (25 a 30 espécies), quando comparada com a de ecossistemas agrícolas (5 a 15 espécies). A redução da diversidade de esporos é atribuída à diminuição de espécies de plantas na agricultura intensiva, especialmente em monocultura e/ou em áreas degradadas.

Tabela 4. Números de esporos de fungos MA 100 g⁻¹ de solo em mata nativa de *A. angustifolia* (parcelas 1 a 4) e suas frequências relativas em percentagem durante duas estações do ano (verão, fevereiro de 1998, e final do inverno, setembro de 1998).

Espécies de fungos MA	NE	FR (%)	NE	FR (%)
	Fev./98	Fev./98	Set./98	Set./98
<i>Acaulospora bireticulata</i> Rothwell & Trappe	42	1	0	-
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicol.	216	7	114	3
<i>Acaulospora laevis</i> Gerd. & Trappe	272	9	136	7
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	78	3	162	5
<i>Acaulospora</i> sp1.	64	2	54	2
<i>Acaulospora</i> sp2.	50	2	16	1
<i>Acaulospora spinosa</i> Walker & Trappe	26	1	184	6
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Schenck	120	4	100	3
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	318	11	576	17
<i>Gigaspora decipiens</i> Hall & Abbott	80	3	0	-
<i>Glomus aggregatum</i> (Schenck & Smith) Koske	136	5	0	-
<i>Glomus clarum</i> Nicol. & Schenck	0	-	38	1
<i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker	0	-	74	2
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerd.	530	18	596	18
<i>Glomus fasciculatum</i> Gerd. & Trappe (Walker & Koske)	186	6	202	6
<i>Glomus geosporum</i> (Nicol. & Gerd.) Walker	0	-	88	3
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & Tul.	252	9	494	15
<i>Glomus microcarpum</i> Gerd. & Trappe	0	-	276	8
<i>Glomus pansihalos</i> Berch & Koske	220	7	0	-
<i>Scutellospora heterogama</i> Nicol. & Gerd.	0	-	76	2
<i>Scutellospora nigra</i> (Redhead) Walker & Sanders	50	2	0	-
<i>Scutellospora pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	282	10	0	-
Não identificados	0	-	20	1
Número total de esporos	2922		3354	
Riqueza	17		17	

Na primeira coleta (fev/98), para as condições de mata as espécies que tiveram maior frequência foram *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e *Scutellospora pellucida*. Já na segunda coleta (set/98), as espécies *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* mostraram a mesma tendência da primeira coleta, seguidos de *Glomus macrocarpum*. Schenck & Siqueira (1987), em ecossistemas naturais no Brasil encontraram 16 espécies de fungos MA e, na Colômbia, também em ecossistemas natural, Toro & Sieverding (1986) verificaram 21 espécies. Sabe-se que a presença de diferentes espécies está relacionada com diferentes fatores e um deles é o pH. A espécie *Gigaspora margarita* somente foi observada em $\text{pH} < 5,5$ (Schenck & Siqueira, 1987; Lambais & Cardoso, 1988). Isto valida sua presença neste ecossistema estudado. Outras espécies, como *Acaulospora scrobiculata*, *A. spinosa*, *G. aggregatum* e *G. etunicatum* podem ser encontradas em solos tropicais com pH 3,8 a 8,0.

Na área de replantio foram encontradas 12 espécies identificadas de fungos MA e 2 espécies que não puderam ser identificadas, nas duas épocas amostradas (tabela 5). Novamente, *Glomus* foi que apresentou o maior número de espécies (5), seguido de *Acaulospora* (3), *Scutellospora* (2), *Gigaspora* (2) e *Entrophospora* (1). As espécies dominantes na primeira coleta (fev/98) foram *G. diaphanum*, *G. macrocarpum* e *G. pansihalos* e, na segunda coleta (set/98), *G. macrocarpum*, *G. diaphanum* e *G. clarum* (tabela 5). Observou-se, também, na área de replantio e na segunda coleta (set/98), a presença de duas espécies de *Scutellospora*, as quais não tinham sido encontradas nas amostras coletadas em fevereiro. Espécies como *A. rehmi* e *S. gilmorei* foram encontradas exclusivamente nessa área, além de duas espécies ainda não descritas.

Tabela 5. Números de esporos (NE) de fungos MA 100 g⁻¹ de solo em área de replantio de *A. angustifolia* (parcela 5 e 6) e suas frequências relativas (FR) em percentagem durante duas estações do ano (verão, fevereiro de 1998, e final do inverno, setembro de 1998).

Espécies de fungos MA	NE	FR (%)	NE	FR (%)
	Fev./98	Fev./98	Set./98	Set./98
<i>Acaulospora laevis</i> Gerd. & Trappe	90	8	0	-
<i>Acaulospora spinosa</i> Walker & Trappe	0	-	36	4
<i>Acaulospora rehmsii</i> Sieverding & Toro	16	1	0	-
<i>Acaulospora</i> sp 1	36	3	0	-
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Scenck	86	7	44	5
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	160	14	0	-
<i>Gigaspora decipiens</i> Hall & Abbott	14	1	0	-
<i>Glomus clarum</i> Nicol. & Schenck	0	-	54	6
<i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker	340	29	328	37
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerd.	0	-	30	3
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & Tul.	256	22	348	39
<i>Glomus pansihalos</i> Berch & Koske	172	15	0	-
<i>Scutellospora gilmorei</i> (Trappe & Gerd.) Walker & Sanders	0	-	30	3
<i>Scutellospora</i> sp.	0	-	20	3
Número total de esporos	1170		890	
Riqueza	9		8	

Observou-se que na área de replantio, o gênero *Glomus* representou de 60 a 85% de frequência (figura 1). Souza & Silva (1996) relatam que em latossolo decapitado, no município de Angra dos Reis (RJ) a população de fungos nativos consistia apenas de esporos de *G. macrocarpum*. Outros trabalhos relatam que algumas espécies de Glomales são adaptadas a solos ácidos e, em geral, dominam a comunidade de fungos MA (Sieverding, 1991; Siqueira et al, 1990). Neste presente estudo verificou-se a predominância de *Glomus*, confirmando os dados citados acima. Vale salientar, também, que o solo era ácido em todos os locais estudados e, ainda, que na área de replantio o solo está mais degradado e se encontra em fase de recuperação.

Figura 1. Porcentagem (%) de ocorrência de fungos MA em 4 sítios de mata nativa e 2 em áreas de replantio de *Araucaria angustifolia*. Os dados foram obtidos em 100 g de solo. As duas primeiras colunas representam a floresta nativa e as duas últimas a área de replantio, nas duas épocas amostradas. (Gl. = *Glomus*; A. = *Acaulospora*; Gi. = *Gigaspora*; E. = *Entrophospora*; S. = *Scutellospora*)

Nas diferentes parcelas foram encontrados praticamente todos os gêneros de fungos MA (tabelas 4 e 5). Os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* estiveram presentes em todas as parcelas, sendo que no gênero *Glomus* se verificou um total de 9 espécies.

Ao todo foram encontradas 22 espécies de fungos MA e outras 4 espécies que não puderam ser identificadas, provavelmente espécies ainda não descritas, sendo que 11 espécies de fungos MA foram comuns para ambas as áreas. As espécies encontradas com maior frequência foram *G. etunicatum* e *G. macrocarpum*.

Bononi et al. (1989) encontraram 15 espécies de fungos MA na rizosfera de *A. angustifolia* do Jardim Botânico de São Paulo. No entanto, na mata natural de Campos do Jordão, foram encontradas 22 espécies, sendo que nesses dois trabalhos (Bononi et al., 1989 e este em discussão) apenas seis espécies em comum (*S. pellucida*, *A. gerdemannii*, *G. macrocarpum*, *G. etunicatum*, *E. colombiana* e *A. scrobiculata*).

Na mata nativa a riqueza de espécies foi maior que na área de replantio, pois foram encontradas 17 espécies de fungos MA nas duas épocas amostradas, enquanto que no replantio se observaram apenas 9 e 8 espécies (respectivamente na primeira e segunda coletas). Houve variabilidade na composição das espécies encontradas nas duas épocas de coleta (figura 1). A maior biodiversidade na floresta nativa representa uma maior estabilidade no ecossistema. Em situações de campo é desejável a manutenção ou obtenção de uma comunidade de fungos MA diversificada, para que aumentem as chances de ocorrerem combinações eficientes entre fungos e hospedeiros (Colozzi-Filho, 1999). Sabe-se, também, que a diversidade de espécies de fungos MA pode ser aumentada com o maior número de plantas hospedeiras e, isto ocorrendo, a diversidade do ecossistema será maior e mais estável (van der Heidjen, 1998).

Multiplicação de esporos

Através do cultivo sucessivo dos esporos de fungos MA originalmente obtidos de amostras de solo rizosférico de araucária e com a utilização de hospedeiro alternativo (sorgo), esperava-se obter uma comunidade semelhante àquela que ocorre na mata, embora se deva considerar que a multiplicação dos fungos MA é afetada por diversos fatores, como temperatura, umidade (Zack et al., 1995), hospedeiro, nutrientes (Cardoso & Freitas, 1992). A escolha do sorgo foi em razão de muitos trabalhos citados na literatura, onde se utilizam sorgo ou milho. Neste caso, se utilizássemos araucária, esta, por ser uma espécie arbórea demoraria muito para completar seu ciclo, tornando esta técnica de multiplicação inviável. Entretanto, a mudança de planta hospedeira obviamente poderia acarretar modificações do equilíbrio original.

Conhecendo-se as espécies presentes na rizosfera da araucária, em condições de campo, foi possível observar, em casa de vegetação, as espécies nativas que foram recuperadas nos vasos de multiplicação.

Observa-se que o número de esporos foi sempre maior no segundo ciclo de recuperação. Ao todo, foram recuperadas com sucesso 8 espécies de fungos MA encontradas a campo (tabela 6 e 7). No segundo ciclo de multiplicação, *S. pellucida* representou 52% do total encontrado e *A. gerdemannii* 25% para esporos originários de mata nativa.

Tabela 6. Números de esporos (NE) de fungos MA 100 g⁻¹ de solo e suas frequências relativas (FR) em percentagem, em vasos de multiplicação com sorgo como planta multiplicadora e contendo 50 g de solo rizosférico como inóculo de fungos MA, proveniente das parcelas 1 a 4 (mata nativa).

Espécies de fungos MA	NE	FR (%)	NE	FR (%)
	1º. ciclo	1º. ciclo	2 º. ciclo	2 º. ciclo
<i>Acaulospora foveata</i> Janos & Trappe	8	2	0	-
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Rose, Daniels & Trappe	0	-	212	25
<i>Acaulospora laevis</i> Gerd. & Trappe	24	10	0	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	18	6	50	6
<i>Acaulospora spinosa</i> Walker & Trappe	6	2	0	-
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Schenck	50	16	50	6
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	0	-	6	1
<i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker	82	26	22	3
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerd.	20	6	0	-
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & Tul.	98	32	18	2
<i>Scutellospora pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	0	-	434	52
Não identificados	0	-	42	5
Número total de esporos	306		834	
Riqueza	8		8	

Sabe-se que, no sistema de multiplicação de esporos, é necessário mais de um ciclo de observação, para que a comunidade de fungos MA apresente alterações em sua composição e exiba maior diversidade. Este comportamento foi verificado por Stutz & Morton (1996), em três ciclos sucessivos de *Proposis* spp. cultivados em vasos e inoculados com solo rizosférico de *P. velutina* Wooton, proveniente de três regiões do Arizona (EUA). Carrenho (1998) verificou que o cultivo sucessivo foi uma boa prática para recuperação de espécies de fungos MA que fazem parte da comunidade original. Espécies como *A. longula*, *G. mosseae* e *S. calospora* ocorreram somente no terceiro ano de cultivo. Naquele caso, no primeiro ano, *G. macrocarpum* foi dominante. no segundo ano foi *G. etunicatum* e no terceiro ano *G. claroideum*.

Nos dois ciclos de multiplicação, observou-se que parte dos fungos presentes na rizosfera da *A. angustifolia* a campo não foi recuperada na rizosfera do sorgo, utilizado como hospedeiro (tabela 6 e 7). Esta indicação mostra que nem todos os propágulos estavam adaptados ao novo substrato e/ou às novas condições ambientais. Por outro lado, diversas espécies encontradas na área de mata nativa tiveram condições favoráveis para completarem seu ciclo, tendo o sorgo como hospedeiro. Todavia, nota-se que a tendência de maior diversidade da mata continuou e, mesmo nestas condições, verificaram-se 12 espécies de fungos MA nos vasos representantes da mata e 8 espécies nos correspondentes à área de replantio. Do solo referente ao replantio, foram recuperadas 60% das espécies encontradas em condições de campo. O sorgo favoreceu a multiplicação das espécies de *G. macrocarpum*, *G. etunicatum*, *G. diaphanum* e *S. pellucida*.

Tabela 7. Números de esporos (NE) de fungos MA 100 g⁻¹ de solo e suas frequências relativas (FR) em percentagem, em vasos de multiplicação com sorgo como planta multiplicadora e contendo 50 g de solo rizosférico como inóculo de fungos MA, proveniente das parcelas 5 e 6 (área de replantio).

Espécies de fungos MA	NE	FR (%)	NE	FR (%)
	1º. ciclo	1º. ciclo	2º. ciclo	2º. ciclo
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Rose, Daniels & Trappe	0	-	28	9
<i>Acaulospora laevis</i> Gerd. & Trappe	4	3	0	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	22	15	16	5
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Schenck	0	-	10	3
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	0	-	14	5
<i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker	38	27	74	24
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerd.	0	-	76	24
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & Tul.	78	55	94	30
Número total de esporos	142		312	
Riqueza	4		7	

Observou-se, ainda, a presença de *A. foveata*, espécie não encontrada na área de mata nativa e somente observada em vasos de multiplicação (tabela 6). Isto indica que existiam propágulos desta espécie no solo rizosférico proveniente da mata nativa, e que, nesta condição, foi permitida sua esporulação.

Alterações na composição da comunidade de fungos MA podem influenciar a

produção vegetal e a composição fitossocioecológica em ecossistemas naturais. Sanders et al.(1977) e Melloni & Cardoso (1999) demonstraram que diferentes espécies de fungos MA produzem diferentes quantidades de hifas externas, o que determina distintas taxas de absorção de fósforo e de crescimento vegetal, dependendo do simbiote.

Embora tenha sido encontrado em condições de campo em pequenas proporções, a multiplicação de *G. diaphanum* nos vasos foi altamente favorecida. No entanto, a *Gigaspora margarita* mostrou uma tendência contrária. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Colozzi-Filho (1999) em experimentos com café.

3.6 Conclusões

A *Araucaria angustifolia* é colonizada por fungos micorrízicos arbusculares observando-se modelos de colonização típicos principalmente de Gigasporaceas, Glomaceas e outras. A biodiversidade de fungos MA foi bem maior em mata nativa (22 espécies) do que em áreas de replantio (12 espécies). O número de esporos foi maior em condições de mata nativa. Nos vasos de multiplicação a tendência foi a mesma das condições de campo, onde o número de esporos foi maior nos vasos representantes da mata nativa. Muitas espécies foram recuperadas dos vasos de multiplicação e algumas tiveram sua multiplicação favorecida, como *Glomus diaphanum* e *Acaulospora foveata* que não puderam ser observadas no campo. Mas *Gigaspora margarita* teve sua multiplicação inibida nos vasos, apesar de sua boa representatividade em alguns talhões da mata nativa.

4 Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sob níveis de fósforo

4.1 Resumo

Em condições de casa-de-vegetação foi instalado um experimento num esquema fatorial: 3 espécies de fungos de MA (*Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea* e uma mistura de fungos MA nativos, provenientes da mata de araucária, contendo quase todos os gêneros de FMA existente, com exceção de *Sclerocystis*) e um controle sem fungo MA x 4 níveis de P (0, 20, 50 e 150 mg P kg⁻¹ de substrato na forma de KH₂PO₄ e NaH₂PO₄H₂O), com cinco repetições por tratamento, num total de 80 vasos de 20 litros cada. Avaliou-se o desenvolvimento da parte aérea e raiz e a massa da matéria seca total e sobressaíram-se as plantas inoculadas com *Gigaspora rosea* na dose 20 mg P kg⁻¹. A maior taxa de colonização radicular foi verificada em plantas de araucária inoculadas com mistura de FMA, diferindo dos demais tratamentos pelo teste *t*, ao nível de 5% de probabilidade. O número de esporos multiplicados em plantas de araucária foi maior para *Gigaspora rosea*. A presença dos fungos MA foi eficiente no desenvolvimento das plantas, principalmente as colonizadas por *Gigaspora rosea* e a mistura de FMA, quando comparadas com as plantas não inoculadas. A inoculação com *Glomus intraradices* não se mostrou eficiente para o desenvolvimento de plantas de araucária, pois somente resultou em maior desenvolvimento da planta, quando comparada com o controle nos níveis mais elevados de P, mas não diferiu da *Gigaspora rosea* e da mistura de FMA em níveis baixos de P.

4.2 Summary: Mycorrhizal dependence of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. at different phosphate levels.

This study evaluated the absorption of phosphorus (P) and the mycorrhizal dependence of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. at different P levels under greenhouse conditions. *Araucaria* plants were inoculated with *Gigaspora rosea* and *Glomus intraradices* (from the collection at the Soil Microbiology Laboratory – ESALQ/USP), and with a mixture of AMF collected from the native forest located in Campos do Jordão, in the state of São Paulo, Brazil. The control was non-inoculated plants. The native inoculum consisted of different genera of existent AMF, with the exception of the *Sclerocystis* genus. Four levels of P were tested (0, 20, 50 and 150 mg P kg⁻¹ of soil), in the form of KH₂PO₄ and NaH₂PO₄H₂O, to determine the best level for the development of the plants. Each treatment had five repetitions making a total of 80 pots of 20 liters each. The values for the development of the shoot and root as well as the total weight of the dry matter were higher for plants inoculated with *Gi rosea* when in combination with 20 mg kg⁻¹ P. The highest colonization rate was observed for plants inoculated with the mixture of native AMF. This result differed from the others by the *t*-test at the level of 5% probability. *Gi rosea* produced the highest number of spores on *A. angustifolia*. Our data revealed that plants inoculated with *Gi rosea* and with the mixture of native AMF showed the best growth development. Plants inoculated with *G. intraradices* showed good growth development only when associated with high levels of P. However, they did not differ from those inoculated with the other two inocula when associated with lower levels of P.

4.3 Introdução

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. é uma espécie florestal de grande valor econômico e ecológico. Poucos estudos existem sobre a sua dependência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e os benefícios que estes poderiam proporcionar-lhe.

Para que a *A. angustifolia* seja cultivada e preservada, é necessário conduzir estudos que tenham como objetivo melhorar o sistema de produção de mudas com uma tecnologia que promova um melhor crescimento e desenvolvimento da espécie a partir do viveiro, como pode ocorrer devido a inoculações com fungos MA, visto que esta espécie apresenta, em seu habitat natural, associação com fungos nativos (Milanez & Monteiro, 1950; Oliveira & Ventura, 1952; Souza et al., 1998).

Sabe-se que os fungos MA estimulam o crescimento das plantas, visto que hospedeiros micorrizados apresentam maior absorção de água e nutrientes (Bowen, 1973), especialmente daqueles de baixa mobilidade que se encontram fora do alcance da raiz, sobretudo o P (Cardoso, 1985, 1996), Zn (Pacovsky et al. 1986) e Cu (Pacovsky, 1986). A planta micorrizada produz mais biomassa e é mais tolerante a ferro, alumínio e Mn (Cardoso, 1994, 1996; Vogt et al. 1987), estresses hídricos (Mosse et al. 1981; Barea et al., 1993) e valores extremos de pH e salinidade (Sylvia & Williams, 1992). Normalmente os efeitos da inoculação são mais pronunciados em solos com baixa disponibilidade de nutrientes (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). Além disso, as micorrizas desempenham função importante na ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais (Vogt et al. 1991).

Por isto, especialmente em espécies florestais que tenham fase de viveiro, a inoculação com fungos MA pode ser um fator importante no seu estabelecimento. Mudanças de essências florestais micorrizadas têm maior capacidade de absorver nutrientes e água, resultando em maior sobrevivência e crescimento das plantas em condições naturais (Marx, et al, 1984).

Em experimentos de casa-de-vegetação pode-se avaliar os efeitos do fungo MA sobre o crescimento da planta hospedeira e determinar as melhores condições para se produzir mudas de boa qualidade.

O objetivo deste experimento foi determinar o fungo micorrízico arbuscular mais eficiente para o desenvolvimento das plantas de araucária sob diferentes doses de P.

4.4 Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de *Araucaria angustifolia* provenientes do Parque Estadual de Campos do Jordão, que foram separadas e escolhidas, procurando-se manter uniformidade em relação ao tamanho. Aproximadamente 200 sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 0,5% e foram semeadas em caixa de areia de rio lavada e esterilizada por autoclavagem. Ao final de aproximadamente 60 dias, as plântulas foram retiradas e transplantadas para vasos com capacidade para 1,5 kg de solo esterilizado. Após um mês, estas foram selecionadas de acordo com sua uniformidade e foram transplantadas para vasos com 20 kg de solo esterilizado, juntamente com o inóculo de fungo MA.

O experimento teve um delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial:

3 espécies de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea* e uma mistura contendo esporos nativos provenientes da mata de *Araucaria angustifolia*, contendo os gêneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Entrophospora* e *Scutellospora*) e um controle sem fungo micorrízico x 4 doses de P (0, 20, 50 e 150 mg P kg⁻¹ de substrato na forma de KH₂PO₄ e NaH₂PO₄H₂O), com 5 repetições por tratamento, num total de 80 vasos de 20 litros cada.

O substrato utilizado foi proveniente de uma amostra de Neossolo quartzarênico (série Paredão Vermelho), (pH em CaCl₂ 3,9; 14 g dm⁻³ de M.O.; 2 mg dm⁻³ de P (resina); 0,5; 3; 1; 9 e 47 mmolc dm⁻³ de K⁺, Ca⁺², Mg⁺², Al⁺³ e H⁺+Al⁺³, respectivamente). Três partes dessa amostra de solo foram misturadas com 1 parte de areia de rio peneirada e lavada e a mistura foi autoclavada por 2 horas a 121°C, corrigido o pH e adubada, conforme Antunes & Cardoso (1991). O substrato dos vasos foi infestado com os propágulos de fungos MA, utilizando-se 20 g de solo rizosférico e raízes de *Braquiaria decumbens* micorrizada por vaso, antes do transplântio de muda de araucária. Nos vasos controles utilizou-se a mesma quantidade de solo rizosférico e raízes de plantas de braquiária não inoculadas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e regadas de acordo com a necessidade.

Um ano após o transplântio, colheram-se as plantas e avaliaram-se: a) matéria seca da parte aérea (MSPA), após peso constante em estufa a 60°C; b) peso seco da raiz, após peso constante em estufa a 60°C; c) macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) da parte aérea, segundo método descrito em Sarruge & Haag (1974); d) porcentagem de colonização radicular (Phillips & Hayman, 1970; Giovanetti & Mosse, 1980; Bethlenfalvay & Ames, 1987); e) número de esporos

(Gerdemann & Nicolson, 1963)

Os dados obtidos foram transformados, sendo os de porcentagem de colonização radicular para $\arcsin(x / 100)^{1/2}$ e o número de esporos para $(x + 0,5)^{1/2}$. Estes dados foram submetidos à análise de variância e aplicou-se o teste *t* de Student para a comparação das médias.

4.4 Resultados e Discussão

As raízes das plantas não inoculadas com fungos MA foram analisadas e apresentaram-se isentas de colonização; também não se detectaram esporos de fungos MA nesse tratamento.

A colonização radicular de plantas de *A. angustifolia* inoculadas com os diferentes fungos MA variou de 10,76% a 21,95% (Tabela 1), sendo a maior colonização radicular nas plantas inoculadas com a mistura de esporos de fungos nativos, seguida por aquelas inoculadas com o fungo *Gigaspora rosea*, estas não difeririam estatisticamente entre si. Plantas inoculadas com *Glomus intraradices* obteve a menor colonização. Não houve interação entre dose x fungo, mas houve efeito de fungo, onde estudou-se separadamente.

Moreira-Souza et al. (2000), verificaram que, em mata de araucária, a taxa de colonização radicular variou de 7,2 a 48,3% e, em áreas de reflorestamento, com a mesma planta, de 4,4 a 15,8 %. Existem estudos que mostram que baixos valores de colonização radicular, como por exemplo 5%, já é suficiente para um bom desenvolvimento da planta (Ezeta & Santos, 1980), por outro lado, alguns fungos tem

habilidade de se associarem às raízes indiscriminadamente, produzindo efeitos que variam de neutros a negativos para as plantas, sendo por isso denominados oportunistas ou comensalistas (Peng et al., 1993). Portanto, valores de colonização radicular para o fungo *Gi. rosea* (média de 19,94%) e mistura de FMA (media de 21,95%) após um ano de cultivo, provavelmente devem ser considerados satisfatórios e suficientes para proporcionar um desenvolvimento adequado das plantas de araucária.

É importante salientar que nem sempre o estabelecimento da associação simbiótica garante eficiência micorrízica elevada. Muitas vezes, as espécies de fungos MA com mecanismos evoluídos em infectividade não se apresentam especializados em fornecer benefícios para a planta, ou seja, são ineficientes nas trocas, não favorecendo o crescimento daquela (Hetrick & Wilson, 1991).

A colonização radicular tem sido freqüentemente relacionada com o pH e a concentração de nutrientes no solo (Koide & Li, 1990). Acidez e baixa concentração de nutrientes no solo correlacionam-se positivamente com a colonização radicular, indicando que o fungo, ao mesmo tempo em que favorece o crescimento das plantas, aumenta sua atividade metabólica nas raízes. Entretanto, em situações de maior disponibilidade de nutrientes, as plantas tendem a dificultar a colonização, para não perder carboidratos consumidos pelos fungos (Graham & Eissenstat, 1994), que podem chegar a 39% do total do produto da fotossíntese (Peng et al., 1993).

Tabela 1. Massa do material seco da raiz (MSRA), índice de matéria seca parte aérea sobre a matéria seca de raiz (MSPA/MSRA), porcentagem de colonização radicular de plantas de *A. angustifolia* cultivadas por 12 meses na presença de 3 tipos de inóculos de FMA e sob níveis de P. (Médias de 20 repetições)

Inóculo	MSRAIZ	MSPA/MSRA	% colonização
Controle	18,5 b *	2,26 a	0
<i>Gigaspora rosea</i>	44,3 a	1,19 b	19,94 a
<i>Glomus intraradices</i>	37,9 a	1,29 b	10,76 b
Mistura de FMA	42,7 a	1,03 b	21,95 a

(*) letras minúsculas na vertical comparam as médias entre inóculos na média dos níveis de fósforo, pelo teste t ($P < 0,05$).

Para o peso de matéria seca de raiz houve variação devido à de inoculação de fungos MA, mas não pelo nível de P no substrato. Observa-se que plantas controles (não inoculadas) diferiram estatisticamente de todas as plantas com os diferentes inóculos de FMA. Nota-se que as plantas inoculadas apresentam praticamente o dobro do peso seco de raiz em relação à planta controle. Neste estudo, também ficou claro que a simbiose não só aumentou a biomassa vegetal, como também influenciou a proporção

na qual esta se distribui entre a parte aérea e a raiz. O estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação destes a parte aérea causa, relativamente, menor transferência de fotossintatos à raiz e maior retenção deles na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde. Como consequência, a relação peso de matéria seca da parte aérea/peso da matéria seca da raiz é, em geral, mais elevada em plantas micorrizadas (Silveira, 1992).

As médias dos números de esporos para cada fungo estudado diferiram entre si, mas não houve efeito entre os níveis de P. Os fungos MA que mais esporularam foram os FMA nativos (26 esporos 50g^{-1} solo), seguidos pela *Gi. rosea* (14 esporos 50g^{-1}) e *G. intraradices* (9 esporos 50g^{-1}). Na mistura de fungos MA, notou-se grande esporulação de *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Entrophospora* e *Glomus*. Já as *Gigaspora* spp parecem ter tido sua esporulação inibida por algum fator, pois, no solo da mata havia uma grande quantidade desses esporos (dados não apresentados). Outros estudos também mostram esta tendência da não recuperação de *Gigaspora* em raízes de milho e sorgo em condições de casa-de-vegetação foi também realtada por Colozzi-Filho (1999). A inoculação com *Gigaspora rosea* resultou em maior número de esporos em 50 g de solo analisado, comparado com os outros inóculos.

O tratamento com *Glomus intraradices* apresentou, assim como para colonização radicular, menor número de esporos. Somente na dose 150 mg/kg de P é que se observaram maiores valores, mesmo assim inferiores aaos de *Gi. rosea* e da mistura de fungos MA.

Embora não existam evidências consistentes que relacionem colonização e esporulação em fungos MA, uma colonização mínima é necessária para que a

esporulação ocorra. Um nível mínimo de colonização micorrízica de três vezes o comprimento radicular parece necessário para que a esporulação seja estimulada em *Acaulospora* e *Scutellospora* (Franke & Morton, 1994).

Massa do material seco da Parte Aérea (MSPA)

Quanto à produção de MSPA houve diferenças significativas em relação à inoculação com fungos MA, nos diferentes níveis de P (tabela 2).

O desenvolvimento das plantas de araucária inoculadas com fungos MA sempre foi superior ao das plantas não inoculadas. O efeito positivo de fungos MA, em função das doses de P, sobre o crescimento das plantas, seguiu a seguinte ordem: *Gigaspora rosea*, mistura de fungos nativos e *Glomus intraradices*. As plantas controle, sem fungo MA, tiveram desenvolvimento inferior ao das plantas inoculadas, tanto para parte aérea como para raízes.

Plantas inoculadas com *Gigaspora rosea* apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea, principalmente na segunda dose de P (20 mg kg⁻¹), onde foi alcançado de todas as plantas em comparação. Este resultado é muito importante pois, assim, haverá plantas alcançando seu desenvolvimento máximo em pequena dose de P, o que torna seu cultivo economicamente viável. Sabe-se também que os solos brasileiros apresentam teores de P baixos e esta espécie de fungo MA terá maior eficiência simbiótica. Resultados semelhantes, onde a espécie *Gigaspora margarita* promoveu melhores desenvolvimentos da planta em doses mínimas de P, foram encontrados para café e jacarandá da Bahia (Colozzi-Filho & Siqueira, 1986; Antunes et al., 1988; Chaves, et al., 1995).

Tabela 2. Médias de matéria seca de parte aérea de *Araucaria angustifolia* inoculada com diferentes FMA ou sem inoculação, submetidos a diferentes níveis de fósforo.

Inóculo	Níveis de P (mg kg ⁻¹ solo)			
	0	20	50	150
Controle	19,14 b* B**	18,15 c B	35,32 b A	35,62 b A
Gigaspora rosea	44,54 a B	61,82 a A	52,08 a AB	48,02 a B
Glomus intraradices	24,74 b C	38,08 b B	49,20 a A	57,82 a A
Mistura de FMA	38,04 a B	41,98 b AB	44,24 ab AB	50,88 a A

(*) letras minúsculas comparam as médias entre inóculos no mesmo nível de fósforo na vertical, pelo teste *t* ($P < 0,05$). (**) letras maiúsculas comparam as médias entre níveis de fósforo na horizontal pelo teste *t* ($P < 0,05$).

As plantas inoculadas com *Glomus intraradices* obtiveram maior crescimento nas doses 50 e 150 mg kg⁻¹, mas não diferiram significativamente daquelas inoculadas com *Gigaspora rosea*. Este resultado mostra que *Glomus intraradices* necessita do nível máximo de fósforo para promover o máximo crescimento das plantas (150 mg kg⁻¹), o que não seria viável economicamente.

Plantas não inoculadas obtiveram sempre menor peso de massa seca de parte aérea, mesmo com adição de doses crescentes de P, quando comparadas com plantas inoculadas. É interessante salientar que muitas plantas do controle (sem fungo), além de terem um desenvolvimento menor, se apresentavam amareladas e definhantes.

É sabido que em alguns casos pode ocorrer a redução das taxas de crescimento de plantas hospedeiras micorrizadas quando cultivadas em presença de elevadas doses de adubo fosfatado (Cardoso et al., 1986; Antunes & Cardoso, 1991). No presente

trabalho entretanto, as doses de P utilizadas não foram tão elevadas e houve efeito positivo entre matéria seca da parte aérea, para plantas inoculadas com os fungos *Glomus intraradices* e mistura de FMA. Especialmente, para *Glomus intraradices* somente houve resposta na dose 150 mg kg⁻¹.

Macronutrientes

Para o nitrogênio e potássio não houve interação entre doses de P e inoculação de fungos MA. O nitrogênio absorvido e acumulado em plantas inoculadas ou não não diferiu ao nível de significância de 5% pelo teste *t*.

Com relação ao teor de P na massa da matéria seca foliar, houve diferença estatística significativa dentro de dose e interações dose x fungos. Efeitos diferenciados no teor de P absorvido também foram observados quando submetidos aos tratamentos de inoculação e sem inoculação, dentro dos quatro níveis de P estudados (figura 1). O P absorvido pelas plantas aumentou com o teor de P adicionado ao solo, enquanto que a inoculação com fungos MA proporcionou aumentos significativos na absorção de P pelas plantas de araucária, efeito esse, que também foi observado em estudos com plantas cítricas (Cardoso et al., 1986; Antunes et al., 1988; Gomes, 1997; Melloni & Cardoso, 1999).

Para o conteúdo de cálcio e magnésio houve uma elevação característica para *Gi. rosea* a 20 mg/kg⁻¹, (figura 1), sendo que houve efeito significativo entre fungos x doses. Sempre as inoculadas com plantas *Gi. rosea* a 20 mg/kg⁻¹ obtiveram maior acúmulo destes nutrientes.

Figura 1. Teores Mg (a), P (b) e Ca (c) nas folhas de plantas de *A. angustifolia* inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (*Gi. rosea*, *G. intraradices* e mistura de FMA) ou não inoculadas (controle), após um ano do transplante, considerando as doses de fósforo. Teste *t* a 5%.

A absorção e acúmulo do enxofre na massa do material seco, foi influenciado pelas doses de P adicionadas ao substrato de cultivo. A tendência de elevação no conteúdo de S nas plantas de araucária pode ser atribuída a uma boa disponibilidade deste nutriente no substrato, em função não apenas das elevadas doses de P, mas também devido à adubação inicial de base, quando se supriu a demanda de nitrogênio e

de magnésio com fertilizantes que continham S em suas fórmulas. Plantas inoculadas com *Gi. rosea* mostram a mesma tendência visualizada para Ca e Mg.

Micronutrientes

Para o cobre, não houve diferença significativa para fungos e nem para interação dose x fungo. Com relação às quantidades de zinco absorvidas pelas plantas, houve um efeito da interação doses de P x FMA (figura 2). Houve uma tendência de redução de Zn no controle e nas plantas inoculadas com *Gi. rosea* na dose mais elevada de P. Para plantas inoculadas com *Glomus intraradices* e mistura de FMA, houve tendência de aumento em relação ao aumento dos níveis de P.

Lambert et al., (1979) e Olsen, (1972) verificaram que existe um comportamento antagônico entre P e o Zn, que seria uma consequência da interação existente entre esses nutrientes na planta, a qual é estudada sob três principais aspectos: a) diminuição na taxa de translocação do Zn das raízes para a parte aérea das plantas, como efeito das elevadas doses de P, que irão reduzir a disponibilidade do Zn devido a formação entre outras formas, de $Zn_3(PO_4)_2$ insolúvel; b) efeito da diluição da concentração do Zn na parte aérea, face à resposta de crescimento pela aplicação de P ao solo e c) ao distúrbio metabólico nas células da planta, devido o desequilíbrio entre P e Zn causado pela interferência excessiva de P na função metabólica do Zn.

Figura 2. Teores de ferro (a), Mn (b) e Zn (c) nas folhas de plantas de *A. angustifolia* inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (*Gi. rosea*, *G. intraradices* e mistura de FMA) ou não inoculadas (controle), após um ano do transplante, considerando as doses de fósforo. Teste *t* a 5%.

Todavia, neste estudo não se verificou este tipo de efeito do P, sendo que o aumento das doses de P pouco influenciou a absorção de Zn pelas plantas inoculadas ou sem inoculação (figura 2).

Em relação ao conteúdo de manganês (Mn), vários autores citados por Murphy et

al. (1981) observaram que em alta disponibilidade de P a severidade da toxidade de Mn é atenuada. Por outro lado, diminuição da concentração de Mn em tecidos de soja na presença de fungos MA foi obtida por Cardoso (1985, 1994, 1986). Pacovsky & Fuller (1988), Nogueira & Cardoso (2000), observaram, além de diminuições nos teores de Mn, também diminuições nos teores de ferro.

5.6 Conclusões

O maior desenvolvimento da parte aérea, raiz e massa da matéria seca total ocorreu em plantas inoculadas com *Gigaspora rosea*. A maior taxa de colonização radicular foi obtida nas plantas de araucária inoculadas com a mistura de fungos MA. O número de esporos recuperados no substrato foi maior no tratamento com *Gigaspora rosea*. A presença dos fungos MA foi eficiente no desenvolvimento das plantas, principalmente as colonizadas por *Gigaspora rosea* no nível de 20 g P/ kg⁻¹ e a mistura de FMA. *Glomus intraradices* não se mostrou um fungo eficiente para o desenvolvimento de plantas de araucária, pois somente propiciou maior crescimento das plantas em relação ao controle nos níveis mais elevados de P, mas não diferiu do tratamento com *Gigaspora rosea* e mistura de fungos MA nos mesmos níveis de P.

5 Identificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e determinação em raízes de *Araucaria angustifolia*, utilizando “primers” específicos para PCR.

5.1 Resumo

A utilização da PCR (*Polimerase chain reaction*) com *primers* que flanqueiam a região genômica do ITS (*Internal transcribed spacer*) tem permitido a identificação taxonômica de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) a partir de esporos e, mesmo no interior das raízes. Extraíu-se DNA de esporos coletados na rizosfera de plantas de *Araucaria angustifolia* e fez-se a PCR com *primers* que flanqueiam as regiões ITS e 18S, comparando-se os perfis das bandas obtidas. Raízes de *A. angustifolia* colonizadas e não colonizadas por *Gigaspora rosea* foram submetidas à extração de DNA, seguindo-se de amplificações da região ITS por PCR e, posteriormente, utilizaram-se *primers* específicos para *G. rosea* (GIR1- GIR2). Através da verificação em gel de agarose constatou-se a presença de *G. rosea* colonizando estas raízes, e, como era previsto, o DNA proveniente de raízes não colonizadas não mostrou a presença das bandas características. Concluiu-se que a utilização de *primers* específicos (GIR1-GIR2) possibilitou a identificação do fungo MA, a nível de espécie, em plantas de *Araucaria angustifolia* e obteve-se a evidência definitiva de que *G. rosea* de fato coloniza as raízes de araucária.

5.2 Summary: Identification of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) spores and the detection of AMF species in *Araucaria angustifolia* roots through PCR

The use of the PCR technique with primers specific to the genomic ITS (*Internal transcribed spacer*) region has allowed the taxonomic identification of AMF spores as well as of fungi obtained from the cortex of the roots. Genomic DNA was extracted from spores collected from the rhizosphere of *A. angustifolia* followed by PCR reactions using ITS and 18S primers. Further analysis allowed comparing the DNA banding profile of the tested spores. Likewise, genomic DNA was extracted from roots of *A. angustifolia* colonized and non-colonized by *Gigaspora rosea* with subsequent PCR reactions using the ITS/18S set of primers and the GIR1-GIR2 set of primers specific for *Gi. rosea*. The DNA banding profile revealed that *Gi. rosea* was colonizing the roots, while DNA from non-colonized roots showed no bands. Therefore, the set of primers GIR1-GIR2 was specific enough to identify this specie of AMF after colonizing the roots of *A. angustifolia*.

5.3 Introdução

Estima-se que 90% das espécies de plantas terrestres pertencem a famílias que se beneficiam por associações micorrízicas (Trappe, 1987). Associações micorrízicas arbusculares são verificadas nos mais diversos habitats terrestres (Saif, 1986) e solos (Gerdemann, 1975; Sparling & Tinker, 1979). São caracterizadas pela formação intraradicular de arbúsculos e/ou vesículas e, este tipo de associação resulta da colonização de raízes finas por fungos Glomales. O fungo invade o córtex radicular primário, após a

fixação do apressório nas células epidérmicas das raízes do hospedeiro (Giovannetti & Citernesi, 1993). Raízes micorrizadas não podem ser distinguidas das não micorrizadas em observações macroscópicas.

Estas associações predominam e beneficiam as plantas em solos de baixa fertilidade em fósforo (Cardoso, 1995) e nitrogênio (Hayman, 1971) e, em níveis altos desses nutrientes pode ser reduzida a colonização radicular por fungos MA. Normalmente plantas micorrizadas são mais resistentes a estresses bióticos e abióticos (Cardoso, 1994; Schenck, 1981).

Através de estudos em bases moleculares, verificou-se que os fungos MA tiveram origem há 460 milhões de anos, coincidindo com as plantas terrestres e sendo apontados como fundamentais para a ocupação do ambiente terrestre pelas plantas (Simon et al., 1993). São conhecidas hoje cerca de 150 espécies de fungos MA, distribuídos em todos ecossistemas terrestres (Morton et al., 1995). Atualmente, a identificação é baseada nas características morfológicas e estruturais dos esporos mas, muitas vezes, estas características podem ser influenciadas por condições ambientais ou mesmo por diferentes fases de maturidade dos esporos (Morton et al., 1994).

O desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular tem possibilitado estudos taxonômicos de fungos MA, através da comparação de seu DNA genômico. O recente desenvolvimento da técnica de amplificação do DNA por PCR proporcionou maior número de trabalhos e diminuiu a quantidade de DNA necessária para estudos genéticos, permitindo que organismos de difícil multiplicação e obtenção de DNA, como os fungos MA, pudessem ser estudados (White et al., 1990). A técnica de PCR tem sido

utilizada em diversos estudos de identificação destes fungos no solo (Henrion et al., 1992; Simon et al., 1992; Wyss & Bonfante, 1993; Lanfranco et al., 1996) e mesmo em simbiose, colonizando as raízes (Simon et al., 1993; Lanfranco et al., 1998; Lanfranco et al., 1999).

Através da análise mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*), seja de regiões codificadas (subunidades 18S, 5.8S e 25S), que são altamente conservadas, ou da região espacial ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Intergenic Spacer*), onde é maior o polimorfismo, pode-se obter importantes resultados.

Ainda, através da análise filogenética baseada na sequência da subunidade 18S do rDNA tem sido confirmada a validade do reagrupamento procedente do FMA identificado, de acordo com critérios morfológicos (Simon et al. 1993, Simon, 1996).

Têm sido identificados molecularmente diversos isolados de vários gêneros (Bago et al. 1998) e espécies (van Tuinen et al. 1998). Tem sido indagada também a composição da diversidade de espécies de fungos MA na rizosfera, em comunidades naturais, estudando a região 18S rDNA específico a nível de gênero (Clapp et al. 1995).

Neste trabalho, com base no rDNA e sequência ITS, foram construídos *primers* específicos para *Gigaspora rosea* para posterior identificação deste fungo MA, colonizando raízes de *A. angustifolia*. Os *primers* foram primeiramente testados com DNA extraído de várias raízes colonizadas e não colonizadas por *Gi. rosea* e *Gi margarita*. A eficiência dos *primers* foi verificada em raízes micorrizadas, diretamente após ampliações em experimentos de PCR.

5.4 Material e Métodos

Material Biológico

Foram utilizados esporos de isolados conhecidos como *Gigaspora margarita* (MM1), provenientes da coleção do laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP. Estes esporos foram multiplicados em vasos e a planta hospedeira foi *Araucaria angustifolia*.

Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963) e centrifugados em água a 3000 rpm por 3 minutos e em sacarose 70% a 1800 rpm por 3 minutos. Após a extração os esporos foram lavados com água destilada estéril e então submetidos ao ultra-som por 20 segundos, para eliminar esporos velhos e também partículas de solo e microrganismos contaminantes, aderidos à superfície dos esporos. Foram recolhidos em média 50 esporos e estes foram colocados em frascos eppendorf estéreis e lavados com água destilada e esterilizada por diversas vezes. A superfície dos esporos foi esterilizada com uma solução contendo 3% de cloramina T e 0,03% de estreptomicina, por 15 minutos. Depois os esporos foram novamente lavados e sonicados, fazendo-se, por último, outra lavagem. Os esporos foram selecionados de acordo com critérios como cor, tamanho, forma, conteúdo visível e forma de hifa de sustentação, de modo que aqueles de aparência similar formassem um grupo. Observações sobre morfologia externa foram feitas em microscópio (aumento de 400X) com luz refletida.

As raízes micorrizadas foram recolhidas de vasos de *A. angustifolia* inoculadas com *Gigaspora margarita* (MM1) e não micorrizada, de vasos sem inóculo. Estas raízes,

após a coleta, foram levadas a um liofilizador por 48 horas, a fim de que fosse eliminada toda água. Em seguida, foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C.

Identificação Morfológica

Trabalhou-se com 4 isolados de fungos MA, sendo eles: *Gigaspora margarita* MM1, *Gigaspora margarita* BEG34, *Gigaspora rosea* DAOM 194757 e *Gigaspora rosea* INVAM 185. Prepararam-se lâminas com esporos destes isolados, que foram fixados em PVLG e fotografados nos aumentos: 100X, 400X, 630X e 1000X. Os esporos MM1 foram comparadas com isolados de *Gi. margarita* (BEG 34). Posteriormente foram comparados com isolados de *Gigaspora rosea* DAOM 194757 e INVAM 185.

Presença de endossimbiontes

Com o emprego de técnica de microscopia óptica e de microscopia confocal, mediante coloração com LIVE/DEAD BacLight™ Bacteria Viability Kit, o isolado fúngico pode ser avaliado. Este kit permite a visualização de eventuais bactérias contaminantes da superfície do esporo e também presença dos endossimbiontes, que vivem no interior dos esporos.

Extração do DNA de esporos e raízes

Foram separados 40 esporos esterilizados de *Gigaspora margarita* (MM1) e feita a extração rápida de DNA. Os esporos foram quebrados com auxílio de um pistilo em 5 µl de solução tampão e foram incubados a 95°C por 15 minutos. Depois o extrato cru foi centrifugado por 5 min a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi conservado a -20°C. O DNA das raízes foi extraído a partir de uma pequena alíquota de raízes de *Araucaria angustifolia*, colonizadas ou não colonizadas pelo fungo

MA *Gi. margarita* (MM1). O protocolo utilizado foi de CTAB (Henrion et al., 1994), com algumas modificações. O material foi imediatamente utilizado ou então armazenado a -20°C. Para a reação PCR foram feitas séries de diluições do DNA extraído em água, com concentrações de 1:10 e 1:100 (vol:vol) e também utilizado DNA sem diluição.

Amplificações de PCR

O DNA extraído do esporo foi amplificado com duas cópias de oligonucleotídeos universais para o gene ribossomal fúngico: os oligonucleotídeos NS1-NS2 (White et al., 1990) para a região 18S e os oligonucleotídeos ITS1-ITS4 (White et al., 1990) para a região ITS, cuja a sequência foi a seguinte:

NS1: 5' – GTAGTCATATGCTTGTCTC -3'

NS2: 5' –GGCTGCTGGCACCAGACTTGC -3'

ITS1: 5' –TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

A reação foi feita em 30 µl de volume final, contendo 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM de algum desoxiribonucleotídeo, 2 µl de DNA genômico e 2 unidades de *Taq* DNA polimerase. Para evitar a evaporação, foi adicionada uma gota de óleo mineral estéril como cobertura. O programa de amplificação utilizado foi: 3 min a 95°C (1 ciclo); 45 sec a 92°C; 45 sec a 50°C, 45 sec a 72°C (40 ciclos); 5 min a 30°C (1 ciclo); foi utilizado a aparelho Hybaid Omnigene Celbio. Em todos os experimentos foram utilizados

tratamentos de controle negativo, onde nenhum DNA foi colocado e também um controle positivo utilizando um DNA de *Tuber* sp. Todos os materiais utilizados na composição das soluções e no manuseio dos esporos e raízes foram esterilizados.

Os produtos obtidos foram verificados em gel de agarose 1.2%. Os fragmentos de DNA resultantes foram visualizados através de coloração de brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V. Os produtos PCR foram purificados, utilizando o Kit QIAEX II (Qiagen Promega).

Para o DNA de plantas, a reação da PCR foi igual a anterior, utilizando-se *primers* universais ITS e *primers* específicos para *Gi. margarita* (GIM1- GIM2 (Lanfranco et al., 1999) e para *Gi. rosea* (GIR1-GIR2). O rDNA da região ITS foi amplificado utilizando o mesmo aparelho que foi utilizado para o DNA fúngico e o mesmo programa de amplificação. Para os *primers* específicos foi utilizado o seguinte programa: 45°C por 5 min (1 ciclo) 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos (40 ciclos) e 72°C por 5 minutos (1 ciclo). Sempre foram utilizados tratamentos controle, nos quais nenhum DNA foi colocado e também um controle positivo. Todos materiais utilizados foram esterilizados. Os produtos obtidos também foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e os fragmentos de DNA resultantes foram visualizados através da coloração com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

Clonagem e Sequenciamento

Foi feita a clonagem no plasmídeo pGEM-T e, para tanto, uma mistura de cada DNA amplificado (relativo a 10 reações de PCR) foi concentrada mediante a

precipitação com acetato de sódio e etanol e, sucessivamente, foi purificada em gel de agarose, utilizando o kit QIAEX II (Qiagen, Promega).

A reação de ligase foi efetuada num volume final de 10 µl de conteúdo de 50 ng de vetor, 20-30 ng de inserto, 30mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10mM DTT, 10 mM ATP e uma unidade de T4 DNA ligase (Promega), mantida a 4°C por uma noite. Esta reação foi utilizada para transformar uma célula competente XL2 Blue (Stratagene), seguindo o protocolo.

A célula foi plaqueada no meio LB esterilizado e autoclavado e adicionaram-se 100 µg/ml de ampicilina, 4 µM IPTG (isoprolito-B-D-galatoside) e 40 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D galactosideo). As bactérias que continham o plasmídeo em seu interior clonaram o inserto e crescerem em meio LB líquido por uma noite a 37°C e depois foi feita a extração do plasmídeo, utilizando um Kit (Plasmid Concert). O material obtido foi enviado para sequenciar, utilizando os *primers* universais (Sp6 e T7) de plasmídeo.

Análise da Sequência

A sequência do DNA foi analisada com PC/Gene package (IntelliGenetics, Inc. Mountain View, CA). As sequências foram alinhadas mediante o emprego do programa de alinhamento múltiplo CLUSTAL (Higgins & Sharpa, 1988) e posteriormente foi feita a homologia, manualmente, com os sítios de nucleotídeos.

O alinhamento foi utilizado para os cálculos com o programa DNADIST, uma matriz de distância genética foi utilizada para cada cópia de taxa com o método de

Kimura que opera assumindo uma probabilidade diferente de substituição nucleotídica entre transição e transversão. A matriz de distância permite obter um fenograma mediante o emprego de Neighbor-Joining. DNADIST e Neighbor fazem parte do programa PHYLIP (Felsenstein, 1993).

5.5 Resultados e Discussão

Os esporos de *Gigaspora margarita* (MM1) foram primeiramente identificados morfológicamente e depois foram comparados com o isolado BEG 34 de *Gigaspora margarita*. Observaram-se diferenças em relação ao tamanho, cor e número de paredes dos esporos. Então, comparou-se a *Gigaspora* MM1 com esporos de *Gigaspora rosea* DOAM 194757 e INVAM 185. Com estes dois isolados de *Gi. rosea* observou-se muita similaridade e concluiu-se serem idênticos.

Figura 1. A) aspecto geral de esporo de *Gi. rosea* (MM1), fixado em lâmina com PVLG; B) parede de esporo de *Gi. rosea* (MM1) em PVLG; C) aspecto geral de esporo de *Gi. rosea* (DAOM), fixado em lâmina com PVLG; D) parede de esporo de *Gi. rosea* (DAOM) em PVLG; E)) aspecto geral de esporo de *Gi. rosea* (INVAM 185) fixado em lâmina com PVLG; F) parede de esporo de *Gi. rosea* (INVAM 185) em PVLG.

Figura 2. A) Aspecto geral de espora de *Gi. margarita* (BEG 34) fixado em lâmina com PVLG; B) parede de espora de *Gi. margarita* (BEG 34) em PVLG.

Endossimbiontes

Avaliou-se, nos esporos de *Gigaspora* MM1, se havia ou não a presença de endobactérias, no seu interior ou exterior, conforme descrito em Materiais e Métodos. Sabe-se que, até o momento, todos os isolados de *Gi. margarita*, estudados por Bianciotto et al. (1996) e de proveniências diversas, confirmaram a presença de endossimbiontes. Todavia, em esporos de *Gigaspora* MM1 não foi constatada a presença de nenhum endossimbionte (figura 3). Constatou-se que a técnica de esterilização superficial foi muito eficiente, pois não se encontrou nenhum organismo na parte exterior do espora.

Figura 3. A) Citoplasma de um esporo de *Gi margarita* (BEG 34) com presença de endobactérias (seta); n=núcleo; B) Citoplasma de um esporo de *Gi rosea* (MM1) sem presença de endobactérias. Foto de Bianciotto et al. (2000).

Amplificações de DNA fúngico

Após a extração do DNA genômico de esporos de *Gigaspora* MM1, este DNA foi amplificado em reação de PCR com *primers* universais da região 18S e ITS do rDNA fúngico (figura 4). Os produtos foram amplificados com cerca de 550 pares de bases e não foi observada nenhuma amplificação que formasse bandas duplas ou bandas com tamanhos diferentes, o que confirma que este DNA estava puro e com as regiões 18S e ITS altamente conservadas.

Figura 4. Amplificação em PCR com *primers* universais para a região 18S rDNA (NS1 – NS2) linha 1) sem DNA (controle negativo); linha 2) DNA de *Tuber* (controle positivo); linha 3) DNA de esporo *Gi rosea* (MM1); linha 4) Marcador PUC 18 com Hae III. E para ITS (ITS1 – ITS2), linha 5) sem DNA, controle negativo; linha 6) controle positivo DNA de *Tuber*; linha 7) DNA de esporo de *Gi. rosea* (MM1).

Sequenciamento

O DNA fúngico foi clonado no plasmídeo e dois a três clones recombinados de um mesmo isolado foram enviados para sequenciar. Comparando-se estas sequências com dados do GenBank, pôde-se verificar a homologia entre as sequências, o que resultou em 97% de homologia com dados de *Gigaspora rosea*. Verificou-se, também, que existe uma pequena diferença num mesmo isolado. Estes resultados de pequenas diferenças na sequência ITS não são surpreendentes pois, mesmo no interior de um único esporo estas já foram descritas na literatura para *Glomus* (Sanders et al., 1995; Lloyd-MacGilp et al., 1996) e para *Gigaspora margarita* BEG 34 (Lanfranco et al., 1999).

Os resultados dessas análises morfológica e molecular permitiram redefinir este isolado fúngico, reclassificando o isolado brasileiro (MM1), supostamente uma *Gigaspora margarita*, como *Gi. rosea*. De acordo com informações do INVAM, estes dois isolados são frequentemente confundidos e, com emprego de técnicas de biologia molecular, este problema pode ser resolvido.

Conhecendo-se todas as sequências, foi desenhado um *primer* específico (dados não apresentados) para esta espécie que, posteriormente, seria utilizado nas raízes para verificar a presença deste fungo.

DNA de fungos MA em raízes

Os *primers* utilizados resultaram em amplificações bem sucedidas, tanto para a região 18S como para ITS. Não houve diferença no tamanho dos fragmentos produzidos e não apareceu nenhuma banda dupla, o que confirma que somente o DNA do fungo foi amplificado e não houve amplificação de DNA originário de contaminante. Em caso de contaminações, visualizam-se fragmentos de ITS de tamanhos diferentes dos observados para fungos MA. Nesse caso, podemos dizer que o método de desinfestação dos esporos foi eficiente e não apresentou nenhuma inibição da reação de PCR. A utilização de soluções esterilizantes como a cloramina-T e estreptomicina já tinha sido relatada como satisfatória para a reação de PCR (Sanders et al., 1995).

Quando se empregaram os *primers* ITS houve amplificação no material proveniente de raízes colonizadas, o que não ocorreu nas raízes não colonizadas. Os produtos da PCR de DNA de raízes colonizadas apresentaram peso molecular em torno de 550 pares de bases (bp). Testes de diluições com extratos crus, obtidos de raízes de

araucária colonizadas e não colonizadas por fungos MA mostraram que, para os extratos obtidos nas condições do experimento, as diluições de 1:10 e 1:100 (v:v) foram melhores para se obter produtos de amplificação de PCR, utilizando *primers* específicos, com boa frequência de amplificações positivas.

Pela análise de amplificação de fragmentos de restrição de ITS pela PCR foi possível detectar que realmente as raízes estavam sendo colonizadas por este fungo MA. Amplificações da região ITS são também obtidas em plantas micorrizadas com ectomicorrizas (Mello et al., 1996).

Figura 5. Produto PCR, utilizando *primers* GIM1 e GIM2, com DNA genômico extraído de diversos isolados: linha 1) sem DNA; linha 2) DNA de esporo de *Gi margarita* (BEG 34); linha 3) DNA de raiz colonizada com *Gi margarita* (BEG 34), linha 4) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) sem diluição; linha 5) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/10; linha 6) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/100; linha 7) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) sem diluição; linha 8) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/10 ; linha 9) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/100; linha 10) DNA de esporo de *Gi rosea* (MM1); linha 11) marcador PUC 18 com Hae III.

Primeiramente, utilizaram-se *primers* específicos para *Gigaspora margarita* (GIM1-GIM2) (Lanfranco et al., 1999) e como testemunha positiva foram utilizados DNA fúngico e raízes de trifólio colonizadas com *Gi. margarita* (BEG 34), além de duas amostras de raízes de araucária colonizadas com *Gi. rosea* (figura 5). Nestas duas amostras trabalhou-se com duas diluições (1:10 e 1:100) e DNA sem diluição. Somente amplificaram os controle positivo (DNA fúngico de *Gi. margarita* BEG 34) e a raiz colonizada por *Gi. margarita*; as demais não amplificaram, mostrando a especificidade destes *primers*. Diante deste resultado, podemos afirmar que é possível identificar a espécie que está realmente em simbiose com a raiz.

Figura 6. Produto PCR, utilizando *primers* GIR1 e GIR2, com DNA genômico extraído de diversos isolados: linha 1) marcador PUC 18 com Hae III; linha 2) sem DNA; linha 3) DNA de esporo de *Gi rosea* (MM1); linha 4) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) sem diluição; linha 5) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/10; linha 6) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/100; linha 7) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) sem diluição; linha 8) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/10; linha 9) DNA de raiz colonizada com *Gi rosea* (MM1) com diluição 1/100; linha 10) DNA de esporo de *Gi margarita* (BEG 34); linha 11) marcador PUC 18 com Hae III.

Após a comprovação de que os *primers* para *Gi. margarita* (GIM1-GIM2), não amplificam para outras espécies de *Gigaspora*, foram desenhados *primers* específicos para *Gi. rosea* (GIR1-GIR2), e foram utilizados para amplificações de PCR o DNA fúngico de *Gi. rosea* e raízes de araucária colonizadas por este fungo. Como testemunha negativa foi utilizado DNA fúngico de *Gi. margarita* BEG 34. Obteve-se sucesso nas amplificações em todas as raízes colonizadas e também o DNA fúngico de *G. rosea*, sendo que, as diluições apresentaram bandas mais visíveis. No entanto, a testemunha negativa (DNA fúngico de *Gi. margarita*) não apresentou bandas, como era previsto.

5.6 Conclusões

Conclui-se que a análise das sequências de DNA representa um instrumento importante no estudo taxonômico dos fungos MA. Análises comparativas das sequências permitem a identificação clara do taxon intragênico (a nível de espécie). A utilização de *primers* específicos (GIR1-GIR2) possibilitou a identificação do endófito, a nível de espécie, em raízes de *A. angustifolia*.

6 GERMINAÇÃO PRECOCE DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE

6.1 Resumo

O presente trabalho foi realizado em casa-de-vegetação do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ – USP. O objetivo foi avaliar se sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. escarificadas (com as pontas das sementes cortadas antes do plantio) apresentam maior porcentagem e ou precocidade de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos: 1) sementes escarificadas, e 2) sementes inteiras, com cem sementes em cada tratamento. O experimento foi realizado no ano de 1998 e repetido em 1999, empregando-se sementes recém colhidas. Sementes escarificadas germinaram significativamente mais rapidamente do que as outras em ambos os experimentos. Também se verificou que as plantas provenientes de sementes escarificadas tiveram seu desenvolvimento mais uniforme e não apresentavam contaminações por fungos.

6.2 Summary: Scarification of seeds of *Araucaria Angustifolia* (Bert.) O. Ktze

The present study was undertaken at the greenhouse of the Department of Soils and Plant Nutrition, at ESALQ/USP, to evaluate if the scarification of *Araucaria angustifolia* seeds (accomplished by cutting about 2 mm of the end of seeds before sowing) would provide greater percent germination or abbreviate the germination period. The experimental design was randomized with 100 scarified and 100 non-scarified seeds. The experiment was installed twice, in 1998 and 1999, with fresh seeds. Scarified seeds

germinated significantly more rapidly and their seedlings were more uniform in size, without fungal contaminations, that were common in seedlings from the control treatment.

6.2 Introdução

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze., também conhecida como pinheiro-brasileiro e pinheiro-do-Paraná, é uma espécie nativa que possui alto valor econômico, devido à alta qualidade de sua madeira e, por isto, encontra-se ameaçada de extinção (Brasil, 1992).

É uma espécie característica da floresta subtropical e, no Brasil, encontra-se principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Hueck, 1972). No Rio de Janeiro e Minas Gerais há ocorrências isoladas.

Informações sobre um método adequado de escarificação para a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* são escassas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a precocidade e homogeneidade na germinação da *A. angustifolia* através da escarificação mecânica.

Este simples método de escarificar as sementes pode ser útil para produtores de mudas ou viveiristas pois, além de diminuir o tempo de germinação, poderá fornecer mudas mais uniformes, o que é desejável para o reflorestamento, impedindo a sua colonização por fungos saprófitas ou oportunistas.

6.3 Revisão Bibliográfica

Um dos fatores que contribuem para a vulnerabilidade desta espécie é a dificuldade de germinação das sementes, que são recalcitrantes e possuem alto grau de umidade logo após a maturação, além de que perdem a viabilidade ao serem desidratadas a níveis ainda relativamente altos, entre 12 e 35% (Roberts, 1973). Sabe-se que a perda de viabilidade dessas sementes ocorre em poucos meses (Prange, 1963; Aquila & Ferreira, 1984; Eira et al. 1984) e que o uso em reflorestamento deve ser feito em até 45 dias (Vernalha et al., 1972). Ainda, sua regeneração natural pode ser comprometida por predações de avifauna, roedores e primatas (Lorenzi, 1992).

Diversos métodos de escarificação de sementes são utilizados para se obter uma germinação uniforme e precoce. Destacam-se a escarificação química e mecânica. Existem estudos sobre a germinação de espécies florestais e estes mostram que a escarificação incrementa a porcentagem de germinação em todas as espécies estudadas (Acuña & Garwood, 1987).

6.4 Material e Métodos

Material vegetal

As sementes utilizadas neste experimento foram coletadas em abril de 1998 e em abril de 1999 no Parque Estadual de Campos do Jordão, no Estado de São Paulo. Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ-USP, em Piracicaba, SP.

As sementes foram separadas por tamanho e uniformidade e tratadas com

hipoclorito de sódio a 2%, por 30 minutos; em seguida, foram lavadas com água destilada. Imediatamente após o processo de escarificação, foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia de rio lavada e esterilizada por autoclavagem.

Tratamentos de germinação

Tanto em 1998 como em 1999, 200 sementes foram divididas em dois lotes (A e B), cada um contendo 100 sementes. As do lote A foram escarificadas, ou seja, cortou-se apenas uma pequena parte da ponta do tegumento com o auxílio de estilete, mas não se tocou no endosperma (Figura 1). No lote B, as sementes permaneceram intactas.

Figura 1. Esquema da escarificação mecânica feita nas sementes de *Araucaria angustifolia*.

Os pinhões foram colocados para germinar na posição horizontal e cobertos com cerca

de 1 cm de areia, dentro de caixas plásticas contendo areia de rio autoclavada (121°C por 4 horas). Após o plantio, os dois lotes receberam regas periódicas até 2 meses após a instalação do experimento, avaliando-se quinzenalmente quantas sementes haviam germinado.

6.5 Resultados e Discussão

No primeiro ano, verificou-se que no lote em que foi feita a escarificação de *A. angustifolia*, houve 92% de germinação, com desenvolvimento uniforme das plântulas. No lote B, onde as sementes permaneceram intactas, a germinação foi de apenas 60% neste período e partes das plântulas apresentavam-se contaminadas por fungos.

No ano de 1999, o lote A começou a germinar 5 dias após a implantação do experimento, enquanto no lote B as sementes inteiras demoraram mais. começando a germinação somente 13 dias após a sementeira. Ao final de 60 dias, verificou-se que 95 sementes escarificadas germinaram, enquanto das inteiras apenas 64 (Figura 2). Novamente as plântulas provenientes de sementes escarificadas apresentavam-se mais uniformes.

Figura 2. Sementes de *Araucaria angustifolia* nos diferentes períodos de avaliação até 60 dias após o plantio. □ Sementes escarificadas, O sementes intactas. Os tratamentos diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste *t*.

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com *A. angustifolia* (Eira et al. 1991; Aquila et al. 1984; Doni Filho et al., 1985; Ramos & Bianchetti, 1990), conduzidos em solos de mata e de campo, para testar a viabilidade da semente e o teor de água sobre a germinação através de diferentes tipos de cortes, inclusive cortes transversais e longitudinais. Todos os métodos de escarificação utilizados pelos diversos autores foram diferentes do presente trabalho. Também Ferreira (1977), utilizando papel como substrato, e Cardemil & Reinerio (1982), utilizando

vermiculita para *Araucaria araucana*, relataram o favorecimento da germinação induzida pela escarificação ou pelo teor de água presente nas sementes. Verificou-se que todos estes estudos foram conduzidos de forma diferente do presente trabalho, pois induziram a germinação através de escarificações muito mais complexas ou até mesmo a retirada total do tegumento. Esses procedimentos são muito trabalhosos e poderiam até inviabilizar a produção de grande quantidade de mudas, conforme são usuais no trabalho de viveiros para reflorestamento. Neste presente trabalho, o objetivo foi atingido, pois trata-se apenas de um pequeno corte na ponta da semente (Figura 1) que resulta na precocidade da germinação das sementes de araucária. O fato das sementes intactas obterem menor taxa de germinação pode ser explicado pelo impedimento mecânico que os envoltórios exercem sobre a expansão da semente, dificultando a embebição (Ferreira & Handro, 1979), ou pelo fato do tegumento restringir a troca de água com o ambiente (Cunha et al., 1991). Doni Filho (1985) mostrou que sementes inteiras demoram mais para germinar, afirmando que o epicótilo só se desenvolve quando está totalmente livre do endosperma, ou seja, os cotilédones já se dilataram suficientemente, ao ponto de o eixo embrionário ficar inteiramente externo à semente.

6.6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as sementes escarificadas, ou seja, cortadas nas pontas, apresentam maior potencial de germinação, maior precocidade de germinação e produzem plântulas mais uniformes. A germinação das sementes inteiras é mais lenta e resulta em perdas de plântulas, que estão mais sujeitas à contaminação por fungos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- *A. angustifolia* é colonizada por fungos micorrízicos arbusculares e a colonização é maior em plantas da mata do que no reflorestamento.
- O número de esporos encontrados na rizosfera é elevado, em média 700 esporos/100 ml solo.
- Foram encontradas 22 espécies de FMA e mais 3 espécies, provavelmente novas e ainda não descritas, na rizosfera de *A. angustifolia*.
- Nos vasos de multiplicação de FMA, com sorgo, várias espécies do campo não esporularam. Algumas entretanto, tiveram sua multiplicação favorecida, como *Glomus diaphanum* e *Acaulospora foveata*.
- O maior desenvolvimento da parte aérea, raiz e massa da matéria seca total ocorreu nas plantas inoculadas com *Gigaspora rosea*, no nível de 20 mg/kg⁻¹ de P.
- A maior taxa de colonização radicular foi observada em plantas de araucária inoculadas com a mistura de FMA nativos e *Gigaspora rosea*, diferindo de *Glomus intraradices*, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *t*.
- O número de esporos de *Gigaspora rosea* multiplicados em plantas de araucária foi maior do que os outros fungos.
- A presença dos FMAs foi eficiente na promoção do desenvolvimento das plantas, principalmente daquelas colonizadas por *Gigaspora rosea* e pela mistura de FMA, apresentando grandes diferenças quando comparado com o das plantas não inoculadas.

- *Glomus intraradices* não foi um fungo eficiente para o desenvolvimento de plantas de araucária, pois somente causou efeitos promotores de desenvolvimento nos níveis mais elevados de P.
- Análises comparativas das seqüências de DNA de esporo de fungo MA permitem a elaboração da árvore filogenética e identificação clara do taxon intragênico (a nível de espécie).
- A utilização de *primers* específicos (GIR1-GIR2) possibilitou a do FMA a nível de espécie dentro de plantas de *A. angustifolia*.
- Sementes escarificadas, ou seja, cortadas nas pontas, apresentam maior potencial de germinação, maior precocidade e maior uniformidade das plântulas, além de evitar a contaminação por fungos do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.33, p.389-408, 1982.
- ACUÑA, P.I.; GARWOOD, N. Efecto de la luz y de la escarificación en la germinación de las semillas de cinco especies de árboles tropicales secundarios. **Revista de Biología Topical**, v.3,n.2, p. 203-207, 1987.
- ALLEN, E.B., ALLEN, M.F., HELM, D.J., TRAPPE, J.M., MOLINA, J.M.; RINCONI, E. Patterns and regulation of mycorrhizae plant and fungal diversity. **Plant and Soil**. v.170, p.47-62, 1995.
- ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F. Natural re-establishment of vesicular arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in wyoming. **Journal of Applied Ecology** , v. 17, p.139-147, 1980.
- ANTUNES, V. Crescimento do limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* Osbeck) sob influência da inoculação com fungo micorrízico vesículo-arbusculares e da aplicação de fósforo. Piracicaba, 1987. 99p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**. v.131, p.11-19, 1991.
- ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P; CARDOSO, E.J.B.N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café. **Turrialba**, v.38, p.117-122, 1988.
- AQUILA, M.E.A.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. **Ciência e Cultura**, v.36. n.9, p.1583-1589, 1984.

- AZCÓN-AGUILAR C.; BAREA J.M. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. In: ALLEN, M.F. (Ed.) **Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process**. New York : Chapman & Hall, , p.163-198, 1992.
- BAGO, B.; BENTIVEGA; S.P.; BRENAC; V.; DODD; J.C.; PICHÈ; Y.; SIMON, L. Molecular analysis of *Gigaspora* (*Glomales*, *Gigasporaceae*). **New Phytology**, v.39, p.581- 588, 1998.
- BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhiza and crops. **Advances in Plant Pathology**, v.9, p.167-189, 1993.
- BAYLIS, G.T.S. Synthesis of mycorrhizas and Agathis with endogone spores. **Nature**, v.221, p.1267-1268, 1969.
- BAYLIS, G.T.S.; McNABB, R.F.R.; MORRISON, T.M. The mycorrhizal nodules of podocarps. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.378-384, 1963.
- BÈCARD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T₁ DNA transformed roots. **New Phytology**, v.108, p.211-218, 1988.
- BECKING, J.H. Der Anbau von *Pinus merkusii* in den Tropen. **Schweiz. Z. Forstw.** v.101, p.181-191, 1950.
- BETHLENFALVAY, G.J.; AMES, R.N. Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science Society of America Journal**, v.51, p.834-837, 1987.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BAYNE, H. G.; PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: the effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. **Physiologia Plantarum**. v.57, p.543-548, 1983.

- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. Measurement of mycorrhizal infection in soybean. **Soil Science Society of America Journal**. v.45, p.871-875, 1981.
- BIANCIOOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H.V.; BONFANTE, P. An obligated endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. **Applied Enviroment Microbiology**, v. 62, p.3005-3010, 1996.
- BIANCIOOTTO, V.; BONFANTE, P. Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycology Research**, v.96, n.12, p.1071–1076, 1992.
- BOLLON, A.P. Organization of fungal ribosomal rna genes. In: **The cell nucleus**. BRUSCH, H.; ROTHBLUM, L. (Ed.) New York: Academic Press, 1982, p.67-125.
- BONFANTE, P.; VIAN, B. Wall texture in the spore of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **Protoplasma**, v.120, p.51-60, 1984.
- BONFANTE, P.; SCANNERINI, S. Cytological observations on the mycorrhiza *Endogone flammicorona-Pinus strobus*. **Allionia**, v.22, p.23-24, 1977.
- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.) **VA mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984, p.5-53, 1984.
- BONONI, V.L.R., GRANDI, R.A.P., LOPES, S.A.R., RODRIGUES, E.; FONSECA, M.P. Micorrizas vesículo-arbusculares em *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Ktze. IN: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3. Piracicaba. 1989. **Programa e Resumos**, p.42,
- BOWEN, G.D. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: NIKOLA, P. (Ed.) **Tropical mycorrhiza research**. Oxford: University Press, 1980. p.165-190.

- BOWEN, G.D.; BEVEGE, D.I.; MOSSE, B. Phosphate physiology of vesicular arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F.F. **Endomycorrhizas**. London: Academic Press. p.437-446, 1975.
- BOWEN, G.D.; SKINNNER, M.F.; BEVEGE, D.I. Zinc uptake by mycorrhizal and infected roots of *Pinus radiata* and *Araucaria cunninghamii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6,n.3, p.141-144, 1974.
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. (Portaria IBAMA 06-N). **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de janeiro 1992, p.870-872.
- BRUENINGER, M.; EISING, W.; MAGEL, E.; CARDOSO, E.; HAMPP, R. Mycorrhiza of pine (*Araucaria angustifolia* (Bert. O. Ktze.)). **Plant Biology**, v.2, p.4-10, 2000.
- BRUNDRET, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Advances in Ecological Research**, v.21, p.131-171, 1991.
- 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.233-242, 1993.
- CALDEIRA, S.F. Observações sobre a associação de endomicorrizas com café, capim-gordura, limão-rosa e soja. Viçosa, 1981. 40p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa.
- CARDEMIL, L; REINERO, A. Changes of *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. **Canadian Journal Botany**, v.60, n.9, p.1629-1638, 1982.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito da micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.125-130, 1985.

- CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. (Ed.). **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1996. p.304-306.
- CARDOSO, E.J.B.N. Micorriza em soja como protetor à toxidez de manganês. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13, Águas de Lindóia, 1996. **Programa e Resumos**, p.6.
- CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.25-30, 1986.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., (Ed.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.42-57.
- CARVALHO, S.A. Métodos de aplicação do superfosfato simples e do cálcio dolomítico no limoeiro “Cravo” em sementeira. Lavras, 1987. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- CHAVES, L.F.C.; BORGES, R.C.G.; NEVES, J.C.L.; REGAZZI, A.J. Crescimento de mudas de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem.) em resposta a inoculação com fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em diferentes níveis de fósforo no solo. **Revista Árvore**, v.19, n.1, p.32-49, 1995.
- CLAPP, JP., YOUNG, J.P.W., MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytology**, v.130, p.259-265, 1995.
- COELHO, F.C., BORGES, A.C., NEVES, J.C.L., BARROS, N.F. AND MUCHOVEJ, R.M.C. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*, nos municípios de Botucatu, São José dos Campos e São Miguel Arcanjo, São Paulo. **Revista Árvore**, v.21, n.4, p.563-573, 1997.

- COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; MUCHOVEJ, R.M.C. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 21, n.3, p.393-404, 1997.
- COLOZZI-FILHO, A. Dinâmica populacional de fungos micorrízicos arbusculares no agrossistema cafeeiro e adubação verde com leguminosas. Piracicaba, 1999. 106p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- CUNHA, R.; EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A. N. Metodologia para determinação do grau de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.87, 1991.
- DONI FILHO, L.; AMARAL, L.; CERVI, P.H. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, n.2, p. 113-123, 1985.
- EIRA, M.S.T.; CUNHA, R.; SALOMÃO, A.N. Efeito do tegumento sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Informativo ABRATES**, v.1, n.4, p.77, 1991.
- EIRA, M.S.T.; SALOMÃO, A.N; CUNHA, R.; CARRARA, D.K.; MELLO, C.M.C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. – ARAUCARIACEAE. **Revista Brasileira de Sementes**, v.16, n.1, p.71-75, 1994.
- EZETA, F.N.; SANTOS, O.M. Importância da endomicorriza na nutrição mineral do cacaueiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.5, p.22-27, 1981.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Interference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington. Seattle, W.A.

- FERGUSON, J.J.; MENGE, J.A. The influence of light intensity and artificially extended photoperiod upon infection and sporulation of *Glomus fasciculatus* on Sudan grass and on root exudation of Sudan grass. **New Phytology**, v. 92, p.183-191, 1982.
- FERREIRA, A. G. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: germinação da semente e desenvolvimento da plântula. Piracicaba, 1977. 123p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, A. G.; HANDRO, W. Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.2, n.1, p.7-13, 1979.
- FONTENLA, S., GODOY, R., ROSSO, P., HAVRYLENKO, M. Root associations in *Austrocedrus* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 29-33, 1998.
- FRANKEN, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Construction of genomic phage libraries of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Scutellospora castanea* and isolation of ribosomal genes. **Mycorrhiza**, v 6. p.167-173, 1996.
- FRANKE, M.; MORTON, J. 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.71, p.122-134, 1994.
- GENRE, A.; BONFANTE, P. Actin versus tubulin configuration in arbuscular-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. **New Phytology**. v.140, p.745-752, 1998.
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, T. G.; CLARKSON, D.J. (Ed.) **Development and function of roots**. New York: Academic Press, 1975, p.575-591.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-246, 1963.

- GIOVANNETTI, M. Seasonal variation of vesicular-arbuscular mycorrhizas and endogonaceous spores in a maritime sand dune. **Transactions British Mycological Society**, v.84, p.679-684, 1985.
- GIOVANNETTI, M.; CITERNESI, A. S. Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.97, n.9, p.1140-1142, 1993.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.
- GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; CITERNESI, A. S.; AVIO, L. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.133, p.65-71, 1996.
- GODOY, R.; ROMERO, R.; CARRILLO, R. Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. **Revista Chilena Historia Natural**, v.67, p.209-220, 1994.
- GOLFARI, L. Coníferas aptas para repoblaciones florestales en el Estado de São Paulo. **Sivicultura**, v.6, p.7-62, 1967.
- GOLFARI, L. **Conifers suitable for reforestation of the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul**. Roma: FAO, 1970, 86p.
- GOMES, V.F.F. Desenvolvimento de fungos micorrízicos-arbusculares em três espécies de porta-enxertos cítricos sob níveis de fósforo. Piracicaba, 1997. 89p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GRACCIOLLI, L.A. Efeito do biofertilizante na cultura do milho (*Zea mays* L.) em latossolo vermelho-escuro, no município de Selvíria, MS. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 92p. 1992.

- GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, v.159, p.179-185, 1994.
- HAAG, P.H. Nutrição mineral de *Eucalyptus*, *Pinus*, *Araucaria* e *Gmelina* no Brasil. In: HAAG, P.H. (Ed.). Campinas: Fundação Cargill, 1983. 101p.
- HAAS, J.H.; KRIKUN, J. Efficacy of endomycorrhizal fungal isolates and inoculum quantities required for growth response. **New Phytologist**, v.100, p. 613-622, 1985.
- HARLEY, J.L. **The biology of mycorrhiza**. In: HILL, L. (Ed.), London: 1969.
- HARRISON, M.J. Molecular and celular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant and Physiology Plant Molecular Biology** v.50, p.361-89, 1999.
- HAYMAN, D.S.; MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: Growth of endogone–inoculated plants in phosphate deficient soils. **New Phytologist**, v.70, p.19-27, 1971.
- HENRION, B.; CHEVALIER, G.; F.; MARTIN, F. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. **Mycological Research**, v. 98, p.37-43, 1994.
- HENRION, B.; LE TACON, F.; MARTIN, F. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribossomal RNA genes. **New Phytologist**, v.122, p.289-298, 1992.
- HEPPER, C.M. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. growth of inoculated plants in phosphate-deficient soils. **New phytologist**, v.70, p.19-21, 1981.
- HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rizobia to recover desertified mediterrsnean ecosystems. **Applied Environment Microbiology**, v.59, p.129-133, 1993.

- HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T. Effects of mycorrhizal fungus species and metalaxil application on microbial suppression of mycorrhizal symbiosis. **Mycologia**, v.83, p.97-102, 1991.
- HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v.73, p.237-244, 1988.
- HIJRI, M.; HOSNY, D.; VAN TUINEN AND DULIEU, H. Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. **Fun. Genetic Biology**, v.26, p.141-151, 1999.
- HOSNY, M.; HIJRI, M.; PASSERIEUX, E. AND DULIEU, H. rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota). **Gene**, v.226, p.61-71, 1999.
- KLEPPE, K.E.; SATTA, Y.; OHUIGIN, C. The molecular descent of the major histocompatibility complex. **Annual Review Immunology**, v.11, p.269-295, 1993.
- HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. São Paulo: Polígono. 466p. 1972.
- JANOS, D.P. Mycorrhizas applications in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? In JANOS, D.P. (Ed.) **Trees and mycorrhiza forest**. Kuala Lumpur: Research Institute Malaysia, 1988. P.133-188.
- JANOS, D.P. Mycorrhizas, succession and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. In: FRANKLAND, J.C.; MAGAN, N.; GADD, G.M. (Ed.) **Fungi and Environmental Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. P.129-162.
- JANOS, D.P. Tropical mycorrhizae, nutrient cycles and plant growth. In: SUTTON, S.L.; WHITMORE, T.C.; CHADWICK, A.C. (Ed.) **Tropical rain forest**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.327-345, 1983.
- JANOS, D.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, v. 61, n.1, p.151-162, 1980.

- JANOS, D.P.; TRAPPE, J.M. Two new Acaulospora species from tropical America. **Mycotaxon**, v15, p.515-522, 1982.
- JASPER, D.A. Management of mycorrhizas in revegetacion. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJACZUK, N. (Ed.) **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. London: kluwer Academic Publishers, 1994. p. 211-220.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v.48, p.692, 1964.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v.48, p.692, 1964.
- KEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v.12, p.17-44. 1960.
- KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v.117, p.365-386, 1991.
- KOIDE, R.T.; LI, M. On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.114, p.59-74, 1990.
- KOIDE, R.T.; SCHREINER, R.P. Regulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p.557-581, 1992.
- KORMANIK, P.P.; BRYAN, W.C.; SCHUTZ, R.C. Influence of endomycorrhizae on growth of sweetgum seedlings from eight mother trees. **Forestry Science**. v.23, p.500-506, 1977.
- KORMANIK, P.P.; MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: SCHENCK, N.C. (Ed.) **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1982, 244p.

- LAMBAIS, M.R., CARDOSO, J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stilosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.12, p.249-255, 1988.
- LAMBERT, D.H.; BAKER, D.E.; COLE, H. Jr. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. **Soil Science Society of America Journal**, v.43, p.976-980, 1979.
- LANFRANCO, L.; GARNERO, L.; BONFANTE, P. Chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*: full sequence of a gene encoding a class IV chitin synthase. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.59-67, 1999.
- LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Application of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In: **Application of PCR in mycology** (Ed.) P.D. BRIDGE; D.K. ARORA; C.A., REDY; R.P. ELANDER. CAB International, Wallingford, 1998. p. 107-124.
- LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; LONGATO, S.; MELLO, A., COMETTI, V.; BONFANTE, P. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In: VARMA, A. (Ed.) **Manual for mycorrhizae**. Berlin: Springer Verlag, 1997, p. 353-372.
- LANFRANCO, L.; WYSS, P., MARZACHI, C.; BONFANTE, P. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Ecology**, v.4, p.61-68, 1995.
- LANFRANCO, L.; VALLINO, M.; BONFANTE, P. Expression of chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **New Phytology**, v.142, p.347-354, 1999.
- Le TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, v.3, p.179-206, 1987.

- LLOYD-MacGILP, S.A.; CHAMBRES, S.M.; DODD, J.C.; FITTER, A.H.; WALKER, C.; YOUNG, J.P.W. Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. **New Phytology**, v.133, p.103-111, 1996.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbuscular (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p.1-19, 1983.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Ed. Plantarum, 1992.
- LOUIS, I.; LIM, G. Spore density and root colonization of vesicular-arbuscular mycorrhizas in tropical soil. **Transactions British Mycological Society**, v. 88, p.207-212. 1987.
- MACHADO, S.; SIQUEIRA, J.O.P. Distribuição natural da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., Curitiba, 1979. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUDEP, p.4-9, 1980.
- MAIA, L.C.; TRUFEM, S.F.B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no estado do Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 13, p.89-95, 1990.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; KENNEY, D.S. ; MEXAL, J.D.; ARTMAN. J.D.; RIFFLE, J.W.; MOLINA, R.J. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. **Forest Science**, v.30, p.1-101, 1984.

- MELLO, T.; GARNERO, L.; BONFANTE, P. Specific PCR primers as reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. **New Phytologist**, v.141, p.515-516, 1999.
- MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.59-67, 1999.
- MENGE, J.A. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. **Canadian Journal Botany**, v.61, p.1015-1024, 1983.
- MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forest practice. In: **Ectomycorrhizal. Their ecology and physiology**. MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) New York: Academic Press. 1973, p.383-411.
- MILANEZ, F.R.; MONTEIRO NETO, H. Nota prévia sobre micorriza no pinho do Paraná. **Arquivos do Serviço Florestal**, v.4, p.87-93, 1950.
- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: MICHEL, F.A. (Ed.) **Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process**. London: 1992, p.438-467.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SCHEEHY, J.E.; MULLER, M.A. Major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. **Journal Exp. Botany**, v.34, p.641-649, 1983b.
- MORITZ, C.; HILLIS, D.M. The evolution of molecular systematics. In: **Molecular systematics**. HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.) Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts USA, 1996.
- MORTON, J.B., BENTIVENGA, S.P.; WHEELER, W.W. Germplasm in the international Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Mycotaxon**, 48: 491-528, 1993.

- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes); New order, Glomales, two new suborders, Glominae and gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.
- MORTON, J.B; BENTIVENGA, S.P; BEVER, J.D. Discovery, measurement and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). **Canadian journal of Botany**, v.73, pS25-S32, 1995.
- MOSSE, B.; STRIBLEY, D.P.; Le TACON, F. Ecology of mycorrhizal fungi. **Advances in Microbial Ecology**, v.5, p.137-210, 1981.
- MUCHOVEJ, R. M. C., ALVES, A.C., MUCHOVEJ, J. J.; KASUYA, M. C. M. Influência da inoculação com fungos ectomicorrízicos e MVA sobre o comportamento de mudas de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE . **Hoehnea**, v.19, n. 1/2, p.9-18, 1992.
- MULLIS, K.B; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Meth. Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.
- MURPHY, L.S.; ELLIS JR. R.; ADRIANO, D.C. Phosphorus-micronutrient interaction effects on crop production. **Journal of Plant Nutrition**, v.3, n.1/4, p.593-613, 1981.
- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo de fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.
- OLIVEIRA, M.; VENTURA, A. A ocorrência de micorriza em *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE e *Podocarpus lamberti*. **Serviço Florestal**. 25p., 1952.
- OLIVEIRA, O.S. Efeito da terra micorrizada sobre o desenvolvimento de mudas de *Pinus taeda* L. e *P. patula*. **Revista Floresta**. v.2, n.1, p.66-71, 1981.

- OLIVEIRA, O.S.; ANTONIOLLI, Z.I.; GIRACCA, E.M.N.; THOMAS, P.S.; PERINI, F.L. Eficiência de inóculo com micorrizas nativas em *Araucaria angustifolia*. **Agropecuária Catarinense**, v.5,n.4, p.51-52, 1992.
- OLSEN, S.R. Micronutrient interactions In: MORTVED J.J. (Ed.) **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of American, 1972. p.243-264.
- PACOVSKY, R.S. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. **Plant and Soil**, v.95, p.379-388, 1986.
- PACOVSKY, R.S.; BETHLENFALVAY, G.J.; PAUL, E.A. Comparisons between P-fertilized and mycorrhizal plants. **Crop Science**, v.26, p.151-156, 1986.
- PACOVSKY, R.S.; FULLER, G. Development of two endomycorrhizal symbioses on soybean and comparison with phosphorus fertilization. **Plant and Soil**, v.95. p.361-377, 1986.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.; GRAHAM, J.H.; KIMBERLYN, W.; HOHGE, N. C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply: analysis of carbon cost. **Plant Physiology**, v.101, p.1063-1071, 1993.
- PEROTTO, S.; ACTIS-PERINO, E.; PERUGINI, J.; BONFANTE, P. Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 123-131, 1996a.
- PERRY, D.A.; MOLINA, R.; AMARANTHUS, M.P. Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. **Canadian Journal of Forest Research**, v.8, n.17, p.929-940, 1987.
- PHILLIPS, J. Root nodules of *Podocarpus*. **Ecology**, v.13, p.189-195, 1932.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, n.1, p.158-161, 1970.
- POPE, P.E.; CHANEY, W. R.; RHODES, J.D. A mycorrhizal dependency of four hardwood tree species. **Canadian Journal of Botany**, v.412, p.412-417, 1983.

- PRANGE, P.W. Estudo de conservação do poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert). O. Ktze. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, v.16, n.16, p. 43-53, 1963.
- RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J.A. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 31p. (Boletim Técnico, 81).
- RAMOS, A.; BIANCHETTI, A. Metodologia para determinação do teor de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert). O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v.12, n.3, p.9-16, 1990.
- READ, D.J.; KOUCHEKI, H.K.; HODGSON, J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. **New Phytology**, v.77, p. 641-643, 1976.
- REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different gener of the order *Glomales*. **Applied Environment Microbiology**, v.63, p.1756-1761, 1997.
- RIFLE, J.M.; BOOSALIS, M.G. Mycorrhizal – good for our trees. **Farm. Ranch and Home Quarterly**, p.1-8, 1979.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Tecnology**, v.1, p.499-514, 1973.
- SAIF, S.R. Vesicular arbuscular mycorrhizae in tropical forage species as influenced by season soil texture, fertilizers, host species and ecotypes. **Angewandte Botanik**, v.60, p.125-139, 1986.
- SAIF, S.R.; KHAN, A.G. The influence of season and stage of development of plant on Endogene mycorrhiza on field-grow wheat. **Canadian Journal Microbiology**, v.21, p.1020-1024, 1975.

- SANDERS, F.F., TINKER, P.B., BLACK, R.L.B., PALMERLEY, S.M., The development of endomycorrhizal roots systems. I. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. **New Phytologist**, v.78, p. 553-559, 1977.
- 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 Phytology**, v.130, p.419-427, 1995.
- SANTOS, N.F. Notes on portuguese mycorrhizae. **Direção Geral do Serviço Florestal**. Agrícolas Publicações. v.2, p.97-109, 1951.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1974.56p.
- SCANNERINI, S. The cell structures of plant, animal and microbial symbionts, their differences and similarities. In: **Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis** (SCANNERINI, S.; SMITH, P.; BONFANTE-FASOLO, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988, p.143-157.
- SCHENK, N.C. Can mycorrhizae control root diseases? **Plant Disease**, v.65, p.230-234, 1981.
- SCHENK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: University of Florida, 1987. 242p.
- SCHENK, N.C.; SIQUEIRA, J.O., Ecology of V.A. mycorrhizal fungi in temperate agroecosystems. In: SYLVIA, D.M.; HUNG, L.L.; GRAHAM, J.H. (Ed.) **Mycorrhizal in the next decade practical applications and research priorities**. Gainesville: University of Florida, 1987, p.2-4.
- SCHWAN, K.R.F. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiros e florestas de *Eucalyptus* spp. na região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, 1984. 55p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa.

- SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn, Germany: GTZ . 1991, 371p.
- SILVA, J.O.B. Efeito do superfosfato simples e de seus nutrientes principais no crescimento do limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* Osbeck) em vasos até a repicagem. Lavras, 1981. 100p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- SILVA, L.R.C.; PEREIRA, J.; AZEVEDO, L.C. Efeito de fontes de fósforo sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* in vitro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15,p.169-172, 1991.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorriza. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.
- SIMON, L. Phylogeny of Glomas: deciphering the past to understand the present. **New Phytology**, v.133, p.95-101, 1996.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, v.363, p.67-68, 1993a.
- SIMON, L; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent Single-Strand Conformation Polimorphism-Polimerase Chain Reaction. **Applied Environment Microbiology**, v.59, p.4211-4215, 1993b.
- SIQUEIRA, J.O., COLOZZI-FILHO, A., OLIVEIRA, E., Ocorrência de micorrizas vesículo-arbusculares em agro e ecossistemas de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, p.1499-1506, 1989.
- SIQUEIRA, J.O., ROCHA, J.R., OLIVEIRA, E., COLOZZI-FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). **Biology and Fertility of Soil**, v.10, p.65-71, 1990.

- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiolocal interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plantas. **Annual Review Plant and Physiology Plant Molecular Biology**, v.39, p.221-244, 1988.
- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KOIDE, R.; CAIRNEY, J.W.G. Nutrient transport in mycorrhizas: struture, phisiology and consequences for the symbiosis. **Plant and Soil**, v.159, p.103-113, 1994.
- SOUZA, F.A., SILVA, E.M.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: Siqueira, J.O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Universidade Federal de Lavras. Lavras, pp255-290. 1996.
- SOUZA, M.M.S.R., PACOVSKY, R.S.; CARDOSO, E.J.B.N. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em *Araucaria angustifolia*. In: FERTBIO'98. Caxambu, 1998. **Anais**: Universidade Federal de Lavras, 1998, p.643.
- SPARLING, G.P.; TINKER, P.B. Mycorrhizal infection in Pennine grassland.1.Levels of infection in the field. **Journal of Applied Ecology**, v. 15, p. 943-950. 1979.
- SPRATT, E.R. The formation and physiological significance of root nodules in the Podocarpineae. **Annals of Botany**, v.26, p.801-814, 1912.
- STUTZ, J.C.; MORTON, J.B. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Canadian Journal Botany**, v.74, p.1883-1889, 1996.
- SUTTON, J.C., BARON, G.L., Population dynamics of *Endogone* spores in soil. **Canadian Journal Botany**, v. 50, p.1909-1914, 1972.
- SYLVIA, D.M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.54-65, 1992.
- SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G.S.; LINDERMAN, R.G. (Ed.). **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: ASA Special Publication, 1992. p.101-124.

- THAPAR, H. S.; KHAN, S. N. Effect of VA mycorrhiza on the growth of Loop Pine. **Journal of Tree Science**, v.4, p.39-43, 1985.
- THAPAR, H. S.; KHAN, S. N. Studies on endomycorrhiza in some forest species. **Proceedings of the Indian National Science Academy**. v.39, p.687-697, 1973.
- TIEGHEM, P. van Recherches sur la symétrie de structure des plantes vasculaires. **Annual Science Natural of Botany**, 5 série 13, p.5-314, 1870-1871.
- TOMAZELLO-FILHO, M. & KRUGNER, T.L. Aspectos de associação micorrízica em *Pinus* spp. Instituto de pesquisa e Estudos Florestais, Piracicaba, SP. 32p., 1982. (Série Técnica, IPEF, v.3, n.9).
- TORO, T.S., SIEVERDING, E., Evaluación cuantitativa y cualitativa de hongos formadores de micorriza vesículo arbuscular en la región de Mondomo, Colombia. **Suelos Ecuatoriales**, v. 16, n.1, p. 122-129, 1986
- TÓTOLA, M.R. Eficiência de fungos MVA nas espécies cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e angico vermelho (*Piptadenia peregrina* Benth) em solo estéril de mineração de bauxita. Viçosa, 1994. 61p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.
- TRAPPE, J.M. Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands. *In*: **Advances in food producing systems for arid and semiarid lands**. MANASSAH, J.T.; BRISHEY, E.J. (Eds). New York: Academic Press, pp. 581-599, 1981.
- TRUFEM, S.F.B. Aspectos ecológicos de fungos micorrízicos arbusculares da mata tropical úmida da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.4, n.2, p.31-45, 1990.
- TRUFEM, S.F.B., BONONI, V.L. Micorrizas vesículo-arbusculares de culturas introduzidas em áreas de cerrado. **Rickia**, v.12, p.165-187, 1985.

- TRUFEM, S.F.B.; MALATINSZKY, S.M.M.; OTOMO, H.S. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de plantas do litoral arenoso do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. v.8, n.2, p.219-229, 1994.
- VAN BUUREN, M.L.; LANFRANCO, L.; LONGATO, S.; MINERDI, D., HARRISON, M.J.; BONFANTE, P. Construction and characterization of genomic libraries of two endomycorrhizal fungi: *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*. **Mycology Research**, v.103, n.8, p.955-960, 1999.
- VAN DER HEIJDEN, M.G, KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WEIMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, v.396, p.69-71, 1998.
- VAN Der HEIJDEN, M.G.A., BOLLER, T., WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plants community structure. **Ecology**, v.79, p.2082-91, 1998.
- VAN TUINEN, D.; JACQUOT, D.E.; ZHAO, B.; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular fungi using 25S rDNA-target nested PCR. **Molecular Ecology**, v.7, p.879-887, 1998.
- VERNELHA, M.M.; LEAL, J.; GABARDO, L.C.; ROCHA, M.A.L., SILVA, R.P. Considerações sobre a semente de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Acta Biológica Paranaense**, v.1, n.3/4, p.39-96, 1972.
- VOGT, K.A.; PUBLICOVER, D.A.; VOGT, D.J.A. A critique of the role of ectomycorrhizas in forests ecology. **Agric. Ecosystem Environment**, v.35, p.171-190, 1991.
- VOGT, K.A.; DAHLGREN, R.A.; UGOLINI, F.; ZABOWSKI, D.; MOORE, E.E. & ZASOSKI, R.J. Aluminium, Fe, Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn and P in above and below-ground biomass. In: *Abies amabilis* and *Tsuga mertensiana*. **Biogeochemistry**, v.4, p.277-294, 1987.

- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: **PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications**, INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J (Eds.), San Diego: Academic Press, 1990, p.315-322.
- WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycology Research**, v.97, p.1351-1357, 1993.
- YOUNG, H.E. The acidification of alkaline nursery soils for the production of exotic pine. **Queensland Agriculture Journal**, nov. 1938.
- ZACK, J.C., SINSABAUG, R. AND MACKAY, W.P. Windows of opportunity in desert ecosystems: their implications to fungal community development. **Canadian Journal Botany**. v.73 (suppl.), p.S1407-S1414, 1995.
- ZAK, B. Classification of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKY, T.T. (Eds.) **Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973, p.43-78.