

# MICORRIZAÇÃO DE CAFEEIROS (*Coffea arabica* L.) SOB CULTIVO ORGÂNICO AVALIADA POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E POR PCR<sup>1</sup>

Lucas C. B. de AZEVEDO<sup>2</sup> E-mail: [lcbasevedo@yahoo.com.br](mailto:lcbasevedo@yahoo.com.br), Arnaldo COLOZZI FILHO<sup>3</sup>, José O. SIQUEIRA<sup>4</sup>,  
Sandra M. GOMES-DA-COSTA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Parte da dissertação do primeiro autor apresentada ao departamento de solos da UFLA, Lavras, MG, para a obtenção do título de mestre. <sup>2</sup>Doutorando em Solos e Nutrição de Plantas – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, <sup>3</sup>Pesquisador do Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR, <sup>4</sup>Professor da Universidade Federal de Lavras, MG, <sup>5</sup>Professora da Universidade Estadual de Maringá, PR. Apoio financeiro PR 12 Meses e CNPq.

## Resumo:

A micorrização tem efeito no crescimento e nutrição mineral do cafeeiro favorecendo seu desenvolvimento. Por isso é importante conhecer a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) neste agrossistema, especialmente aqueles que estão colonizando as raízes do cafeeiro, visando conhecer o comportamento de fungos inoculados e autóctones em condições de campo. Técnicas moleculares, tais como a PCR, em conjunto com metodologias tradicionais baseadas em características fenotípicas dos fungos podem auxiliar no estudo da micorrização do cafeeiro. Assim, avaliou-se a ocorrência e a colonização de FMAs em cafeeiros a campo sob cultivo orgânico e inoculados com espécies selecionadas, através da caracterização morfológica e molecular dos esporos de FMAs, da avaliação dos fungos colonizantes por PCR e por cultura armadilha inoculada com raízes de cafeeiro provenientes do campo, e da determinação da taxa de colonização radicular. No solo rizosférico do cafeeiro a campo predominaram espécies da família Glomaceae e Acaulosporaceae. A maioria das espécies recuperadas do milho, inoculado com raízes do cafeeiro, pertencia às famílias Gigasporaceae e Glomaceae. Os iniciadores de amplificação de DNA específicos ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1, GiITS2, VAACAU, VAGIGA e VANS1 não foram eficientes em detectar esses fungos nas raízes do cafeeiro. A inoculação aumentou a riqueza de espécies e densidade de esporos no cafeeiro. As espécies inoculadas, *G. margarita* e *Gl. clarum*, foram recuperadas na rizosfera do milho, comprovando sua colonização no cafeeiro, porém, não foram observados na rizosfera. Gigasporaceae foi detectada por PCR nas raízes. Apesar de ter detectado FMA pertencente à família Gigasporaceae, a técnica PCR não foi eficiente para estudar a ocorrência destes simbioses nas raízes dos cafeeiros.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., fungos micorrízicos arbusculares, FMA, diversidade, *primers* específicos.

## MYCORRHIZA IN COFFEE PLANTS (*Coffea arabica* L.) UNDER ORGANIC MANAGEMENT EVALUATED BY PHENOTIPICAL METHODS AND BY PCR

### Abstract:

The arbuscular mycorrhizal has effect in the growth and mineral nutrition of coffee tree and that favors its development, and therefore the knowledge of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) community in coffee agrosystem become important. The traditional methodology and molecular techniques (such as the PCR) can aid in the study of the mycorrhization of coffee plants. Therefore, it was evaluated the occurrence and the colonization of AMF in a field under organic cultivation of coffee plants inoculated with selectioned species, using the morphologic and molecular characterization of AMF spores, evaluation of the colonization by PCR and by rate of mycorrhizal colonization. AMF inside of coffee plants roots were multiplied in a bioassay with maize. There was predominance of species of the Glomaceae and Acaulosporaceae families in the field rhizospheric soil. The most of the recovered AMF species of inoculated maize belonged to the Gigasporaceae and Glomaceae families. The specific primers for DNA amplification ACAU1660, GETU1, GETU2, GiITS1, GiITS2, VAACAU, VAGIGA e VANS1 were not efficient to detect AMF in coffee roots. The inoculation with AMF increased the fungal species and spores density in coffee rhizosphere. The inoculated species *G. margarita* and *Gl. clarum* were recovered by maize trapping culture inoculated with coffee tree roots, therefore indicating their presence in coffee. These species were not recovered in the rhizosphera of field soil planted with inoculated coffee plant. Gigasporaceae family was detected in coffee tree roots by PCR. Although PCR was able to detect some AMF this technique was not efficient to study the occurrence of symbionts colonizing coffee roots.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, AMF, diversity, specific primers.

## Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam simbiose com o cafeeiro e conectam as raízes com o solo, facilitando a aquisição de nutrientes (Moreira & Siqueira, 2002) e água (Augé et al., 2004), promovendo melhoria no estado nutricional da planta com grande efeito no seu desenvolvimento (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996). Em contrapartida, o fungo recebe fotoassimilados e fatores de crescimento de que necessita para completar seu ciclo biológico. Portanto, esta associação íntima entre esses fungos e o cafeeiro é importante para o desenvolvimento e, posteriormente, a produtividade da cultura. Entretanto, as informações sobre a ocorrência de FMAs em cafeeiros mostram a predominância

de espécies de baixa eficiência simbiótica para a cultura, que ocorrem naturalmente no solo (Saggin-Júnior & Siqueira, 1996). O emprego da inoculação com espécies selecionadas de fungos é uma das propostas para aumentar o índice de colonização micorrizica de cafeeiro com espécies simbioticamente eficientes. Entretanto, em solo onde existe uma comunidade microbiológica estabelecida, a resposta da planta em termos de desenvolvimento, quando inoculada com FMAs, também depende da espécie inoculada e de sua capacidade de conseguir colonizar a planta em um ambiente competitivo. Portanto, é importante conhecer aspectos da biologia destes simbioses quanto à identificação dos isolados na rizosfera, da composição da comunidade de FMAs no solo e em especial, daquela que de fato coloniza as raízes do cafeeiro. Os estudos de dinâmica e de graus de colonização de raízes pelos FMAs em solo contendo comunidade diversa são dificultados devido à semelhança entre hifas e estruturas produzidas nas raízes pelos fungos. Para esses estudos de dinâmica da micorrização, o emprego da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual permite a caracterização de parte do DNA de indivíduos ou isolados, pode possibilitar a caracterização destes fungos em vida livre ou simbiose no interior das raízes (Colozzi-Filho & Cardoso, 2000). Neste trabalho empregaram-se as avaliações fenotípica e de PCR para determinar a ocorrência e colonização de fungos MAs em cafeeiros inoculados com espécies selecionadas e cultivados a campo sob manejo orgânico.

## Material e Métodos

A lavoura cafeeira avaliada localiza-se no município de Bandeirantes, PR. As mudas de cafeeiro “Catuaí Vermelho” foram transplantadas para o campo em outubro de 2000. Desde o ano de 2002 a lavoura está em transição para cultivo orgânico, com vistas à certificação e, desde então, não recebe adubação química ou aplicação de defensivos agrícolas. Por ocasião da implantação da lavoura, mudas transplantadas em uma área de 1 hectare, foram inoculadas no momento do transplante para o campo, com solo inóculo contendo *Acaulospora morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Gl. geosporum* e *Gl. mosseae*. Em junho de 2004 coletaram-se 6 (seis) amostras aleatórias de solo rizosférico e raízes na projeção da copa destes cafeeiros. Além das amostras da área cultivada com cafeeiros inoculados, coletou-se uma amostra de solo e raízes em um cafeeiro cultivado em área vizinha onde as mudas não receberam inóculo no transplante. Das amostras coletadas na rizosfera, foram separadas raízes dos cafeeiros inoculados para avaliação de colonização radicular e para uso como inóculo em cultura armadilha, visando a condução de um bioensaio para multiplicação das espécies de FMAs presentes no interior das raízes.

Para determinação da colonização radicular do cafeeiro por FMAs, as raízes foram clarificadas com KCl e, após isto, coraram-se as estruturas fúngicas internas de acordo com Phillips; Hayman (1970) e analisou-se a colonização das raízes segundo Giovannetti; Mosse (1980). Com o objetivo de se recuperar as espécies de FMAs que colonizavam as raízes do cafeeiro do campo, realizou-se um bioensaio em casa de vegetação. Utilizaram-se as raízes provenientes das amostras de solo rizosférico coletados nos cafeeiros inoculados, sob cultivo com insumos reduzidos, como inóculo para multiplicação de FMAs em Milho (*Zea mays* L.), cultivar IPR114. O milho foi cultivado em solo esterilizado com brometo de metila. Um grama de raiz do cafeeiro inoculado com FMAs e conduzido a campo foi utilizado como inóculo em vasos contendo 1kg de solo e duas plantas cada. O ensaio constou de três repetições para cada amostra do campo, com delineamento experimental casualizado. Após 110 dias da sementeira, o solo foi amostrado para avaliação da esporulação e diversidade de FMAs.

As raízes do cafeeiro foram utilizadas em Kit de extração de DNA do solo do fabricante Mobio®, com protocolo adaptado. Para tanto, as amostras de raízes foram previamente maceradas em tubos de 1,5 mL, com emprego de micropilão. O extrato das raízes foi adicionado aos tubos do kit comercial, seguindo-se o protocolo do fabricante, com exceção do passo de agitação inicial em sílica por 10 minutos. Aliquotas da solução final foram diluídas, sendo usadas imediatamente na reação de PCR ou, então, armazenadas a -20°C para utilização posterior. Esporos de *G. margarita* e de *S. heterogama*, em número de 20 a 100, foram utilizados para extração de DNA. As amostras de DNA de raízes e esporos foram utilizados em PCR com iniciadores de amplificação específicos para grupos de FMAs.

Para a análise dos fragmentos de DNAr proveniente das raízes utilizou-se a técnica de nested PCR. Os produtos de PCR da primeira reação foram diluídos 100 vezes e utilizados como amostras para a amplificação na segunda PCR. A reação para amplificação de DNA constituiu-se de 2,5 µl de extrato cru contendo DNA de raízes nas diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionados à solução de reação para um volume final de 25µl. A concentração final na reação foi de 200 µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleotídeo de iniciação de amplificação de DNA (*primer*), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 unidade (U) de enzima Taq DNA polimerase e mais o tampão, fornecido pelo fabricante juntamente com a enzima, na concentração final de 1X. Na segunda etapa de PCR foram utilizados os seguintes pares de iniciadores: GiITS1-GiITS2 (têm como organismo alvo *Gigaspora margarita*); GIGA5.8R (Gigasporaceae)-ITS5; VANS1 (FMA)-VAGIGA (Gigasporaceae); ACAU1660 (Acaulosporaceae)-ITS4; VANS1-VAACAU (Acaulosporaceae) e GETU1-GETU2 (*Glomus etunicatum*).

O programa para a primeira etapa de amplificação foi 95°C por 3 minutos e 40 ciclos de 1 minuto e 30s a 94°C, 40 segundos a 54°C para anelamento dos iniciadores, 1 minuto a 72°C para extensão da fita através da polimerização de nucleotídeos, seguidos de 3 minutos a 72°C para extensão final. Já no segundo passo, foi utilizado o programa de amplificação: 95°C por 3 minutos, seguidos de 5 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 35s e 72°C por 1 minuto e 30s; depois seguiram 30 ciclos de 95°C por 30s, 54°C por 40s, 72°C por 1 minuto e 30s; e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. A visualização das bandas foi feita após eletroforese em gel de agarose 1%.

Os esporos do campo e aqueles do bioensaio conduzido com milho foram extraídos conforme Gerdemann & Nicolson (1963), por peneiramento úmido e centrifugação. A identificação de gêneros e espécies foi feita conforme descrito em Schenck; Perez (1987) e Morton; Benny (1990).

## Resultados e Discussão

Avaliação fenotípica - O índice de colonização micorrizica foi de 33% nos cafeeiros inoculados e de 57% no cafeeiro não inoculado. No cafeeiro inoculado observou-se um total de 20 espécies de FMAs no solo e 19 espécies que foram recuperadas no bioensaio com milho inoculado com as raízes de cafeeiros a campo (Tabela 1). A densidade média de esporos ( $n^{\circ}.50\text{cm}^{-3}$  de solo) foi de 41,7 para o solo rizosférico dos cafeeiros não inoculado e 48,8 para aqueles inoculados. Foram observados, em média, 36 esporos. $50\text{cm}^{-3}$  de solo no milho inoculado com raízes de cafeeiros (Tabela 1).

Tabela 1 - Densidade de esporos e riqueza de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em cafeeiros cultivados a campo por 4 anos com insumos reduzidos, não inoculados com FMA (NI); inoculados no transplântio para o campo (IN); e recuperadas na rizosfera de milho inoculado com raízes do cafeeiro inoculado cultivado a campo. Média de 3 repetições.

	Cafeeiro NI	Cafeeiro IN	Milho
Densidade de esporos <sup>1</sup>	41,7	48,8	36
Riqueza de espécies	4	20	19

1 – Densidade de esporos =  $n^{\circ}$  de esporos. $50\text{cm}^{-3}$  de solo.

O solo do cafeeiro não inoculado apresentou apenas quatro espécies (Tabela 1 e Figura 1A): *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata* e *Gl. etunicatum*, tendo *A. mellea* dominado em número relativo de esporos no solo (89% do total; Figura 1A). Já as espécies de FMAs no solo rizosférico do cafeeiro inoculado apresentaram distribuição mais uniforme de esporos em cada espécie e maior número de espécies (20), tendo as que apresentaram maiores densidades relativas sido *A. scrobiculata* (29%), *Gl. macrocarpum* (22%), *Gl. etunicatum* (13%), *A. mellea* (9%) e *A. spinosa* (8%) (Figura 1B). Das espécies recuperadas no milho, inoculado com raízes dos cafeeiros que receberam solo inóculo, as que apresentaram as maiores densidades relativas foram *A. mellea* (23%), *Gl. etunicatum* (17%), *Gl. macrocarpum* (13%) e *Gl. invermaium* (13%) (Figura 1C). No entanto, essas proporções são fortemente influenciadas pela planta hospedeira, que neste caso foi o milho e, assim, pode não representar a situação real no interior das raízes dos cafeeiros inoculados. Com os dados acima, verifica-se que as espécies mais estimuladas pela inoculação no solo rizosférico do cafeeiro, em ordem decrescente quanto à esporulação, foram *A. scrobiculata*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. etunicatum*, *A. spinosa*, *Paraglomus occultum*, *Gl. invermaium*, *Glomus sp.*, *A. morrowiae* e *Gl. agregatum*. Portanto, a inoculação do cafeeiro estimulou a esporulação de espécies de FMAs, sendo este efeito observado, ainda, após quatro anos de aplicação do inóculo.

O elevado número de espécies observadas no cafeeiro inoculado em relação à área vizinha onde o cafeeiro não recebeu inóculo de FMAs (Figura 1), provavelmente deve-se ao inóculo aplicado nos cafeeiros no transplântio há 4 anos.

As espécies em comum encontradas no solo e recuperadas nas raízes foram: *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Gl. diaphanum*, *Gl. etunicatum*, *Gl. fasciculatum*, *Gl. invermaium*, *Gl. macrocarpum* e *Paraglomus occultum*. As espécies encontradas no solo rizosférico do cafeeiro, mas não multiplicadas no milho foram: *A. foveata*, *A. lacunosa*, *A. sp.*, *A. spinosa*, *E. infrenquens*, *Gl. agregatum*, *Gl. geosporum*, *Gl. mosseae*, *Gl. sinuosum* e *Gl. sp.* As espécies que foram recuperadas no milho, mas não estavam no solo rizosférico do cafeeiro no campo, foram *A. laevis*, *Archaeospora gerdemannii*, *E. colombiana*, *G. margarita*, *Gl. clarum*, *S. calospora*, *S. cerradensis*, *S. pellicuda* e *S. sp.*

As espécies *G. margarita* e *Gl. clarum* inoculadas no cafeeiro não foram recuperadas no solo cultivado, mas foram presentes nos vasos com milho inoculado com raízes do cafeeiro do campo (Figura 1B e 1C). Apesar de não esporularem no solo do campo, essas duas espécies, quando inoculadas em solo sob cultivo orgânico, foram eficientes na competição com outros fungos, na adaptação às condições edáficas para sobreviverem e colonizarem o cafeeiro e serem encontradas em suas raízes após 4 anos de sua inoculação. A ausência dessas duas espécies no campo pode indicar que o estado fisiológico da planta e o estado da relação fungo-planta-solo não promoveram a produção de esporos na época avaliada.

*Glomus mosseae* e *Gl. geosporum* inoculadas nas plantas de cafeeiro foram observadas na rizosfera do cafeeiro do campo, no entanto, nenhuma das duas espécies foi recuperada a partir de raízes destes cafeeiros inoculadas em milho (Figura 1).

A maioria das espécies de FMAs recuperadas de cafeeiros inoculados pertence a família Glomaceae (10 espécies do gênero *Glomus*), seguido de espécies da família Acaulosporaceae (oito espécies). Já as quatro espécies recuperadas do cafeeiro não inoculado pertencem apenas a duas famílias: Acaulosporaceae (três espécies) e Glomaceae (uma espécie). Quando se recuperaram as espécies das raízes do cafeeiro no milho, a família Gigasporaceae, com seis espécies, também é dominante no número de espécies, juntamente com as outras duas famílias citadas acima.

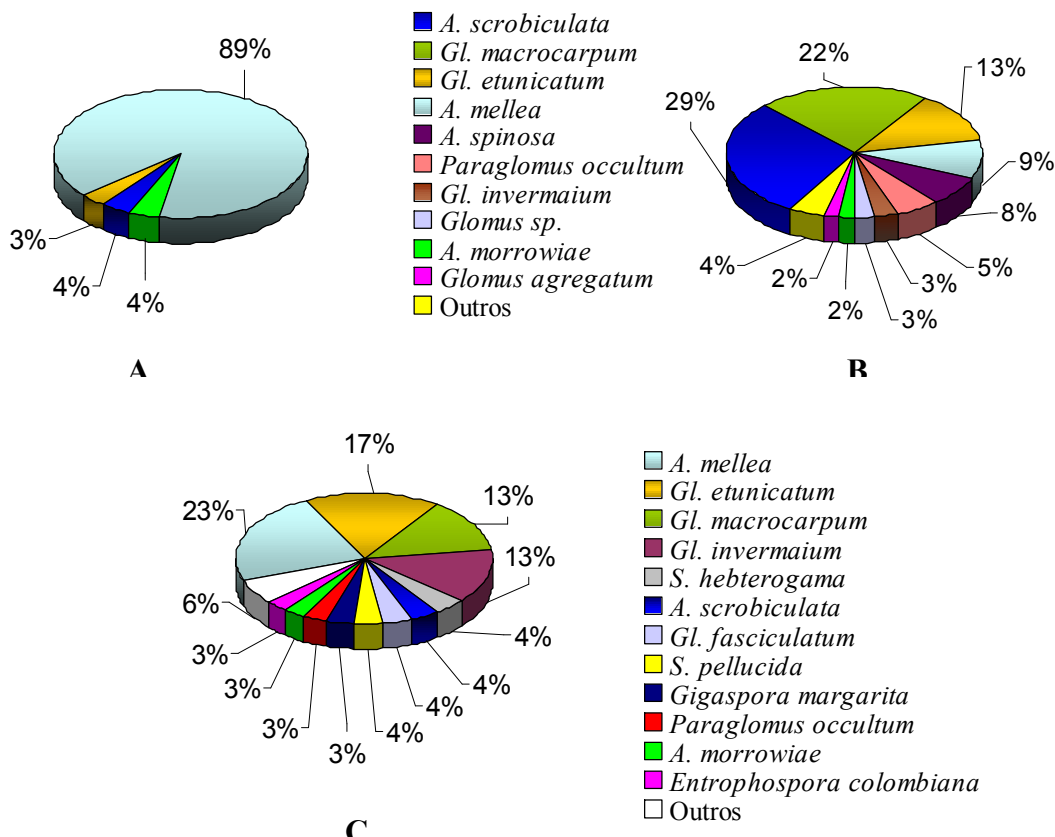


Figura 1 - Densidade relativa de esporos no solo rizosférico de cafeeiros sob cultivo com baixos insumos. (A) Cafeeiros não inoculados no transplântio. (B) Cafeeiros inoculados no transplântio há 4 anos, com *Acaulospora morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Gl. geosporum* e *Gl. mosseae*. (C) Esporos recuperados de milho inoculado com raízes provenientes do cafeeiro inoculado e cultivado por 4 anos a campo.

Avaliação molecular - A utilização dos iniciadores VANS1, VAGIGA, VAACAU, GETU1 e GETU2 não produziu amplicons em quaisquer amostras deste ensaio. Mesmo com a presença de *Gigaspora margarita* nas amostras inoculadas em milho (Figura 1C), também não houve amplicons com os iniciadores GiITS1 e GiITS2. A ausência de amplicons foi atribuída à ineficiência dos iniciadores em amplificar todos indivíduos dentro do grupo de organismos alvo, à diluição do DNA fúngico em meio ao DNA e compostos vegetais ou à interferência destes compostos na reação de amplificação do DNA. Os iniciadores GIGA5.8R (específico para Gigasporaceae) e ITS5 utilizados resultaram em amplicons em algumas amostras de raízes, esporos de *G. margarita*, DNA de *G. margarita* misturado com extrato de raízes sem colonização (ERSC de *G. margarita*), *S. heterogama* e ERSC de esporos de *S. heterogama* (Figuras 2 e 3).

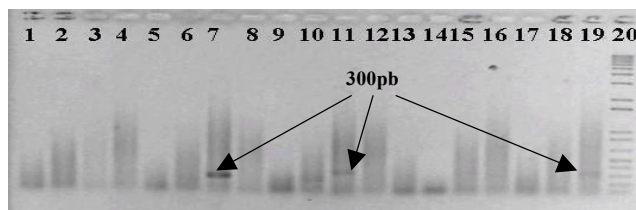


FIGURA 2. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 em raízes de cafeeiros inoculados em condições de campo. Linhas 1 a 19, amostra de DNA em diluições de 1:1, 1:10 e 1:100; linha 20, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

Porém, somente em três amostras de raízes do campo e das amostras de esporos de *G. margarita*, ERSC de *G. margarita*, de esporos de *S. heterogama* e ERSC de *S. heterogama*, é que produziram amplicons de 300pb (Figuras 11 e 12). Outros amplicons de amostras das raízes do cafeeiro do campo têm o tamanho de cerca de 250 pb (Figura 12). Provavelmente, o que ocorreu quando se utilizou o iniciador GIGA5.8R nas amostras que deram origem a DNA

amplificado de 250 pb, foram amplificações inespecíficas por causa da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos relativamente baixa (54°C). O aumento da temperatura não proporcionou amplificação nas amostras (dados não mostrados). Através dos resultados dos amplicons com os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 nas raízes de cafeeiros, descartando-se as amostras sem amplificação positiva e aquelas com amplificações inespecíficas (amplicons de 250pb), mostra-se que espécies da família Gigasporaceae estão colonizando as raízes dos cafeeiros.

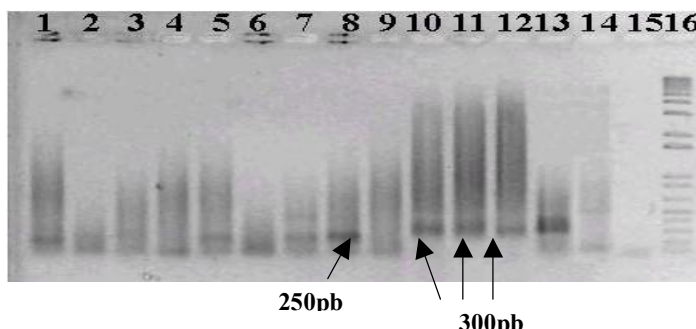


FIGURA 3. Produto da amplificação por PCR utilizando os iniciadores GIGA5.8R e ITS5 em esporos e raízes de cafeeiros a campo. **Linhas 1 a 5**, DNA de raízes de cafeeiros inoculados nas diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000; **linhas 6 a 9**, raízes coletadas em área adjacente onde o cafeeiro não recebeu inóculo, sendo 6 sem diluição (extrato cru), e os demais na diluição 1:10, 1:100 e 1:1000, respectivamente; **linha 10**, esporos de *G. margarita*; **linha 11**, DNA de esporos de *G. margarita* misturado com extrato de DNA de raízes de cafeeiro sem colonização (ERSC); **linha 12**, esporos de *S. heterogama*; **linha 13**, ERSC + DNA de esporos de *S. heterogama*, **linha 14 e 15**, amostra de água estéril; **linha 16**, marcador de peso molecular 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen®).

### Conclusões

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

As espécies com maior densidade de esporos no solo foram, em ordem decrescente, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *Gl. etunicatum*, *A. spinosa*, *Paraglomus occutum*, *Gl. invermaium*, *Glomus sp.*, *A. morrowiae* e *Gl. aggregatum*.

As espécies inoculadas *Gigaspora margarita* e *Gl. clarum* são capazes de colonizar cafeeiros conduzidos em manejo orgânico e permanecem no agrossistema depois de 4 anos da inoculação e implantação da lavoura.

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

Através da PCR foi possível detectar colonização do cafeeiro por Gigasporaceae. Entretanto, a técnica PCR/RFLP não foi eficiente para estudar a ocorrência de diferentes espécies de FMAs nas raízes do cafeeiro.

### Referências bibliográficas

- Augé, R. M.; Sylvia, D. M.; Park, S.; Bittery, B. R.; Saxton, A. M.; Moore, J. L.; Cho, K. (2004) Partitioning mycorrhizal influence on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. *Canadian Journal of Botany*, 82:503-514.
- Colozzi-Filho, A. ; Cardoso, E.J.B.N. Detecção de fungos micorrizicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalaria cultivada na entrelinha. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2033-2042, 2000.
- Gerdemann, J.W.; Nicolson, T.H. (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transaction of the British Mycological Society*, 46: 235-244.
- Giovannetti, M.; Mosse, B. (1990) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:489-500.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2002) Microbiologia e Bioquímica do Solo. UFLA, Lavras, MG. 625p.
- Morton, J.B.; Benny, G.L. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37:471-491.
- Phillips, J.M.; Hayman, D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55 (1):158-160.
- Saggin-Júnior, O. J.; Siqueira, J. O. (1996) Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O (ed). *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 203-254.
- Schenk, N.C.; Perez, Y. (1987) *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. Gainesville: University of Florida.