

DINÂMICA POPULACIONAL DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES NO AGROSSISTEMA CAFEIRO E ADUBAÇÃO
VERDE COM LEGUMINOSAS

ARNALDO COLOZZI FILHO
Engenheiro Agrônomo

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 de título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Janeiro – 1999

Este trabalho é dedicado às **minhas** queridas **esposa** e filhas, **que** durante tantos momentos de ausência souberam **me** entender **e** encorajar, acreditando sempre **que** estávamos construindo **um** futuro melhor.

*Para ser grande
sê inteiro.
Nada teu exagera
ou exclui.
Põe quanto és
no mínimo que fazes.
Assim como a lua,
que em todo lago brilha
porque alta vive.*

“Fernando Pessoa”

AGRADECIMENTOS

A amizade e a colaboração desinteressada de muitas pessoas, algumas conhecidas e outras **que** felizmente **pude** conhecer, foram **responsáveis** por grande parte de **sucesso** deste trabalho. **A** todos **eles** **faço** os **meus sinceros** agradecimentos.

À Profa Dra Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela orientação, confiança e também **pelas** oportunidades de enriquecimento profissional **que** me proporcionou.

À Profa Dra Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina-PR, **pele** treinamento intensivo **em biologia molecular** e pela amizade,

À Profa Dra Sandra Maria Gomes da Costa, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá-PR, pela identificação dos fungos micorrízicos.

Ao Prof. Dr. Márcio Lambais, **pelo apoio** e amizade.

Aos colegas da *área* de solos **do** IAPAR, pela amizade e **apoio**.

A Dra Mariângela Hungria e funcionários do laboratório de microbiologia da Embrapa-Soja Londrina, pela **cessão** do laboratório e equipamentos na fase inicial do trabalho.

Aos colegas Oswaldo Machinesk, Aresmundinei Dias, Clarice Correia André e Maria Aparecida Mattos Bonfim, funcionários do laboratório *de* microbiologia do solo do IAPAR, **pela** incansável ajuda **no** manuseio **dos fungos** e raízes **do** campo.

Aos colegas Denise Lourdes Colombo Mescolotti e Luís Fernando Baldesin, do laboratório de microbiologia **da** solo da ESALQ, **pelo** **a p i o** e amizade

Ao grande **amigo** Marco Antonio Nogueira, pela **incansável** solicitude e amizade.

A todos os colegas de curso **que**, com **a** convivência e **comunhão** do dia **a** dia, sempre nos ensinam algo de **bom** **que** nos **ajuda a viver**.

Ao IAPAR, ESALQ, CNPq e Capes, **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. Micorrizas arbusculares no agrossistema cafeeiro e adubação verde com leguminosas.
2. Metodologia simplificada para isolamento de DNA genômico de um único esporo de fungos micorrízicos arbusculares.
3. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivado com *Crotalaria breviflora* na entrelinha e sua detecção em raízes através da PCR.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	x
x INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A micorrização e as populações de fungos MA nativas	5
2.2 Micorrizas ne cafeeiro	14
2.3 As práticas de cultivo e a micorrização	17
2.4 Técnicas moleculares e a identificação dos fungos MA	22
2.4.1 DNA ribossômico (rDNA)	23
2.4.2 PCR (reação em cadeia da polimerase)	25
2.4.3 RAPD (polimorfismo da amplificação aleatória do DNA)..	26
2.4.4 Análises de isoenzimas	27
3 MICORRIZAS ARBUSCULARES NO AGROSSISTEMA CAFEIEIRO E ADUBAÇÃO VERDE COM LEGUMINOSAS	30
3.1 Resumo	30
3.2 Summary	31
3.3 Introdução	32
3.4 Material e Métodos	33
3.4.1 Campo	33
3.4.2 Casa de vegetação	34
3.4.3 Avaliações	36
3.5 Resultados	37
3.6 Discussão	46
3.7 Conclusões	52
4 METODOLOGIA SIMPLIFICADA PARA ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE UM ÚNICO ESPORO DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES	53
4.1 Resumo	53

4.2 Summary	54
4.3 Introdução	54
4.4 Material e Métodos	57
4.4.1 Os esporos de fungos MA	57
4.4.2 Extração, amplificação e sequenciamento	58
4.5 Resultados	60
4.6 Discussão	62
4.7 Conclusões	65
5 OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CAFEIRO (<i>COFFEA ARABICA</i> L.) CULTIVADO COM <i>CROTALARIA BREVIFLORA</i> NA ENTRELINHA E SUA DETECÇÃO EM RAÍZES ATRAVÉS DA PCR	66
5.1 Resumo	66
5.2 Summary	67
5.3 Introdução	65
5.4 Material e Métodos	70
5.4.1 Esporos de fungos MA	71
5.4.2 Raízes	72
5.4.3 PCR de DNA de esporos e raízes.	73
5.5 Resultados	73
5.6 Discussão	79
5.7 Conclusões	82
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

DINÂMICA POPULACIONAL DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO AGROSSISTEMA CAFEIEIRO E ADUBAÇÃO VERDE COM LEGUMINOSAS

Autor: ARNALDO COLOZZI FILHO

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

RESUMO

Avaliou-se o efeito do cultivo intercalar de leguminosas de verão para adubação verde do *cafeeiro* (*Coffea arabica* L.), sobre a ocorrência e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares (MA) no solo e a micorrização. Amostras de solo rizosférico e raízes foram coletadas no período entre junho de 1996 e julho de 1997, em três épocas, em um experimento de longa duração, conduzido a campo pelo Instituto Agronômico do Paraná- IAPAR, no município de Mirassol, PR. O experimento está instalado em uma área de latossolo vermelho escuro distrófico (LEd) onde, nas linhas principais, se cultiva o cafeeiro 'Catuaí Amarelo' e nas entrelinhas as leguminosas *Leucaena leucocephala*, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna cinzenta* (*Stizolobium pruriens*), *Mucuna anã* (*Stizolobium deeringianum*), *Amendoim cavalo* (*Arachis hipogaeae*) e *Caupi* (*Vigna unguiculata*) para fins de adubação verde. O delineamento experimental é de blocos ao acaso, com três repetições. Determinou-se a diversidade de espécies através da identificação morfológica dos esporos, a frequência de ocorrência através da contagem direta de esporos no solo e a colonização radicular pelo método da placa quadriculada usando raízes coradas. Também foram conduzidos bioensaios em casa de vegetação, para estudar a composição das populações de fungos MA que efetivamente colonizavam as raízes do cafeeiro a campo. Com o mesmo objetivo

utilizaram-se técnicas moleculares **baseadas na** amplificação de fragmentos de **DNA** através da PCR (Polimerase chain reaction), extraídos de esporos coletados na rizosfera *e* de raízes colonizadas coletadas a campo.

O **cultivo** de leguminosas na entrelinha de plantio do *cafeeiro* aumentou a diversidade de espécies *e* o número de **esporos de fungos MA na rizosfera do** *cafeeiro*. *Cafeeiro* cultivado com *Crotalaria breviflora* mostrou-se altamente micorrizado, com maior diversidade de **espécies e** número de esporos de fungos MA **ne** solo, em todas as épocas avaliadas. Entretanto, **parte** da diversidade **de** fungos **presentes** na rizosfera do *cafeeiro* **não** foi recuperada **na rizosfera de milho** (*Zea mays* L.) *e* sorgo (*Sorghum bicolor* L.) **quando** se utilizaram **raízes** colonizadas de *cafeeiro* como inóculo, sugerindo **que alguns dos** fungos MA observados **na rizosfera do** *cafeeiro* podem ser **provenientes** das raízes das **leguminosas que** crescem próximas, **mas não estão** efetivamente **em** simbiose *com* o *cafeeiro*. **Através** da PCR *e* usando **primers de** ITS (Internal transcribed spacer) foi **possível** comparar bandas obtidas **a partir de** DNA extraído de esporos coletados na rizosfera **com** bandas obtidas **a partir de** DNA extraído de **raízes** colonizadas. Bandas características de *Scutellospora gilmorei* não foram encontradas nas **raízes** de *cafeeiro* colonizadas, **confirmando** os resultados obtidos **através** de bioensaios em **casa de vegetação**. **Estes resultados sugerem a** ocorrência de relações preferenciais **entre** fungos *e* hospedeiros, que podem determinar **o** estabelecimento *e* **a** eficiência da simbiose micorrízica **ou** mesmo a **exclusão** de algumas **espécies** do sistema radicular da **planta**.

Neste trabalho foi possível **também** desenvolver um método **para** isolamento de **DNA genômico de** diferentes gêneros de fungos MA. **Com este** método, **a partir de um** **único** esporo de fungos MA foi possível obter, **de** maneira simples *e* rápida, DNA **de** qualidade *e* em quantidade suficiente para **a** PCR.

POPULACIONAL DINAMIC OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN AN AGROSYSTEM WITH COFFEE PLANTS INTERCROPPED WITH LEGUME AS GREEN MANURE

Author: ARNALDO COLOZZI FILHO

Adviser: Prof^a Dr^a ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

SUMMARY

Sporulation and occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) were evaluated on coffee trees (*Coffea arabica* L.) intercropped with legume for green manure. Samples of rhizosphere soil and roots were collected at three times between July 1996 and July 1997, in a long term experiment located at the Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR, at Mirassolva city, Paraná state, Brazil. The AM diversity was determined through the morphologic identification of spores, the AM occurrence frequency by the direct counting of spores in the soil and the root colonization evaluated with the grid-line method using stained roots. Bioassays were also conducted at the green-house, to study the AM composition inside the coffee roots from the field. With the same objective, molecular techniques based on the DNA fragment amplification by PCR (Polimerase chain reaction) were used. DNA of spores collected in the rhizosphere and from colonized roots collected at the field was extracted.

Legume intercropping increased the AM diversity and the inoculum potential in the coffee rhizosphere. *Crotalaria breviflora* showed a high mycorrhizal capacity, able to form symbiosis with several species of AM fungi, resulting in a greater AM diversity, spore number in the soil, at all evaluation periods, This effect was also observed in the

coffee rhizosphere. However, part of the AM diversity in the coffee tree rhizosphere was not recovered in corn (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) rhizosphere when colonized coffee roots was used as inoculum, suggesting that some AM fungi observed in the coffee rhizosphere originated from the legume roots, but were indeed not in symbiosis with the coffee trees. Through PCR and using the combined primers of ITS (Internal transcribed spacer) 4 and 5, it was possible to compare bands obtained from extracted DNA of spores collected in the rhizosphere with bands obtained from extracted DNA of colonized roots. Characteristic bands of *Scutellospora gilmorei* were not found in the coffee roots,

1 INTRODUÇÃO

Muitas culturas formam associações **simbióticas** com **fungos micorrízicos arbusculares MA**. Estes **fungos** são Zygomycetos da ordem Glomales e frequentemente são **os mais** abundantes fungos **de solo** (Gerdemann & Nicolson, 1963). Formam um **grupo** diverso de aproximadamente **14.4** espécies descritas (Shenck & Perez, 1987), **mas**, apesar **de** sua **abundância no solo** e dos efeitos **positivos** que **causam** sobre o desenvolvimento das **plantas**, pouco **se** sabe sobre sua ecologia. No **Brasil**, o trabalho pioneiro sobre ocorrência de micorrizas no cafeeiro, realizada **por** Cardoso (1978), mostrou a ocorrência natural **destes fungos** **em** mudas de cafeeiros produzidas **em** viveiros do estado de **São Paulo**. E a **inoculação das** mudas com espécies de **fungos MA** selecionadas mostrou-se eficiente em estimular o **estabelecimento** da simbiose no início do **desenvolvimento** das plantas (Colozzi Filho et al., 1985), proporcionando mudas saudáveis e mais resistentes ao estresse causado **pelo transplante para o campo**. Entretanto, **as** espécies eficientes selecionadas, **quando** introduzidas via inoculação, **têm** dificuldade de permanecer no **agrossistema** (Balota & Lopes, 1996b). Normalmente no **campo** se observa a ocorrência **de espécies indígenas de baixa** eficiência **simbiótica** (Balota & Lopes, 1996a), possivelmente selecionadas pelo monocultivo continuado **que, segundo** Johnson et al. (1992), pode ser a causa da **diminuição** da diversidade e seleção **de** espécies **menos** eficientes. Portanto, a manutenção de **populações** de fungos MA diversificadas e ativas **na rizosfera das** plantas é importante **para a sustentabilidade** do **agrossistema** (Bethlenfalvay & Linderman, 1992). O manejo do solo e das culturas parece ser a alternativa mais apropriada **para manter ou aumentar a** diversidade **de** espécies. o número **de** esporos **no solo** e o potencial de inóculo **natural** de fungos MA a campo.

A eficiência dos fungos MA em aumentar o crescimento das plantas depende da inter-relação entre os fatores edáficos, a planta hospedeira e o fungo (Hall, 1988). Começadamente, é necessário entender como os fungos MA e as plantas se relacionam em condições de campo e que fatores controlam suas populações nos agrossistemas (Abbott & Robson, 1982). Diversos estudos têm examinado os efeitos de rotações de cultivos e pré-cultivos na colonização micorrízica e na produção de esporos (Sieverding & Leihner, 1984; Dood et al., 1990; Johnson et al., 1992) mas, pouco se conhece dos efeitos destas práticas sobre a comunidade de fungos micorrízicos em cafeeiros a campo.

Em situações de campo, a avaliação de populações requer a identificação precisa das espécies presentes e a quantificação da densidade de propágulos e sua infectividade. Até o momento, bioensaios de vários tipos são a técnica mais comum utilizada para multiplicar fungos MA isolados do solo e avaliar sua infectividade. Estes ensaios têm a vantagem de incluir todos os propágulos micorrízicos infectivos presentes no solo, mas dão informações limitadas sobre a composição das espécies no solo. O isolamento de esporos e sua multiplicação em planta hospedeira são o principal meio para se conhecer as espécies presentes na rizosfera. Entretanto, através desta técnica não é possível determinar as espécies que estão efetivamente colonizando as raízes. A inoculação da planta hospedeira com raízes colonizadas pode ser um procedimento eficaz, mas é um processo trabalhoso e demorado e de eficiência não garantida.

Atualmente, os estudos de ecologia microbiana têm sido auxiliados pelo desenvolvimento e adaptação de técnicas comumente utilizadas em estudos de biologia molecular. Estas técnicas incluem o uso de anticorpos específicos, provas de DNA e reações específicas da polimerase em cadeia (PCR) com primers específicos para diferentes espécies, bem como perfil de lipídeos e isoenzimas. (Rosendahl & Sen, 1992; Simon et al., 1992; Bentivenga & Morton 1994, Clapp et al., 1995). Métodos baseados no DNA podem ser suficientemente precisos para distinguir diferentes isolados da mesma espécie, mas necessitam ainda de adaptações e estudos para serem rotineiramente utilizados em trabalhos com micorrizas. Um método rápido e preciso para a identificação de fungos MA presentes na rizosfera e nas raízes das plantas poderia

contribuir **para a** seleção e o uso de técnicas de manejo **do solo**, plantas e fungos, **visando** aumentar o efeito biofertilizante das **micorrizas** nos **agroecossistemas**.

Neste trabalho, utilizando-se de métodos tradicionais de trabalho ***in-vivo*** no campo e em casa de vegetação e métodos moleculares baseados na análise de **fragmentos de DNA amplificados** através da PCR, estudou-se o efeito **do cultivo** intercalar do cafeeiro com leguminosas de verão para **adubação verde**, sobre a ocorrência de fungos MÃ e a **micorrização** do *cafeeiro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Micorrizas arbusculares são associações simbióticas mutualistas formadas entre os fungos da família Endogonaceae, Zigomicotina (Morton & Benny, 1990) e raízes da maioria das plantas superiores, caracterizando-se pela penetração do micélio fúngico inter e intracelularmente, sem causar modificações morfológicas nas raízes. São de ocorrência generalizada, podendo-se afirmar que plantas não possuem raízes, mas sim micorrizas (Marx & Brian, 1975). Segundo Silveira (1992), os principais benefícios desta simbiose para as plantas são a melhoria do estado nutricional da planta e melhor utilização e conservação dos nutrientes no sistema solo-planta; modificações fisiológicas e bioquímicas diversas como maior produção de substâncias de crescimento, maior taxa fotossintética atividade enzimática, etc; melhoria na adequabilidade das plantas ao ecossistema e na capacidade inicial de adaptação de mudas transplantadas; redução nos efeitos provocadas por estresses de natureza biótica (pragas e doenças) ou abiótica (déficit hídrico, nutricional ou térmico).

Os efeitos dos FMA para as plantas são atribuídos ao desenvolvimento do micélio no solo que estabelece pontes conectando as raízes com as partículas de solo circundantes, aumentando a ciclagem de nutrientes e sua aquisição pelas plantas. As hifas também produzem efeitos físicos no solo, atuando sobre sua estruturação (Bethlenfalvay, 1992).

Do ponto de vista prático, os benefícios nutricionais são os de interesse imediato e mais promissores. Plantas micorrizadas têm seus requerimentos nutricionais reduzidos à metade ou até a 1/10 quando comparadas com aquelas não micorrizadas (Siqueira & Franco, 1988). Estes efeitos são mais acentuados para nutrientes que possuem baixa mobilidade no solo como P, Zn e Cu para a maioria das plantas e N para as leguminosas. Neste caso, embora as micorrizas não possuam a habilidade de fixar N_2 atmosférico, elas

favorecem a nodulação e fixação biológica do N_2 , principalmente em condições sub-ótimas de P (Pacovsky, 1989). O favorecimento na absorção de nutrientes pelas raízes resulta principalmente do aumento da área de superfície das raízes micorrizadas, que podem conter até 1,5m de hifa em cada cm de raiz colonizada. As hifas se espalham no solo, e quando a difusão é limitante, podem representar aumentos de até 10 a 60 vezes na superfície e absorção do nutriente, respectivamente. Deste modo, a utilização dos nutrientes da solução do solo, mineralizado ou fornecido via fertilização, será aumentada e o requerimento de fertilizantes reduzido na mesma proporção (Silveira, 1992).

Os FMA têm uma significância chave nos sistemas solo-planta pois relacionam-se a processos importantes para a sustentabilidade em solos perturbados ou áreas naturais (Barea & Azcón-Aguillar, 1993). Bethlenfalvay & Linderman (1992) citam os FMA como mediadores da troca de nutrientes no sistema solo-planta. Segundo estes autores, o micélio de FMA é atuante em uma estreita inter-relação de causa e efeito na troca de nutrientes minerais, compostos de C, sinais entre a planta e a comunidade de microrganismos da rizosfera, sendo capazes de estabelecerem uma rede ligando os diferentes componentes do sistema solo planta. Portanto, o manejo dos FMA pode ser um caminho para se restabelecer a componente biológica do sistema solo-planta.

2.1 A micorrização e as populações de fungos MA nativas

Existem poucas informações sobre a biologia básica e a ecologia dos FMA. Embora já em 1963 tenham sido citados como abundantes fungos de solo (Gerdemann & Nicolson, 1963), seu ciclo de vida completo permanece pouco entendido, principalmente pela dificuldade técnica de serem estudados. Estes fungos são simbiotes obrigatórios e portanto não se multiplicam na ausência de raízes vivas. Seu cultivo em meios artificiais até hoje não foi conseguido. Para crescer na raiz, no solo e se reproduzia, os FMA precisam estar em simbiose e receberem da planta os fotossintatos e fatores de crescimento de que necessitam (Silveira, 1992).

Os esporos são estruturas de multiplicação e disseminação dos fungos e têm grande capacidade de sobrevivência mesmo em condições extremas de estresse (Abbott & Robson, 1991). Após prolongados períodos de estresse ou dispersão para um novo

habitat, germinam no solo, **emitindo** uma ou mais **hifas que**, sob condições ambientais **adequadas**, podem *se* expandir, se alongar e aderir às raízes. Após a adesão, a hifa penetra intercelularmente nas **raízes**, dando início à **colonização**, formando **vesículas** intra ou intercelularmente *e* **arbúsculos** intracelularmente. A seqüência de eventos: extensão linear da **hifa**, desenvolvimento dos **arbúsculos**, **senescência** e **formação de vesículas** são UM **processo** constante e diretamente ligado a taxa de crescimento das raízes e ao estágio **fisiológico** das **plantas** (Allen, 1992). A rede de hifas ou micélio *se* expande dentro e fora **das** raízes, mas seu desenvolvimento é regulado **pela interação** fungo-hospedeiro e pelo ambiente. Desequilíbrios **nesta** relação, ocasionados **por** fatores **bióticos** (doenças **nas** plantas, **hiperparasitismo de FMA**) ou **abióticos** (fertilização ou **preparo de solo**) podem **afetar** a colonização **radicular**, reduzindo-a *e* diminuindo o efeito da micorrização, **ou** aumentando-a e acentuando o **dreno** de fotossintatos **que** pode limitar a produção de **biomassa** pela **planta** (Siqueira & Franco, 1988).

Ao mesmo tempo que o fungo *se* estabelece e *se* desenvolve **nas** raízes, ele produz **extenso micélio extraradicular que se** ramifica e cresce através do **solo**, podendo chegar a distâncias médias de até 10 cm, embora **valeres** de 100cm (Sieverding, 1991) e até metros (Varma, 1995) tenham sido relatados. **Através** do micélio **externo**, o contato **das** raízes **com** o solo circundante é consideravelmente aumentado. *e* o volume de solo **explorado** pelas raízes **micorrizadas pode** aumentar de **5 a 200 vezes**, dependendo da compatibilidade entre **os simbios** e as condições edáficas. A rede de **hifas que os FMA** formam na solo **podem** conectar diferentes **plantas** e transferir nutrientes entre **elas**, permitindo assim **que** espécies pouco competitivas **possam** coexistir (Newman, 1988). **Esta** hipótese levanta **novos questionamentos sobre o papel dos FMA e** sua importância na sustentabilidade dos ecoagrossistemas. **As hifas externas e** fragmentos de raízes colonizadas podem **também** atuar **como** propágulos de **FMA e** serem tão infectivos **quanto** os esporos (Ingleby et al., 1997). Segundo Tommerup & Abbott (1981), **fragmentos de** hifas podem permanecer viáveis no solo **por** até seis meses, inclusive em solos ressecados. **Grandes** variações na distribuição de **hifas** também podem ocorrer devido **aos** fatores do *solo* (Abbott & Robson, 1985), o **que** geralmente é atribuído a questões adaptativas da espécie frente às condições edáficas a que é

submetida (Abbott & Robson, 1984). A falta de informações sobre o micélio externo geralmente é atribuída à dificuldade de determinar a colonização do solo (Graham et al., 1982; Abbott et al., 1984) e os resultados encontrados são muitas vezes controversos, devido aos diversos métodos empregados na sua avaliação (Graham et al., 1982; Pacovsky & Bethlenfalvay, 1982).

Os esporos são produzidos após a colonização radicular, dentro e/ou fora das raízes, na região da rizosfera. O conhecimento sobre sua dinâmica de formação é limitado. Estudos sugerem que são principalmente distribuídos nas raízes próximas à superfície do solo, onde há maior concentração de desenvolvimento radicular, maior concentração de nutrientes lábeis e também maior atividade de matéria orgânica (Abbott & Robson, 1991; Ingleby et al., 1997). A esporulação no solo é extremamente variada, dependendo da espécie fúngica e do ecossistema.

A maior parte das estruturas de propagação fúngica ocorre entre a profundidade de 20cm e a superfície do solo, diminuindo com a profundidade (Abbott & Robson, 1991). Os esporos podem ser transportados para partes mais profundas do solo pela água, ou serem carregados por pequenos animais do solo (ex: artrópodes), porém, em profundidades entre 50 a 60 cm, o número de esporos é pequeno (Sieverding, 1991). Esta distribuição de propágulos (esporos e hifas) no perfil do solo relaciona-se principalmente com o desenvolvimento do sistema radicular das plantas e com a oxigenação do ambiente edáfico. Em maiores profundidades, a concentração radicular e de oxigênio diminuem, diminuindo a ocorrência de micorrização. Segundo Janos (1995), isto é particularmente importante para solos argilosos tropicais, onde a micorrização tende a se desenvolver mais em superfície. A remoção ou perda da superfície do solo, causada pelo cultivo excessivo ou pelo preparo inadequado, diminuem o inóculo do solo por atuarem negativamente sobre os propágulos na superfície (Sieverding, 1991). Cuenca & Lovera (1992) estudaram os efeitos da escavação e limpeza do solo para a construção de estradas na Venezuela e observaram que dois anos após a limpeza, os solos perturbados tinham 3 esporos de FMA em 100g de solo contra aproximadamente 200 esporos em 100g de solo, observados na área ao lado, não perturbada. Os autores

concluíram que a retirada dos propágulos retardou o estabelecimento de plantas nativas altamente dependentes da micorrização.

A retirada da cobertura vegetal e preparo do solo para plantio implica na desagregação do solo, exposição à luz solar e elevação de temperatura na sua superfície. Isto pode acarretar a fragmentação da rede de hifas e a exposição de hifas e esporos. Além disso, o preparo do solo ocasiona mudanças profundas no sistema edáfico, tais como mudanças no conteúdo de matéria orgânica, estrutura do solo, aeração, porosidade e percolação de água, que indiretamente atuam sobre as micorrizas (Janos, 1995). Entretanto, devido ao grande número de relações envolvidas, é difícil precisar o exato impacto destes fatores sobre o potencial de inóculo do solo, principalmente em situações de campo. Por exemplo, Sieverding (1991) sugere que o corte e as queimadas na agricultura têm poucos efeitos negativos sobre os propágulos de FMA, porque as altas temperaturas que atingem a superfície do solo não são suficientes para inviabilizá-los. Janos (1995) cita que a fertilização do solo pelas cinzas das queimadas pode aumentar a disponibilidade de nutrientes, o que atua negativamente sobre a colonização das espécies facultativas e reduz o inóculo do solo.

Os FMA não apresentam especificidade de hospedeiro (Mosse, 1975), entretanto a resposta do hospedeiro difere com a espécie fúngica (Siqueira et al., 1986) e com isolados geográficos dentro da espécie (Bethlenfalvay et al., 1989). O sistema radicular pode ser colonizado simultaneamente por mais de uma espécie fúngica e o sucesso na ocupação depende da relação fungo-hospedeiro. Alguns FMA são mais agressivos em colonizar determinadas plantas, mas nem sempre são os melhores mutualistas quando comparados com fungos menos efetivos (Hetrick & Wilson, 1991).

Sinais químicos trocados entre planta e fungo podem atuar como um gatilho para o reconhecimento e para iniciar a colonização das raízes pelas hifas (Piché et al., 1994). Flavonóides e outros compostos fenólicos podem estar envolvidos na comunicação fungo-hospedeiro (Giovannetti et al., 1993 e 1996). Giovannetti et al. (1994) demonstraram que as hifas de *Glomus mosseae* foram capazes de discriminar seus hospedeiros dentre todas as outras espécies de plantas não hospedeiras ou hospedeiras de outros tipos de fungos, através do processo de reconhecimento dirigido pela percepção

dos sinais químicos derivados somente dos hospedeiros de FMA. Segundo Graham & Eissenstat (1994), **devido** à falta de especificidade, os genes para a compatibilidade **presumivelmente são homólogos entre os** genótipos da planta e da fungo, estando envolvidos na reconhecimento planta-fungo, infecção fúngica e reação da planta e, principalmente, **na morfologia e na função** da associação micorrízica para a troca de carboidratos.

McGonigle & Fitter (1990) coletaram mostras de raízes de arbustos e gramíneas que cresceram misturados, com o objetivo de distinguir a colonização de *Glomus tenue* dos outros fungos MA indígenas e observaram que, a gramínea *Holcus lanatus* foi predominantemente colonizada por *G.tenue*, enquanto que outras três espécies de plantas foram colonizadas principalmente por outras espécies de FMA, que não *G.tenue*. Os autores concluíram que os FMA no campo podem exibir certo grau de especificidade ecológica e que não existe especificidade absoluta entre as espécies de FMA e a planta hospedeira. Trufem (1990) e Trufem et al. (1994) investigaram a ocorrência de FMA na rizosfera de várias plantas em matas nativas e no litoral arenoso do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP. e observaram preferências acentuadas entre os fungos MA e determinados hospedeiros, sugerindo também especificidade ecológica. McGonigle & Fitter (1990) mostram resultados semelhantes e observam que, em situações de campo. o hospedeiro pode ser colonizado preferencialmente por um ou mais FMA.

Sieverding (1991) observou alta frequência de ocorrência de *Sclerocystis coremioides* em *Desmodium* sp. e cita que este FMA somente se reproduz em *Desmodium*. O mesmo autor também cita que uma espécie de *Glomus* não identificada somente se multiplica no hospedeiro do qual foi isolado, mas não em leguminosas originárias do mesmo local, Segundo Sieverding (1991), a associação preferencial ocorre quando a planta e/ou as condições do ambiente são ótimas para uma ou poucas espécies da comunidade de fungos, que serão beneficiados com o aumento na capacidade competitiva da associação, conduzindo a mudanças na composição quantitativa da comunidade dos FMA. As espécies de FMA associadas preferencialmente, adquirem mais fotoassimilados do hospedeiro do que as outras, aumentando sua dominância no solo. Sanders et al. (1995) sugeriram que a colonização

do hospedeiro por uma espécie de FMA que se desenvolve rapidamente no interior da raiz e posteriormente explora **grande volume** de solo **para absorção de P** disponível. será **benéfica** para a planta e, portanto, poderá ser preferencialmente selecionada **pele** hospedeiro. No entanto, Abbott & Gazey (1994) alertam para o fato de que a abundância de esporos de um **certo** FMA no solo **pode não** indicar a quantidade de **raízes colonizadas por** este fungo.

A substituição da **vegetação nativa por** plantas de interesse **agronômico** pode **exercer** pressão seletiva nas **populações** de FMA (Read, 1991). Johnson et al. (1992), observaram **pressão de seleção de monoculturas** de milho e soja **sobre** populações de FMA. Segundo os autores, a mudança na **população** pode ser devido a preferência seletiva destas **plantas por alguns** membros da comunidade de FMA. Estes **autores demonstraram** também **que as** espécies **que predominaram** nestas culturas foram negativamente relacionadas **com** a produção. Johnson & Pfleger (1992) afirmaram **que não existe** motivo **para esperar que**, dentro de **um** sistema, espécies dominantes de FMA sejam os mutualistas mais benéficos, **porque a** monocultura pode **selecionar espécies** de FMA que são mutualistas menos eficientes e **estes** fungos podem estar envolvidos no declínio da produção. Sieverding (1991) **sugeriu que os fungos não eficientes** são capazes de drenar **carboidratos do** hospedeiro em quantidade suficiente **para** aumentar o número de **propágulos no solo**.

Johnson et al. (1992) acreditam **que pode** existir entre os simbiossomas **um** mecanismo de resposta positiva ou negativa, **que influencia a estrutura da** comunidade de plantas e dos FMA. Este mecanismo **será positivo e** estabilizará a comunidade de plantas, **se as espécies de FMA que proliferarem** no interior do **hospedeiro** forem mutualistas benéficos. O mecanismo será negativo e **desestabilizará** a comunidade de plantas **se ocorrer a** proliferação de fungos que **apresentam** comportamento parasita. Como consequência, espécies de FMA **ineficientes podem** aumentar em abundância, sendo **desfavorável para as plantas hospedeiras** (Johnson et al., 1992). A ineficiência é resultado do **custo de C para o** hospedeiro colonizado **que excede o benefício** obtido com a colonização. Assim, os efeitos da **associação** serão negativos (Cooperbrand et al., 1994; Janos, 1995).

O desenvolvimento **das hifas nas raízes dos hospedeiros e a disponibilidade dos açúcares solúveis no seu exsudato significam um mecanismo para o controle das populações de FMA** (Schwab et al., 1984). Foi sugerido por **Johnson et al. (1992b)** que **este mecanismo pode envolver adaptações das plantas para exercerem controle sobre as populações de FMA e que podem selecionar os melhores mutualistas**. Por **outro lado**, plantas e fungos podem estar engajados em **uma corrida evolutiva**: quando a fertilidade do solo for alta, as plantas **podem** alocar menos carbono para os exsudatos da raiz e talvez selecionar FMA que requeiram menos carboidratos.

Os FMA podem ser favorecidos **na seleção pelo hospedeiro se possuem capacidade para colonizar rapidamente as plantas, induzindo grandes e positivas respostas de crescimento e reprodução** (Sanders et al., 1995). Por **outro lado**, plantas hospedeiras podem **desenvolver mecanismos de resistência para excluir colonizações por espécies de FMA não eficientes, que causem significativos custos para o hospedeiro**.

A formação da associação micorrízica e seu benefício é muito variável entre as **espécies de planta porque elas exibem diferentes graus de dependência micorrízica**. Segundo Gerdemann (1975), dependência micorrízica é o **grau de dependência da planta ao fungo para um desenvolvimento normal, a um determinado nível de fertilidade do solo**. Dentro deste conceito, segunda **Siqueira & Franco (1988)** as plantas podem ser **agrupadas em** 1) micotróficas obrigatórias: **quando dependem da simbiose para absorção de nutrientes do solo e sobrevivência, exibindo altas taxas de colonização, sendo beneficiadas pela simbiose independentemente da concentração de P disponível no solo;** 2) micotróficas facultativas: **quando podem crescer na ausência do simbiote, sendo que apresentam baixas taxas de colonização radicular e somente se beneficiam da simbiose em solo com baixa concentração de P;** 3) não micotróficas: **quando não dependem e não se beneficiam da micorrização e, geralmente, não apresentam colonização**.

As espécies micotróficas obrigatórias não podem sobreviver e atingir a maturidade reprodutiva na ausência de micorrizas, no mesmo nível de fertilidade encontrado em seu habitat natural. Estas espécies somente crescem **sem micorrizas** quando intensamente fertilizadas. Segundo Janos (1995), algumas **borres tropicais** são incapazes **de crescerem sem micorrizas sob qualquer regime mineral**. Plantas

micotróficas facultativas podem atingir a maturidade reprodutiva **na ausência** dos FMA em solos férteis. **mas por outro** lado podem apresentar abundante colonização em solos de baixa fertilidade (Janos, 1980).

No solo, as plantas podem ser funcionalmente **interconectadas** através de micélio de fungos MA (Newman, 1988; Sanders et al., 1995). Segundo o mesmo autor, **estas conexões** servem para exportar fotoassimilados entre as espécies, seduzindo situações desfavoráveis **ao** desenvolvimento, possibilitando sua **coexistência e maior** diversidade florística. Segundo Miller (1987), a intensidade de ocorrência destas **conexões** entre plantas **no campo** deve ser muito freqüente, **visto que**, em **algumas espécies de plantas**, mais de 80 cm de hifas do fungo por centímetro de raiz infectada foi observado. **A** conexão entre **plantas** via hifas **dos FMA**, a níveis intra e interespecíficos, sugere **que** o entendimento dos efeitos entre plantas vizinhas abaixo **do** solo pode ser necessário para **explicar** efeitos **que** ocorrem acima.

Atualmente são conhecidas aproximadamente 150 espécies de FMA, **distribuídas** em seis **gêneros que são: *Acaulospora, Entrophospora, Gigaspora, Glomus, Sclerocystis e Scutellospora*** (Morton & Beny, 1990). **As populações de FMA** nativas variam na **composição de espécies, porque** sua ocorrência é determinada pela vegetação e pelo ambiente (Johnson et al., 1992). A diversidade biológica **das populações nativas** de FMA em ecossistemas **não alterados** varia **em** torno de aproximadamente **25** espécies. Em agrossistemas a diversidade **diminui**, variando **de 5 a 15** espécies (Sieverding, 1991). A menor diversidade observada quando sistemas naturais **são** cultivados é atribuída a diminuição na diversidade de **plantas** (Siqueira et al., 1989; Sieverding, 1991). **Ecossistemas naturais** mantêm **uma vegetação variada que diminui** muito em agrossistemas **intensivamente** manejados. Monoculturas, por exemplo, mantêm **apenas** uma espécie **vegetal** por **área, com** eventuais invasoras **não** controladas, **apresentando** menor diversidade de FMA.

Os FMA também apresentam **padrões** de ocorrência diferenciados. Segundo Trufem & Bononi (1985), **existem espécies que** ocorrem **na** maioria dos hospedeiros durante **todo** o ano; outras **que** ocorrem em grande **densidade no solo mas são restritas a** certos **hospedeiros e épocas do ano**; espécies de **baixa** densidade populacional **mas sem**

restrições de hospedeiros ou épocas do ano e ainda **espécies** com **baixa** densidade populacional e hospedeiros restritos. **além de ocorrência** restrita **a** algumas **épocas** do ano.

As populações nativas, de uma maneira geral, refletem **as grandes** variações na ocorrência, efetividade e agressividade **que** caracterizam **cada um** dos FMA que **as** compõem e portanto apresentam variações na **sua** eficiência simbiótica (Paula et al., 1988). Devido **a** essas variações, **em** situações de campo, é **desejável** a **manutenção** ou **obtenção** de **uma população** de FMA diversificada, **para que se** aumentem **as** chances de **que** combinações eficientes **entre fungo e hospedeiro** possam ocorrer **naquele** ambiente. Entretanto, simplesmente **a** grande diversidade de **espécies** **não** garante a eficiência dos FMA. Sieverding, (1991) observa que **menor** diversidade **pode** resultar **em** eficiência simbiótica maior, desde **que** **as** espécies sejam mutualistas eficientes **e** tenham **elevada** capacidade competitiva **na** rizosfera.

No estudo do manejo das **populações** de FMA nativas, a caracterização das **espécies** e sua **dinâmica** de **ocorrência** **são** tão importantes **quanto** a **determinação** do potencial de inóculo e a colonização radicular, **para** o entendimento de seu comportamento no solo **e** a **determinação** da **sua** eficiência simbiótica (Bethlenfalvay & Linderman, 1992).

A identificação **dos** FMA dentro do tecido do hospedeiro é extremamente importante **para** estudos ecológicos e de **determinação** de eficiência simbiótica de fungos em comunidade, entretanto, é difícil e **nenhum** método de identificação morfológica foi satisfatoriamente desenvolvido (Miller et al., 1994). Segundo Abbott & Gazey (1994), a **morfologia** dos FMA dentro da raiz **pode** sofrer mudanças dependendo do hospedeiro, da idade das raízes, da disponibilidade de P e do habitat. **o** **que** **dificulta** ainda mais a identificação, baseando-se na **morfologia** das hifas **e** estruturas produzidas (células auxiliares, vesículas, etc). **Por** isso, **o** desenvolvimento ou adaptação de métodos baseados no DNA podem contribuir para a identificação de **fungos** MA internamente às raízes.

A maneira mais frequente de se estudarem **as** populações de FMA tem sido a **determinação** quantitativa (contagem direta) e qualitativa (identificação) dos esporos

extraídos do solo. Os métodos para determinações quantitativas foram recentemente compilados por Colozzi Filho & Balota (1994). Entretanto, o potencial de inóculo natural que é a capacidade dos FMA nativos infectarem e colonizarem as raízes, nem sempre é explicado pelo número total de esporos no solo, devido principalmente a outras fontes de inóculo como micélio fúngico e fragmentos de raízes colonizadas (Abbott & Robson, 1991). A presença e/ou abundância de determinados esporos de FMA no solo são indicativos de que esta espécie é ativa no sistema, capaz de colonizar e se multiplicar nas raízes da planta hospedeira, entretanto, para uma avaliação mais precisa da infectividade e eficiência da população de FMA nativa, é necessário considerar outros parâmetros além de esporulação no solo e colonização radicular, tais como o comprimento de hifas no solo e o potencial infectivo avaliado através de bio-ensaios (Sieverding, 1991).

Portanto, a presença de cada espécie nas populações de FMA nativos é resultado de suas interações com o solo, com a planta hospedeira, com outros FMA e a biota em geral e pode influir no potencial de infectividade natural do solo, na colonização radicular e na eficiência simbiótica. No estudo do manejo das populações de FMA nativos os fatores de solo, planta e fungo, componentes do sistema micorrízico, precisam ser considerados.

2.2 Micorrizas no cafeeiro

As micorrizas são de ocorrência generalizada no cafeeiro, sendo observadas naturalmente desde a produção de mudas em viveiros (Cardoso, 1978), até em plantas adultas no campo (Lopes et al., 1983a). A simbiose micorrízica é particularmente importante para o cafeeiro porque estas plantas apresentam elevada dependência à micorrização na fase de mudas (Siqueira & Colozzi Filho, 1986) e no campo. a manutenção de uma população de fungos MA diversificada pode eliminar os efeitos negativos do monocultivo sobre a seleção de espécies (Johnson et al., 1992), que normalmente selecionam espécies mas adaptadas ao meio mas geralmente menos eficientes em promover os benefícios da micorrização. No campo, as espécies de FMA eficientes não são de ocorrência comum possivelmente por não se adaptarem às

condições edafoclimáticas (Lopes et al., 1983a). Entretanto, em cultivos de cafeeiro é naturalmente encontrada grande diversidade de espécies (Oliveira et al., 1990). Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), na rizosfera do cafeeiro já foram identificadas 45 espécies de Glomales, sendo 12 de *Acaulospora*, 17 de *Glomus*, 6 de *Scutellospora*, 4 de *Gigaspora*, 4 de *Sclerocystis* e duas de *Entrophospora*. Entretanto, a frequência de ocorrência é maior para espécies do gênero *Acaulospora*, seguido de *Glomus*. Segundo os autores, a menor frequência de ocorrência foi observada para espécies do gênero *Gigaspora*. Fernandes (1987) cita *A.scrobiculata*, *A.morrowiae* e *A.mellea* como as espécies dominantes em cafeeiros do Sul de Minas Gerais, com índice de ocorrência maior de 50%. Neste mesmo estudo os autores relatam a ocorrência de baixa densidade relativa de esporos de *Gi.margarita* e *G.etunicatum* nas populações de fungos nativos. Estas espécies, principalmente *Gi.margarita*, tem sido citadas como eficientes em aumentar o crescimento de mudas de cafeeiro (Colozzi Filho et al. 1985; Antunes et al., 1988). Balota & Lopes (1996a), estudando a persistência de *Gi.margarita* no solo após seis anos da inoculação e plantio das mudas inoculadas, observaram que esta espécie ainda se encontrava presente na área e influenciava a composição da população de fungos nativos. Segundo o autor, a competição por fotossintatos ou mesmo por espaço na raiz influencia a composição da comunidade de fungos nativos no solo. Além disso, espécies menos sensíveis a fatores edáficos supressivos, como acidez, metais tóxicos e hiperparasitas são favorecidas e podem predominar na rizosfera. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), é difícil correlacionar características gerais de solo com ocorrência de espécies, número de esporos e colonização micorrízica. Entretanto, os autores citam a existência de tendências como o favorecimento sobre a ocorrência de *A.morrowiae* e *E.colombiana* e o efeito negativo sobre *A.scrobiculata* causado pela elevação na matéria orgânica do solo. Em relação ao pH, os autores citam maior ocorrência de *A.morrowiae*, *A.mellea* e *E.colombiana* em pH baixo e *A.scrobiculata* e *G.etunicatum* em pH mais elevado.

A esporulação no solo também é bastante variada e depende do fungo, da planta, de fatores de solo e da sazonalidade. Balota & Lopes (1996a), estudando a micorrização

em cafeeiros **adultos em São** Paulo, observaram efeito **significativo** positivo da adubação fosfatada com **fosfato** natural sobre a esporulação dos fungos nativos **no solo**. Os **autores atribuem este** efeito ao **melhor** aproveitamento do **fosfato** natural pelo fungo para a produção de **esporos**. Neste mesmo estudo observou-se **esporulação** crescente a partir de **março**, atingindo **o máximo** em outubro, **sendo este** efeito associado a variações na temperatura e precipitação **pluvial** (Balota & Lopes, 1996b). **Além** de fatores de solo e planta, a esporulação no solo pode ser **afetada** negativamente pela **presença** de predadores de esporos **que** crescem na **rizosfera** (Ross & Daniel, 1982) mas **não** existem **dados** observados especificamente no cafeeiro **a campo**.

Em cafeeiros adultos, em condições de **campo**, a colonização micorrízica apresenta **valores bastante** variados. Nos **diversos trabalhos que** citam **dados** de colonização **a campo** podem ser **observados valores que** variam de 4%, conforme Lopes et al. (1983a) a até valores próximos **de** 80%, **conforme relatado** por Oliveira (1988). É evidente **que** uma das **causas** de variações tão grandes é inerente às condições **de obtenção** dos dados, que são diferentes. Entretanto, **até no** mesmo experimento, Saggin Júnior & Siqueira (1996) citam que **em** situações de campo é difícil correlacionar **fatores** edáficos com **colonização** radicular **porque** existe um grande número de complexas interações envolvidas. Entretanto, **algumas** tendências **são** observadas como, por **exemplo, aquelas** citadas por Fernandes & Siqueira, (1989) **que** relatam que a adubação fosfatada do cafeeiro **pode** causar uma **redução** na **colonização a campo** ou exercer nenhuma **influência**, dependendo da **quantidade de P** utilizada, **frequência** de aplicação e **nível original de P** no solo. Calagem, idade da lavoura, **variação sazonal e local também** **influenciam** a **colonização**. Segundo Siqueira et al. (1990) a **calagem favorece a colonização** por **eliminar** fatores fungistáticos que **atuam** sobre a germinação de **esporos** no solo, **além de atuar** sobre a composição das **populações** de fungos MA. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996) a idade da lavoura **pode** afetar positiva ou negativamente a **colonização** radicular, estando **este** efeito associado à **sustentabilidade** da lavoura. Os autores comentam dados de colonização observados **em lavouras** adultas na Colômbia e em São Paulo. Na Colômbia, o cafeeiro **adulto** apresentou **colonização**

maior, podendo tal fato estar relacionado ao sombreamento das lavouras. Este manejo estaria favorecendo a colonização das plantas por fungos MA e promovendo maior sustentabilidade do agrossistema cafeeiro em relação ao cultivo convencional praticado em São Paulo.

As relações da colonização micorrízica a campo com as características edáficas são de difícil interpretação, mas a comparação de dados de diversos experimentos de campo mostra que ela está mais relacionada às diferenças na composição de espécies e na quantidade de fungos nativos do que nas características de solo (Saggin Júnior & Siqueira, 1996). Portanto, o entendimento destas relações a campo depende de estudos específicos que envolvam o conhecimento das espécies nativas, sua frequência de ocorrência e principalmente suas relações com o hospedeiro, dentro do próprio ambiente natural de cultivo e o manejo praticado na condução da lavoura.

2.3 As práticas de cultivo e a micorrização

As práticas de cultivo, além dos efeitos diretos sobre o solo, podem também alterar as populações microbianas e também os fungos micorrízicos. Harinikumar & Bagyaraj (1988) observaram redução de 40% no número de propágulos de FMA em solos que ficaram uma estação sem cultivo e mostraram que a mostarda, espécie não micotrófica, reduziu significativamente o potencial de inóculo do solo. Os autores sugeriram que a reconstituição do potencial de inóculo para os níveis da cultura anterior à mostarda demoraria pelo menos dois cultivos, utilizando hospedeiros micotróficos.

Os benefícios da rotação para a produtividade das culturas são reconhecidos e têm sido bastante estudados. Entretanto, as razões exatas para os aumentos de produção não têm sido estabelecidas. Respostas variáveis para fertilização indicam que fatores ainda não determinados atuam no sistema. Micorrizas podem ser parte destes fatores e estarem envolvidas nos efeitos das rotações sobre a produtividade das culturas.

Em sistemas agrícolas sustentáveis, a escolha do sistema de rotação e das culturas a serem rotacionadas deve considerar seus efeitos sobre as populações de FMA nativas, com o objetivo de manejá-las obtendo assim maiores efeitos da micorrização (Bethlenfalvai & Linderman, 1992). Rotações de culturas influenciam as populações de

FMA nativas e a infectividade natural do solo (Johnson et al., 1992). Por exemplo, o uso em rotação de espécies vegetais não micorrízicas pode diminuir a infectividade do solo e atuar negativamente sobre a micorrização dos cultivos seguintes (Black & Tinker, 1979). Períodos prolongados de pousio também podem diminuir a infectividade natural do solo. O cultivo de uma espécie não micorrízica, seguido de longo período de pousio, pode diminuir drasticamente o potencial infectivo natural do solo (Thompson, 1987). Portanto, a estratégia de escolha do tipo de rotação deve também ser direcionada para o manejo das populações de FMA nativos, considerando sempre a possibilidade de aumentar ou no mínimo manter a diversidade de FMA no agrossistema.

Efeitos estimulatórios de rotações no aumento da colonização ou produção de esporos têm sido relatados em diversas seqüências de cultivos. Por exemplo, Sieverding (1991) observou maior colonização de mandioca (*Manihot esculenta*) quando cultivada em rotação com amendoim cavalo (*Arachis hypogaeae*) do que quando em monocultura. Baltruschat & Dehne (1989) mostraram que o potencial de inóculo de FMA em solo sob quatro anos de rotação foi consideravelmente aumentado se comparado com o do solo sob monocultura de milho. O efeito estimulatório de gramíneas sobre a esporulação de alguns FMA tem sido relacionado a seu agressivo sistema radicular, entretanto, relações mais aprofundadas sobre a natureza deste estímulo e a composição da população de FMA estimulada têm sido pouco estudadas. Neste mesmo trabalho, observou-se menor diversidade de espécies de FMA nas rotações em que se cultivou milho.

Os cultivos podem selecionar espécies de FMA e modificar a composição de suas populações nativas (Trufem & Bononi, 1985; Johnson et al., 1992). A alternância no cultivo de espécies vegetais diferentes pode ser importante para a manutenção do equilíbrio biológico do solo, evitando, assim, a seleção de espécies microbianas promovida pelo monocultivo, ou cultivo sucessivo de plantas da mesma espécie.

Diversos trabalhos mostram que rotações de culturas atuam positivamente não somente sobre a micorrização, através do aumento no potencial de inóculo natural do solo, mas também sobre a diversidade de espécies de FMA (Johnson et al., 1991; Gomes-da-Costa, 1993). Gomes-da-Costa (1993), estudando soja e milho cultivados em monoculturas ou rotação observou mudanças quantitativas e qualitativas na comunidade

de FMA relacionadas às plantas hospedeiras, aos sistemas de cultivo e à ocorrência de associações preferenciais. O maior número de esporos no solo foi observado em monocultura de milho em todas as épocas avaliadas. *Scutellospora coralloides*, *S. calospora* e *S. heterogama* foram observadas apenas na rizosfera de milho em monocultura, sendo eliminadas do solo quando a soja foi cultivada em rotação. *Gigaspora ramisporophora*, posteriormente reconfirmada como *Gigaspora margarita* (Gomes-da-Costa, comunicação pessoal), mostrou preferência pela soja cultivada em monocultura. *Acaulospora longula* não apresentou especificidade de hospedeiro, não sendo afetada pelo manejo. Entretanto, *A. mellea* multiplicou-se melhor em culturas de soja e a rotação permitiu sua melhor multiplicação em milho, num claro efeito da cultura antecessora. Portanto, estes dados mostram a complexidade e a importância das associações preferenciais entre FMA e seu hospedeiro e como o manejo pode influir na sua ocorrência. Estudos de Johnson et al. (1992) mostraram que as monoculturas, além de modificar a população de FMA nativos, podem selecionar fungos que não são bons mutualistas, diminuindo a eficiência das populações nativas. Este efeito pode ser minimizado pela rotação de culturas. A mudança na composição das populações de FMA nativas e na sua eficiência, ocasionada pelo cultivo contínuo, pode estar relacionada com o declínio na produção de monoculturas, conforme sugerido por Schenck & Siqueira (1987) e mais tarde por Johnson et al. (1992).

O cultivo intercalar é uma prática de manejo que também pode alterar as populações de fungos MA nativos. Por cultivo intercalar entende-se o cultivo de uma espécie vegetal secundária, realizado simultaneamente entre a cultura principal, com objetivos de cobertura do solo, controle de pragas ou mesmo adubação verde. Pode ser orientado (nas entrelinhas de plantio para culturas anuais ou perenes) ou disperso, no caso de pastagens.

O estabelecimento das culturas secundárias provoca modificações no ambiente de cultivo e no solo, sendo capazes de alterar o crescimento das plantas e a produtividade das culturas (Johnson & Pflieger, 1992). As modificações no solo podem ser alterações químicas (variações de pH e disponibilidade de nutrientes) promovidas pelo maior aporte de matéria orgânica e pela exsudação radicular, modificações na

concentração de CO_2 e na capacidade de retenção de água do solo promovidas pela penetração das raízes e modificações na comunidade microbiana, tais como proliferação de bactérias fixadoras de N_2 e alterações no potencial de inóculo natural e nas populações de FMA nativas (Hungria et al., 1994).

O cultivo intercalar de leguminosas entre culturas perenes para fins de adubação verde é bastante utilizado, devido à capacidade destas plantas de se associarem com bactérias e fixarem nitrogênio biologicamente. A eficiência da fixação biológica de nitrogênio nas leguminosas está associada à disponibilidade de P no solo e à absorção de P pelas plantas relacionadas à micorrização. A maioria das leguminosas é colonizada por FMA e por isso desenvolve-se bem e nodula em solos com baixos teores de P (Cardoso, 1985; Herrera et al., 1984). Portanto, as leguminosas são hospedeiros efetivos de FMA e podem atuar sobre sua diversidade e potencial de inóculo natural no solo.

Johnson & Pfleger (1992) aumentaram a densidade de FMA e o crescimento de mudas de árvores para produção de madeira cultivando milho (*Pennisetum americanum*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) nas entrelinhas. Thomas (1988) aumentou o status micorrízico e diminuiu a incidência de podridão radicular em coqueiros, através do cultivo intercalar múltiplo de *Pueraria phaseoloides*, *Mimosa invisa* e *Calopogonium muconoides* na área. Existe ainda a possibilidade de que o cultivo intercalar promova a conexão de plantas via micélio extrarradicular de fungos MA, estabelecendo um fluxo de nutrientes entre as plantas (Graves et al., 1997). Este fluxo é de particular interesse nas associações de cultivos que envolvem leguminosas porque podem fornecer N fixado biologicamente para não leguminosas. Entretanto, esta possibilidade precisa ser analisada com cuidado, porque o fluxo de nutrientes entre plantas via micélio de FMA tem sido citado como insuficiente para afetar o crescimento de plantas (Newman, 1988). Do mesmo modo que pode aumentar o potencial de inóculo natural e a diversidade de FMA, o cultivo intercalar com plantas não micorrízicas pode diminuí-lo. Baltruschat & Dehne (1989) observaram redução no potencial de inóculo natural de solo após o cultivo intercalar de cevada (*Hordeum sativum*) com colza (*Brassica napus*), uma planta não micorrízica.

Apesar de aumentos no potencial de **inóculo** natural, respostas **na produção** de uma ou outra das plantas associadas **em plantio** intercalar provavelmente dependa da **composição da comunidade de FMA nativos** e da presença de **pelo menos uma espécie** de FMA dominante, efetiva e eficiente **para uma** ou ambas as plantas associadas.

Os FMA não apresentam especificidade nas relações fungo-hospedeiro, sendo **que uma única espécie de fungo pode** colonizar e **se** multiplicar em **vários** hospedeiros (Mosse, 1975). Atráves de **um cultivo** anterior **com** planta altamente micorrízica, é **possível** aumentar a diversidade de espécies de FMA e o potencial de inóculo natural da solo, **antes** da cultura **definitiva** ser instalada. **Esta técnica de manejo** possibilita a **recuperação** de **áreas** degradadas ou submetidas a longos períodos de monocultivo que resultaram em diminuição **na** diversidade e **na** atividade **dos FMA** e das **populações** microbianas em geral (Dodd et al., 1990a).

Existem poucos **relatas** na literatura **que** demonstram este efeito em condições de **campo**. Dodd et al (1990 a e b), trabalhando com savanas nativas **nunca** cultivadas, observaram **que** o **pré-cultivo** com mandioca, kudzu ou sorgo **aumentou** significativamente a infecção micorrízica e a **produção** de feijão e estilosantes (*Stylosanthes capitata*). A **inoculação** prévia do solo, realizada antes do **pré-cultivo**, também teve efeito **positivo** sobre o crescimento das plantas **cultivadas em pré-cultivo** (Dodd et al., 1990a). Souza et al. (1994) também observaram aumento da número de propágulos infectivos de **fungos** nativos em solo cultivado **com** sorgo. Leguminosas como feijão de **porco**, mucuna **preta** e **guardú** também aumentaram o número de **esporos** no solo, mas **não** o suficiente **pasa se** observarem diferenças estatísticas da **testemunha**. Espindola et al. (1994) relatam que, embora **não** tenha sido observada maior esporulação no solo **após** o **cultivo** de mucuna **preta** e crotalária, estas plantas apresentaram o maior **índice** de colonização radicular e promoveram o aumento na taxa de colonização da batata doce, cultivada na seqüência. A **produção** de **tubérculos** também foi aumentada com o **pré-cultivo** da mucuna, quando comparada à **vegetação** expontânea e a ausência de **vegetação**. Gomes-da-Costa & Oliveira, (1996) também observaram maior **peso** de matéria **seca** de raízes e parte **aérea** de soja, **cultivada** em solos submetidos a dois **ciclos** de revegetação com gramíneas nativas. O manejo empregado (dois ciclos de revegetação

pos 90 dias e corte) aumentou o potencial de inóculo de FMA do solo, e as espécies utilizadas no manejo (mucuna preta e gramíneas nativas) atuaram de forma diferenciada sobre as populações de FMA.

Estes resultados evidenciam a importância do manejo sobre a micorrização e indicam que o cultivo de plantas altamente micotróficas em áreas degradadas ou solos com baixo potencial de produção pode facilitar sua integração no processo produtivo, através da aumento no potencial de inóculo natural de FMA do solo e na diversidade de espécies, contribuindo para a sustentabilidade dos agrossistemas.

2.4 Técnicas moleculares e a identificação dos fungos MA

Em situações de campo, avaliações das populações requerem a identificação acurada de espécies e a quantificação de densidades de propágulos e infectividade. Até o presente, bioensaios de vários tipos são usados para avaliar a infectividade do solo. Estes bioensaios têm a vantagem de incluir todos os propágulos do solo, mas dão somente uma limitada informação sobre a composição das espécies. O isolamento de esporos através de plantas hospedeiras em vasos de cultivo é o principal meio para determinar as espécies presentes, mas este método não mostra as espécies que estão realmente ativas, colonizando as plantas. Agora, estas limitações estão sendo eliminadas por novos métodos que estão sendo desenvolvidos. Estes métodos incluem anticorpos específicos, provas de DNA e PCR (Polimerase chain reaction) usando primers específicos, que podem auxiliar na identificação de espécies no solo a partir de um único esporo ou mesmo permitir sua identificação internamente nas raízes.

A caracterização genética dos organismos requer a presença de marcadores moleculares precisos e facilmente detectáveis. Os marcadores morfológicos, apesar de serem úteis em estudos de laboratório, são raros e pouco observados em populações naturais de fungos, apresentando limitado número de alelos e possuindo freqüentes efeitos fenotípicos adversos. Nesse sentido, marcadores bioquímicos e moleculares têm sido desenvolvidos para auxiliar a caracterização e os estudos de fisiologia e ecologia de fungos.

As isoenzimas são variantes de **enzimas** específicas, atuam como marcadores codominantes. Entretanto, apresentam algumas desvantagens como a produção de poucas bandas por **enzima e a influência** da idade *e* do tipo de micélio utilizado na análise (Michelmore & Humbert, 1987).

Entre **os marcadores moleculares** mais utilizados **estão o RFLP** (polimorfismo de tamanho nos fragmentos de restrição), **mtDNA** (DNA mitocondrial), **rDNA** (DNA ribossomal), **PCR** (reação em cadeia da polimerase), o **RAPD** (polimorfismo pela amplificação aleatória do DNA) *e* o emprego destas técnicas associadas.

Nenhum **marcador ou** método isolado tem sido **citado como** ideal **para** identificar e classificar **os fungos MA**. Os pesquisadores têm utilizado métodos associados **que** mais se **aplicam a** suas linhas **de pesquisa, adaptando-os a** cada situação. Nesta **revisão** serão destacados somente aqueles marcadores **mais** utilizados atualmente **na** pesquisa com fungos **MA**.

2.4.1 DNA ribossômico (rDNA)

O **rDNA** tem **sido** extensivamente utilizado em estudos filogenéticos **de** fungos. Na maioria dos eucariotos, incluindo todos **os fungos** verdadeiras, **o rDNA** apresenta-se como um arranjo repetitivo em tandem das três maiores genes **que** codificam **para** os diferentes **tipos de rRNA, separados** por espaçadores transcritos ou **não** (Bruns et al., 1991). **As** regiões gênicas de **rDNA** são altamente conservadas, de forma que, sondas heterólogas **hibridizam-se** fortemente **a** elas. Já **os espaçadores**, particularmente o espaçador intergênico (IGS), podem variar na sua seqüência significativamente. **até** mesmo **ao nível** intraespecífico.

Um dos **principais** alvos **dos** estudos de variabilidade *e* biodiversidade em estudos genômicos são os genes **ribossômicos**. Estes genes multicópias são constituídos **de três** regiões codificadas de diferentes tamanhos (18S; 5.8S e 25-28S) separados por duas seqüências **não** traduzidas (ITS, **espaços** intragênicos transcritos). **As** regiões codificadas **têm** sido suficientemente conservadas durante a evolução *e* permitem o desenho de primers específicos para o gene ribossômico. **As** seqüências ITS, separando

a região 5,8S da 18S e 25-28S são variáveis e podem ser usadas para diferenciar espécies proximamente relacionadas (White et al., 1990).

Sondas podem ser construídas pela comparação entre os padrões de variabilidade intragênico e das regiões inter-gênicas. Sequências de rRNAs (ou rDNAs) de várias subunidades dos ribossomos são regiões extensivamente investigadas para análises filogenéticas e desenvolvimento de sondas. Os genes são úteis porque 1) eles existem em cópias múltiplas e são facilmente detectados durante procedimento de hibridização 2) as regiões gênicas são evolutivamente conservadas e muitos pesquisadores tem sondas (para hibridização) e primers (para PCR e análise de sequência de nucleotídeos) apropriados para muitos usos, 3) existem conhecimentos substanciais de rRNA em eucariotos, 4) as regiões inter-gênicas adjacentes a regiões gênicas são altamente variáveis, entre espécies relacionadas, sendo possível comparações entre taxons relacionados. Como cada subunidade ribossomal difere em tamanho e quantidade as seqüências dentro da subunidade variam.

Em fungos MA, o primeiro gene sequenciado foi a região codificada rRNA 18S de *Glomus intraradices* e *Gigaspora margarita* (Simon et al., 1992). Ao comparar as seqüências obtidas com as seqüências 18S rRNA conhecidas de outros fungos, esses autores foram capazes de gerar um primer específico para FMA. Usando este primer em combinação com primers universais, seqüências quase completas de nucleotídeos para o gene 18S foram obtidas para doze diferentes FMA (Simon et al., 1993). Variabilidade e similaridade nestas seqüências foram usadas para analisar relações filogenéticas entre os fungos com base no fato de que a taxa de substituição de nucleotídeos é correlacionada com a divergência entre espécies. A árvore filogenética resultante foi coincidente com a classificação do FMA estabelecida por morfologia.

Simon et al. (1993) desenvolveram primers potencialmente úteis para desenvolver uma sonda de um taxon específico. Os primers designados VALETC, VAGLO, VAACAU e VAGIGA foram desenvolvidos para a discriminação entre 4 grupos de espécies ou gêneros endomicorrízicos (respectivamente *G.etunicatum*, *Glomus sp.*, *Acaulospora* e *Gigaspora*). Na região amplificada com o uso do primer VANS1 foram determinadas diferenças substanciais nas seqüências de DNA dos

representantes de três famílias conhecidas, obtendo-se os primers citados anteriormente. Entretanto, havia rara ocorrência de diferenças intra-famílias para *G.etunicatum* e, por isso, foi sugerido ser colocado em uma família separada. Consequentemente, 4 grupos distintos foram considerados e a amplificação de primers específicos para taxons nas seqüências 18S que pode discriminar entre eles, foram delineados. A especificidade desses 4 primers, quando usado em conjunto com o primer VANS1 específico para *Glomales*, foi testada em amplificações conduzidas em fragmentos SSU previamente obtidos de um número de fungos endomicorrízicos.

Similarmente, outros primers ou sondas de regiões informativas alvo deste mesmo gene puderam ser delineadas para discriminar entre alguns gêneros ou espécies. O que pode ser útil no contexto de experimentos controlados. Esta estratégia é dependente da disponibilidade de seqüências de todas as espécies a serem identificadas. Infelizmente, as seqüências 18S estão no momento disponíveis apenas para 12 espécies de fungos endomicorrízicos.

Por ser baseado no PCR, a sensibilidade deste procedimento de identificação é teoricamente suficiente para ser usado em amostras muito pequenas de raízes colonizadas. Protocolos de extração podem precisar de otimização para consistentemente produzir DNA amplificável de fungos de raízes de uma variedade de espécies de plantas que podem ser colonizadas por fungos endomicorrízicos arbusculares.

2.4.2 PCR (reação em cadeia da polimerase)

PCR permite a amplificação *in vitro* de uma região de DNA entre dois segmentos reconhecidos pelos primers específicos. Quantidades de picogramas de DNA podem ser amplificadas a valores que podem ser detectados e malisados pelos métodos de biologia molecular convencional. Por exemplo, Steffan & Atlas (1988) após amplificar amostras com PCR, detectaram DNA específico de uma célula bacteriana (ex: 0.3 pg de DNA inicial) por grama de sedimento. Lee & Taylor (1990) usaram o método para analisar seqüência de genes rRNA de um único esporo de *Neurospora tetrasperma*. O método

tem igual importância tanto em biologia molecular como para o desenvolvimento de hibridação e métodos de enzimas de restrição.

A técnica tem aumentado grandemente a capacidade para analisar seqüências usadas para determinar variabilidade em regiões de gene rDNA entre organismos. Se invariavelmente seqüências em uma região são conhecidas, então primers para amplificação podem ser **construídos**. Após a região ser amplificada é possível mapear a seqüência para comparação com fragmentos similares de outros indivíduos. Após comparadas, regiões de variabilidade apropriada (especificidade) podem ser identificadas e seqüências reconstruídas para uso como sondas (para identificação), primers adicionais (para PCR) para identificação individual ao nível taxonômico desejado (Bruns et al., 1991; White et al., 1990) e sondas de DNA e RNA (Schowalter & Sommer, 1989). Devido ao desenvolvimento de PCR tornou-se possível analisar e caracterizar espécies ao nível de DNA a partir de pequenas quantidades de material, tal como um esporo apenas de FMA.

2.4.3 RAPD (polimorfismo pela amplificação aleatória do DNA)

Esta classe de marcadores moleculares permite identificar o grau de similaridade entre genótipos, aos níveis inter e intra-específico, de maneira mais rápida. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA. A estratégia é utilizar oligonucleotídeos de 10-15 bases como iniciadores (primers) para amplificar o DNA genômico, utilizando a reação de polimerase em cadeia – PCR.

A técnica RAPD difere da PCR por utilizar apenas um primer de seqüência arbitrária, por reação, enquanto no outro se utilizam 2 primers com seqüência conhecida de inserção. A amplificação ocorrerá quando um primer desta mesma seqüência reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR - 4Kb (Williams et al., 1990). O RAPD é uma técnica altamente sensível a diferenças de nucleotídeos entre o primer e o DNA molde, incluindo diferenças em um único nucleotídeo. Além disso, marcadores RAPD podem ser mapeados para regiões do genoma que são inacessíveis para análise de RFLP pela existência de DNA repetitivo.

Outras vantagens desta técnica são a rapidez, e o não envolvimento de hibridação ou radioatividade. Além disso, requer pequena quantidade de DNA.

As principais aplicações do RAPD são o mapeamento, classificação de linhagens de uma espécie, caracterização molecular de populações e espécies, identificação de raças patogênicas, identificação de marcadores ligados a genes de interesse, e estudos de genética de populações e epidemiologia.

Para fungos MA, dependendo do primer usado o padrão da banda de fragmentos de DNA varia e pode ser específico a nível de espécie. Wyss & Bonfante (1993) usaram RAPD para determinar o polimorfismo entre FMA. Eles mostraram que a similaridade nos perfis da banda obtida depois da amplificação pelo RAPD foi maior nos esporos do mesmo isolado e menor entre espécies diferentes. A vantagem desse método é que ele não requer o conhecimento prévia da seqüência do DNA, porque os fragmentos de DNA são amplificados aleatoriamente. No entanto, esse método tem sérios problemas. Os primers usados não são específicos e o DNA presente em qualquer organismo em contaminação pode levar à amplificação de um fragmento de DNA e resultar em padrão de banda não específico. Isto é de particular preocupação para pesquisa da micorriza arbuscular. Como o fungo não pode geralmente ser produzido assépticamente, a contaminação por bactérias é difícil de ser evitada. Ainda mais, esse método não pode ser usado diretamente para identificar o fungo dentro das raízes, devido à interferência do DNA da planta. Contudo, resultados recentes têm mostrado que esse método é mais sensível que o uso de isoenzimas (Wang, 1993) e ele pode levar ao isolamento de fragmentos específicos de DNA, para os quais primers correspondentes podem ser gerados. Estes primers podem então ser usados combinados com análise de variabilidade do PCR-RFPL ou, se espécie-específico, na investigação para detectar um dado fungo.

2.4.4 Análises de isoenzimas

Informação sobre a condição genética e nuclear do fungo isolado podem ser obtidas através de análises de isoenzimas. Isoenzimas são proteínas que têm a mesma atividade enzimática mas são codificadas por alelos diferentes do mesmo locus genético (aloenzimas), ou por loci genéticos separados. Isso dá origem a uma estrutura terciária

diferente da proteína e, conseqüentemente, mobilidades eletroforéticas **diferentes no gel** (Micales et al., 1986). Bandas de aloenzimas migram rigorosamente juntas, embora isoenzimas codificadas por loci diferentes ocorram em diferentes **regiões do gel**.

Vários sistemas de isoenzimas têm sido estudados **em FMA** e tem sido sugerido, **a partir** de análises de **padrão** de bandas, **que esses** fungos podem ser **haplóides** (Rosendahl & Sen 1992). Como os **padrões de** banda representam diretamente os genes **do produto**, eles podem **revelar** diferenças genéticas entre **os fungos proxicamente relacionados**. **A** análise de isoenzimas tem **sido particularmente aplicada** aos membros do **gênero *Glomus***, onde variações **no padrão** de bandas **do alelo** e do locus **da isoenzima** ocorrem entre espécies e isolados. Hepper et al. (1988) relata diversidade **genética** aparente entre isolados **reconhecidos como *G.mosseae*** mas, de diferentes **origens** geográficas. Contudo, a amplitude **da** variabilidade **da** isoenzima depende **muito** da enzima **em questão**. Uma análise **genética ampla** requer **testes de um** grande **número** de sistemas de diferentes enzimas. A utilidade **de padrão de variabilidade da** isoenzima como **um** critério **taxonômico em FMA**, em conjunto com **caracteres morfológicos** é discutida por Rosendahl & Sen (1992).

Atualmente tem sido largamente difundido **o uso de leguminosas para** revegetação de solos degradados **ou como** adubação verde em **culturas** perenes **ou áreas que** permanecem longos **períodos** sem **vegetação**, **Este conceito se** baseia no **fato das** leguminosas serem **capazes** de formar dois **tipos** de associações simbióticas **mutualísticas com** microrganismos **do** solo, **Rizóbio fixadores de N₂** e **micorrizas arbusculares** (Cardoso, 1985; Azcón-Aguilar et al., 1979). Tal fato tem grande **significado** ecológico, **porque**, embora a **fixação de N₂** seja **um processo chave** na disponibilidade **de N** para **a biosfera**, é dependente do **suprimento de** fosfatos e outros nutrientes. **As micorrizas podem** **satisfazer esta** demanda **para** ambos os simbiontes, **planta** e **fixador de N₂**, com **uma** relação sinérgica entre o **FMA** e o **Rizóbio** (Barea & Azcón-Aguillar, 1983). **Leguminosas noduladas** e colonizadas **com FMA** **são** bem **adaptadas a** cultivos **em situações** de deficiência.

O potencial de **inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)** relaciona-se **ao número** de esporos e fragmentos **de** hifas presentes no solo e pode ser influenciado

pela vegetação. **Assim** como **o** substrato **para** produção de mudas pode ser melhorado através da inoculação, **é possível**, através do manejo, aumentar o potencial de **inóculo natural** de FMA do **solo**. Plantas altamente **micorrízicas** introduzidas no **agrossistema** como **adubos verdes** ou como cobertura de solo podem aumentar a **diversidade** de espécies **de** FMA e a quantidade de propágulos **e** hifas no **solo**, elevando **o** potencial **infectivo** natural **e** favorecendo a **micorrização** das culturas.

A avaliação do potencial de inóculo natural do solo e da dinâmica das diferentes populações de FMA indígenas **de** cafeeiros, conduzidos com **adubos** verdes, **permitirá o** conhecimento dos possíveis efeitos **desta** prática agrícola sobre **a** ecologia dos FMA indígenas e o **potencial** de inóculo natural do solo.

3 MICORRIZAS ARBUSCULARES NO AGROSSISTEMA CAFEIEIRO E ADUBAÇÃO VERDE COM LEGUMINOSAS

3.1 Resumo

Avaliou-se o efeito do cultivo intercalar de leguminosas de verão para adubação verde, sobre a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (MA) no cafeeiro. As avaliações foram feitas em um experimento de longa duração, conduzido a campo pelo Instituto Agrônomo do Paraná- IAPAR, no município de Mirassol PR. O experimento está instalado há 10 anos, em uma área de latossolo vermelho escuro distrófico (LEd) onde, nas linhas principais cultiva-se o cafeeiro 'Catuaí Amarelo' e nas entrelinhas as leguminosas *Leucaena leucocephala*, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna cinzenta* (*Stizolobium pruriens*), *Mucuna anã* (*Stizolobium deeringianum*), *Amendoim cavalo* (*Arachis hipogaeae*) e *Caupi* (*Vigna unguiculata*) para adubação verde. Amostras de solo rizosférico e raízes foram coletadas entre junho de 1996 e julho de 1997. Determinou-se a diversidade de espécies de fungos MA através da identificação morfológica dos esporos, a frequência de ocorrência das populações de fungos MA através da contagem direta de esporos no solo e a colonização radicular. Também foram conduzidos bioensaios em casa de vegetação, para estudar a composição das populações de fungos MA que efetivamente estavam colonizando raízes do cafeeiro a campo.

O cultivo de leguminosas na entrelinha de plantio do cafeeiro aumentou a diversidade de espécies e o número de esporos de fungos MA na rizosfera do cafeeiro. Cafeeiro cultivado com *Crotalaria breviflora* mostrou-se altamente micorrizado, com maior diversidade de espécies e número de esporos de fungos MA no solo, em todas as épocas avaliadas. Entretanto, parte da diversidade de fungos presentes na rizosfera do cafeeiro não foi recuperada na rizosfera de milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) quando se utilizaram raízes colonizadas de cafeeiro como inóculo, indicando que alguns fungos MA observados na rizosfera do cafeeiro podem estar sendo

multiplicados nas leguminosas que crescem próximas, mas **não estão** efetivamente em **simbiose** com o cafeeiro. Estes resultados sugerem a ocorrência de relações preferenciais entre fungos e **hospedeiros**, que podem influenciar o estabelecimento e eficiência da simbiose micorrízica e determinar a exclusão de algumas espécies de fungos **MA** do sistema solo-planta,

3.2 Summary: ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN AN AGROSYSTEM WITH COFFEE PLANTS INTERCROPPED WITH LEGUME AS GREEN MANURE

Sporulation and occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) were evaluated on coffee trees (*Coffea arabica* L.) intercropped with legumes for green manure. Samples of soil rhizosphere and roots were collected at three times between June of 1996 and July of 1997, in a long term experiment located at the Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, at Mirassolva city, Paraná state, Brazil. The AM diversity was determined through the morphologic identification of spores, the AM occurrence frequency by the direct counting of spores in the soil and the root colonization evaluated with the grid-line method using stained roots. Bioassays were also conducted at the green-house. to study the AM composition inside of the coffee roots from the field. Legume intercropping increased the AM diversity and the number of spores in the soil rhizosphere of coffee trees. *Crotalaria breviflora* showed a high mycorrhizal capacity, able to form symbiosis with several species of AM fungi, resulting in more AM diversity and number of spores in the soil, at all evaluation periods. This effect was also observed in the coffee rhizosphere cultivated side by side to the legumes. However, part of the AM diversity in the coffee trees rhizosphere was not recovered in corn (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) rhizosphere when colonized roots of coffee were used as inoculum, suggesting that some of the AM fungi observed in the coffee rhizosphere were originated from close legume roots, but they are not indeed in symbiosis with the coffee trees. These results showed the occurrence of preferential relationships among the AM

fungi and the host, that can determine the establishment and the effectiveness of the mycorrhizal symbiosis and the exclusion of some species from the root system of certain plants.

3.3 Introdução

As micorrizas arbusculares (MA) são associações simbióticas entre *fungos* da ordem *Glomales* e *raízes* da maioria das plantas vasculares. As MA atuam como um complemento do sistema radicular do hospedeiro, capaz de aumentar a absorção de P e outros nutrientes, promover proteção contra patógenos e desencadear no hospedeiro diversos efeitos ainda não de todo compreendidos. Os efeitos da micorrização para as plantas podem ser tão mais importantes quanto menos desenvolvido for o sistema radicular, mais estressante o ambiente, mais pobre o solo em nutrientes ou mais competitivo para o estabelecimento das plantas. A simbiose micorrízica é particularmente importante para o cafeeiro porque este apresenta elevada dependência aos fungos MA na fase de mudas em viveiros (Siqueira & Colozzi Filho, 1986). Em plantas adultas no campo, embora a dependência micorrízica do cafeeiro ainda não tenha sido determinada. Saggin Júnior & Siqueira (1996) citam que a manutenção de uma população de fungos MA diversificada e ativa pode aumentar a sustentabilidade do agrossistema e diminuir os efeitos negativos que o monocultivo contínuo pode ter sobre a diversidade de espécies, conforme relatado por Johnson et al. (1992).

Em viveiros, a inoculação do cafeeiro com espécies de fungos MA eficientes estimula o estabelecimento da simbiose no início do desenvolvimento das plantas, proporcionando mudas saudáveis e mais resistentes aos estresses causados pelo transplante, o que pode se transformar em aumento de produtividade nas plantas adultas. Entretanto, as informações sobre a ocorrência de fungos MA em cafeeiros não inoculados em produção mostram a ocorrência predominante de espécies indígenas de baixa eficiência simbiótica (Balota & Lopes, 1996a). Espécies selecionadas eficientes normalmente não ocorrem no campo (Lopes et al., 1983a) e quando introduzidas via inoculação, têm

dificuldade de permanecer no agrossistema (Balota & Lopes, 1996b). Conseqüentemente, é necessário entender como espécies individuais afetam as plantas sob condições de campo e que fatores controlam sua população nos agrossistemas (Abbott & Robson, 1982, Hall, 1988).

Diversos estudos têm examinado os efeitos de rotações de cultivos e pré-cultivos na colonização micorrízica e nas populações de esporos (Sieverding & Leihner, 1984; Dood et al., 1990b; Johnson et al., 1992), mas pouco se conhece dos efeitos destas práticas sobre a comunidade de fungos micorrízicos em cafeeiros adultos.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de cultivo intercalar do cafeeiro com leguminosas de verão para adubação verde, sobre a ocorrência de fungos MA e a micorrização.

3.4 Material e Métodos

Este estudo foi realizada em amostras de solo rizosférico e raízes coletadas a campo e em ensaios complementares conduzidos em casa de vegetação, conforme descritos a seguir.

3.4.1 campo

Amostras de solo rizosférico e raízes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e leguminosas foram coletadas em um experimento de longa duração conduzido pelo Instituto Agrônômico do Paraná- TAPAR, no município de Mirassolva, PR. Este trabalho vem sendo conduzido desde 1988 e objetiva estudar os efeitos do cultivo intercalar de adubos verdes sobre as propriedades do solo e a produtividade do cafeeiro. O experimento está instalado em uma área de latossolo vermelho escuro distrófico (LEd). Nas linhas principais cultiva-se o cafeeiro 'Catuaí Amarelo' e nas entrelinhas as leguminosas *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*), *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna* cinzenta (*Stizolobium pruriens*), *Mucuna* anã (*Stizolobium deeringianum*), *Amendoim cavalo* (*Arachis hipogaeae*) e *Caupi* (*Vigna unguiculata*). No tratamento

controle, conduz-se o cafeeiro **no limpo**, sem leguminosas *e* invasoras na entrelinha. O delineamento experimental a campo é de **blocos ao acaso**, com 3 repetições. O cafeeiro é cultivado no **espaçamento 4,0 x 2,0 m** por **cova** de 2 plantas *e* cada parcela **possui 32 covas (4 linhas de 8 covas)**, sendo as **8 plantas centrais a área útil** da parcela. Com exceção das leucenas que são perenes, as leguminosas **são** plantadas **anualmente**, sendo **a** sementeira feita na primeira **quinzena** de outubro. A densidade de sementes **varia em função da espécie**. No tratamento controle, o cafeeiro é conduzido **no limpo**, procedendo-se **a capinas manuais** durante **o mo**, **conforme o** desenvolvimento das invasoras. **As leguminosas são** cortadas **na altura do solo**, por **ocasião da floração**, que ocorre **em** épocas diferentes para **cada espécie**, deixando-se os resíduos amontoados na área **para** cobertura do **solo e** decomposição. **Para** a Leucena, **são** feitos **4 cortes** ao **ano**, normalmente nos meses de outubro, janeiro, **março e** maio.

Foram feitas **3 amostragens**, sendo **a primeira** em julho de 1996, *e* as duas seguintes em fevereiro *e* junho de **1997**, compreendendo **um** ano agrícola. Coletaram-se amostras compostas (**4 sub-amostras por parcela**) **com** aproximadamente **1 kg** de material **cada**, contendo raízes *e* solo rizosférico a uma profundidade de **0 a 20 cm**. Para o cafeeiro, **as sub-amostras** foram coletadas **em 4 pontos** equidistantes **sob a projeção da copa e** orientados **para** as direções norte, sul, leste *e* oeste. Nas leguminosas, as subamostras foram coletadas alternadas **na linha de plantio**.

Do material amostrado (solo *e* raízes), **100g de** solo foram utilizadas **para análises** químicas **de** rotina *e* **50g de** solo **para determinações quantitativas (número de esporos) e qualitativas (diversidade de espécies) de fungos** **MA** O restante do solo foi **utilizada para a** montagem **do** ensaio de casa de **vegetação**.

A análise química do solo no **campo**, nas três **épocas** mostradas é apresentada **na Tabela 1**.

3.4.2 Casa de vegetação

Na tentativa de multiplicar os **fungos que** efetivamente estavam **colonizando** as raízes **das** plantas no experimento **a campo**, foram montados **vasos** de multiplicação usando **comb inóculo** raízes de cafeeiro *e* leguminosas coletadas a campo. Seguiu-se **o**

mesmo delineamento experimental do experimento a campo, com 3 repetições, tendo sido montados vasos de multiplicação correspondentes as três épocas amostradas. Entretanto, devido ao ciclo rápido de algumas leguminosas não foi possível obter raízes destas plantas por ocasião da 1ª e 3ª amostragens, que portanto não foram avaliadas em casa de vegetação nestas épocas.

Tabela 1. Análise química de solo coletado na profundidade de 0 a 20 cm em experimento de cafeeiro e adubação verde com leguminosas de verão, conduzido pelo Instituto Agronômico da Paraná-IAPAR no município de Mirassol, PR. Média de 72 repetições.

	pH	C (g dm ⁻³)	P (mg dm ⁻³)	K	Ca (cmol _c dm ⁻³ de solo)	Mg	Al
Cafeeiro	4,06	8,19	28,23	0,18	0,7	0,44	0,4
Leguminosas	5,00	7,92	5,46	0,21	1,9	1,10	0,0

Como substrato nos vasos de cultivo utilizou-se uma mistura de solo latossolo vermelho escuro distrófico (Led) e areia, na proporção de 3:1 vol.:vol., desinfestado com brometo de metila. Como planta hospedeira utilizou-se milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) cultivados simultaneamente. O inóculo constou de 100g de raízes recém colhidas, lavadas e picadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm. Estas raízes foram colocadas abaixo do orifício de plantio, no momento da semeadura. Os vasos foram conduzidos em casa de vegetação, por 5 meses, tempo suficiente para que as plantas completassem seu ciclo, quando então foram avaliadas.

Para estudar o efeito seletivo da planta sobre os fungos MA nativos, cultivou-se a mesma espécie de cafeeiro utilizada no experimento a campo, em casa de vegetação, porém em solos coletados a campo, na projeção da copa do cafeeiro e na linha de plantio das leguminosas. Utilizou-se solo da primeira coleta (Junho de 1996) sendo o ensaio montado no mesmo delineamento experimental do campo, com 3 repetições.

Para o cultivo do cafeeiro em casa de vegetação utilizou-se sacos de polietileno para produção de mudas, com capacidade para 600 ml de solo. As plantulas foram

obtidas de sementes desinfestadas e pré-germinadas em vermiculita estéril, sendo transplantadas em estágio de “orelha de onça”. O ensaio foi conduzido por onze meses. Tenda sido colhido quando o cafeeiro estava com três pares de folhas e desenvolvimento vegetativo suficiente para ser transplantado no campo,

3.4.3 Avaliações

Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963) e centrifugados em água a 3000 rpm por 3 min e em sacarose 50% a 2000 rpm por 2 min. Após a extração os esporos foram transferidos para placas de Petri e contados sob microscópio estereoscópio (40X). Para as determinações qualitativas (identificação de espécies) os esporos foram fixados com PVL (Polivinil-alcool) em lâminas microscópicas e observados em microscópio óptico composto. A identificação das espécies foi feita baseando-se em critérios morfológicos, conforme descrito em Schenck & Perez (1987) e Morton & Beny (1990).

Para a determinação da colonização radicular por fungos MA, as raízes foram separadas de solo rizosférico em água corrente, lavadas e aquecidas a 60°C em KOH 10% por 10 minutos para clarificação. Após a clarificação as raízes foram lavadas em água destilada 4 vezes, acidificadas com HCl 1% por 2 minutos e fervidas por 10 minutos em solução de glicerol-ácido + azul de tripano 0.05% para colorir as estruturas fúngicas internas, segundo Phillips & Hayman (1970). A determinação da percentagem de colonização radicular foi feita em microscópio estereoscópio, pelo método da placa quadriculada, segundo Giovannetti & Mosse (1980).

Os dados obtidos foram transformados sendo os de percentagem de colonização radicular previamente transformados para $\arcsin (x / 100)^{1/2}$ e o número de esporos para $(x + 0,5)^{1/2}$. Estes dados foram então submetidos à análise de variância com a aplicação do teste de F, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan,

3.5 Resultados

A esporulação dos fungos **MA** a campo, m rizosfera do cafeeiro e das leguminosas cultivadas nas entrelinhas, nas três épocas estudadas, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Esporulação de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e de leguminosas cultivadas de modo intercalar a campo. Média de 3 repetições.

Leguminosas	Cafeeiro			Cultivo intercalar		
	Jun./96	Fev./97	Jul./97	Jun./96	Fev./97	Jul./97
	Número de esporos . 50 g de solos ⁻¹					
Leucena	61Ab ⁽¹⁾	21Babc	46Ab	82Abc	51Aa	56Aabc
<i>Crotalaria spectabilis</i>	72Ab	24Babc	85Aab	123Aab	68Aa	70Aab
<i>C. breviflora</i>	131Aa	39Ba	128Aa	167Aa	69Ba	106Aba
Mucuna cinzenta.	80Ab	24Babc	55Ab	60Ac	65Aa	22Bd
M. anã	67Ab	19Bbc	61Ab	68Ac	40Aba	23Bd
Amendoim cavalo	50Ab	19Bbc	84Aab	67Abb	70Aa	33Bbcd
Caupi	58Ab	15Bc	50Ab	78Abc	66Aba	33Bbcd
Controle	49Ab	30Bab	63Aab	61Ac	62Aa	29Acd
Total	68A	23B	68A	75A	60A	40B
C.V. %		8,4			10,6	

1. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O cultivo de *Crotalaria breviflora* nas entrelinhas de plantio aumentou a concentração de esporos na rizosfera do cafeeiro em todas as épocas analisadas embora em fevereiro este efeito não tenha sido estatisticamente significativo. Em cafeeiros cultivados com outras leguminosas na entrelinha observou-se tendência de efeitos

variados sobre a esporulação no solo. Por exemplo, Caupi estimulou a esporulação na rizosfera do cafeeiro em julho. mas em fevereiro o número de esporos observados foi significativamente menor. Na rizosfera das leguminosas (Tabela 2), o maior número de esporos também foi observado em *Crotalaria breviflora*, em junho e julho, seguido pela *C.spectabilis* em junho e *C. spectabilis* e Leucena em julho. No verão (Fev./96), não se observaram diferenças entre o número de esporos recuperados na rizosfera das leguminosas. As maiores esporulações foram observadas em junho e julho no cafeeiro e em junho nas leguminosas.

A percentagem de colonização radicular no cafeeiro (Figura 1A) e na Leucena (Figura 1B) cultivados a campo é apresentada na Figura 1.

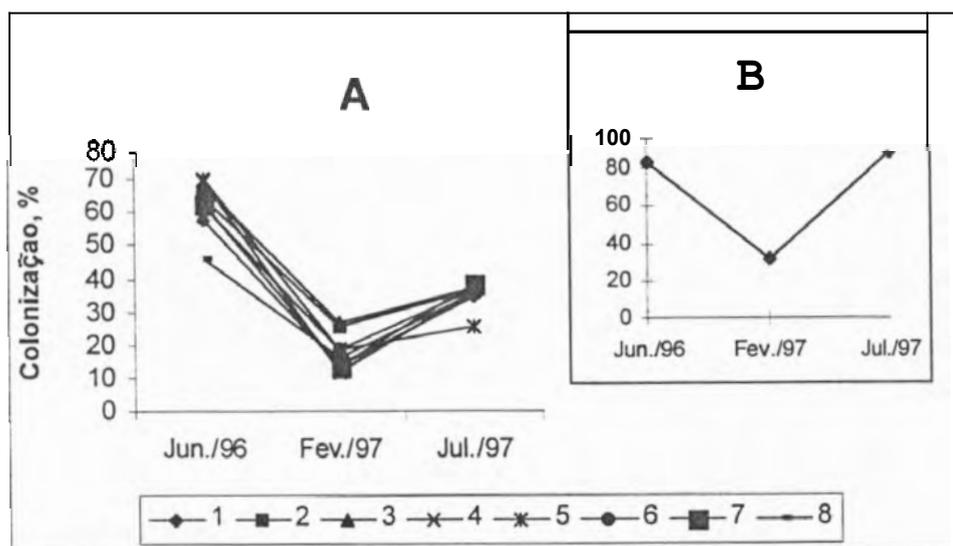


Figura 1. Colonização radicular de fungos micorrízicos arbusculares em A): cafeeiro cultivado a campo com leguminosas na entrelinha e B): Leucaena cultivada na entrelinha do cafeeiro. Média de três repetições. 1 a 7 referem-se aos tratamentos onde se cultiva cafeeiro com as leguminosas Leucena, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, Mucuna cinzenta, M. anã, Amendoim cavalo e Caupi na entrelinha, respectivamente. 8 cafeeiro cultivado na ausência de leguminosas (Controle).

Não se observaram diferenças significativas na colonização radicular do **cafeeiro** quando cultivado com diferentes leguminosas na entrelinha. Entretanto, esta foi significativamente maior no mês de junho, **mínima** em fevereiro e intermediária em julho do **outro** ano. Para a Leucena, única leguminosa na **qual** a colonização **pôde** ser avaliada **em todas as épocas por ser perene**, observou-se resultado semelhante, com valores máximos no inverno e **mínimo** no verão. As demais leguminosas foram avaliadas **apenas na amostragem de fevereiro**, e todas apresentavam colonização **com** valores semelhantes aos observados para a Leucena (dados não apresentados).

Os fungos **MA** recuperados na rizosfera do cafeeiro e das leguminosas **a campo**, sua frequência e classe de ocorrência são apresentados na Tabela 3. No total, em todas as épocas avaliadas foram identificadas 12 espécies de fungos **MA**, **que são: *Scutellospora gilmorei*, *S.pellucida*, *S.heterogama*, *Gigaspora margarita*, *Gi.decipiens*, *Acaulospora scrobiculata*, *A.appendicula*, *A.longula*, *A.spinosa*, *Acaulospora sp.*, *Glomus sp.* e *G.diaphanum*.**

De modo geral, todos os fungos identificados na **área** foram de ocorrência comum no cafeeiro e nas leguminosas. Entretanto, foram observadas algumas **variações** nas frequências de ocorrências **de determinadas** espécies em função da época e da planta hospedeira, conforme discutido no capítulo 3. Por exemplo, em junho de 96 observou-se a ocorrência de *A.longula*, *Acaulospora sp.* e *Glomus sp.* somente **em cafeeiro e *Gi.margarita*, *Gi.decipiens* e *A.appendicula* apenas na Crotalária** (Figura 2 do capítulo 5). Neste trabalho, a riqueza de espécies (Riqueza de espécies = número de espécies recuperadas) foi maior no solo cultivado com leguminosas ou sob a influência do cultivo destas. *Gi.decipiens* e *Acaulospora sp* não foram encontrados na rizosfera do cafeeiro cultivado sem adubo verde e *S.heterogama* e *A.appendicula* não ocorreram em áreas onde o cafeeiro ou leguminosas não foram cultivados (Tabela 3). *A.scrobiculata*, *A.longula* e *G.diaphanum* apresentaram maior classe de ocorrência no cafeeiro (Classe 5). Nas leguminosas, além de *A.scrobiculata*, *A.longula* e *G.diaphanum*, *S.gilmorei* também apresentou classe 5 de ocorrência. Os resultados de classe de frequência mostraram **que**, nas parcelas onde cresce a **vegetação** nativa ou onde se cultivaram leguminosas a maioria das espécies apresentaram **classe** de ocorrência mais alta **que na**

cafeeiro, o que mostra populações mais representativas dentro de um mesmo índice de riqueza. No *cafeeiro*, embora tenham sido identificadas 12 espécies, com exceção de *A.scrobiculata*, *A.longula* e *G.diaphanum* que apresentam classe 5 de frequência (quase sempre presentes), a maioria das espécies ocorrem com pouca frequência (classe 2) ou rara (classe 1).

Tabela 3. Ocorrência, frequência de ocorrência² (F) e classe de ocorrência³ (C) de espécies de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de *cafeeiro* e leguminosas cultivadas de modo intercalas a campo.

Ocorrência ¹ de espécies	Cafeeiro				Cultura intercalar			
	cafeeiro ¹		Controle ²		Leguminosas ³		Controle ²	
	F,%	C	F,%	C	F,%	C	F,%	C
<i>Scutellospora gilmorei</i>	48	3	33	2	100	5	100	5
<i>S.pellucida</i>	24	2	33	2	71	4	33	2
<i>S.heterogama</i>	4,8	1	33	2	28,5	2	0	-
<i>Gigaspora margarita</i>	19	1	33	2	62	4	66	4
<i>Gi.decipiens</i>	9,5	1	0	1	28,5	2	33	2
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	90	5	66	4	100	5	100	5
<i>A.appendicula</i>	19	1	33	2	38	2	0	-
<i>A.longula</i>	100	5	100	5	90	5	66	4
<i>A.spinosa</i>	24	2	66	4	62	4	66	4
<i>Acaulospora sp.</i>	4,8	1	0	-	19	1	0	-
<i>Glomus sp.</i>	9,5	1	66	4	52	3	66	4
<i>G.diaphanum</i>	100	5	100	5	86	5	100	5

1. Ocorrência = presença na amostra. 2. Frequência de Ocorrência = presença pelo total de amostras. Classe de ocorrência segundo Braun-Blanquet (1979): 0 = esporádica (<2); 1 = rara (2<20%); 3 = pouca frequência (20<40%); 4 = presente na maioria (60-100%); 5 = quase sempre presente (80-100%); 4 e 5, média de 63 e 27 repetições, respectivamente.

A frequência de ocorrência de *Glomales* no cafeeiro e nas leguminosas é apresentada na **Figura 2**. *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae* predominam no cafeeiro e nas leguminosas, respectivamente. Para o cafeeiro, a relação de ocorrência do dominante com as demais foi de 2,3:1 para *Acaulosporaceae/Gigasporaceae* e 2,2:1 para *Acaulosporaceae/Glomaceae*. No cafeeiro controle a representatividade das populações apresentou-se mais equilibrada, indicada pela menor relação entre a ocorrência das famílias (1,3:1 nos dois casos). Nas leguminosas, a relação *Gigasporaceae/Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae/Glomaceae* foi de 1,7:1 e 2,0:1, respectivamente. No controle das leguminosas (área sem cultivo mas de crescimento freqüente de invasoras), não se observou relação de dominância de ocorrência, embora *Glomaceae* tenha ocorrido com freqüência menor.

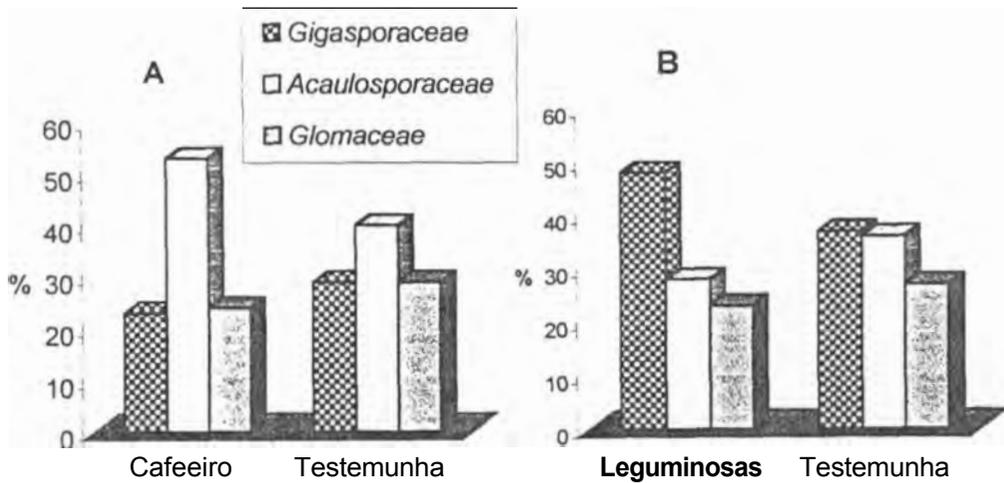


Figura 2. Frequência de ocorrência de *Glomales* em cafeeiros e leguminosas cultivadas de modo intercalar a campo. Média de 63 repetições para cafeeiros e leguminosas e 21 repetições para os controles.

Em casa de vegetação, em vasos de cultivo tendo milho e sorgo como planta hospedeira. mas inoculados com raízes de cafeeiro ou leguminosas cultivadas a campo, observou-se ocorrência e frequência de ocorrência de espécies diferente de observado a campo (Tabela 4). *Gigasporaceae* não foram recuperadas na rizosfera de milho e sorgo quando o inóculo utilizado foi rakes de café, em nenhuma das épocas estudadas. Destas raízes somente se recuperou *A.scrobiculata*, *A.longula*, *Glomus sp.* e *G.diaphanum*, sendo este último com alta frequência de ocorrência. Entretanto, *Gigasporaceae*, especialmente *S.gilmorei* foram freqüentemente recuperados de raízes das leguminosas.

Tabela 4. Ocorrência e frequência de ocorrência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares, na rizosfera de milho e sorgo, inoculados em casa de vegetação com raízes de cafeeiro ou leguminosas cultivadas de modo intercalar no campo.

Ocorrência' de espécies.	Frequência de ocorrência', %.		
	Cafeeiro ³	Controle''	Leguminosas ³
<i>Scutellospora gilmorei</i>	-	-	42
<i>S. pellucida</i>	-	-	4
<i>S. heterogama</i>	-	-	4
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	51	89	33
<i>A.longula</i>	57	78	21
<i>Glomus sp.</i>	21	0	12
<i>G.diaphanum</i>	90	100	83

1. Ocorrência = presença no tratamento; 2. Frequência de ocorrência = ocorrência da espécie no total de amostras avaliadas; 3, 4 e 5 = Média de 63, 9 e 63 repetições; respectivamente.

A esporulação observada nos vasos de cultivo com milho e sorgo em casa de vegetação variou, independentemente das épocas mostradas. de 136 a 512 esporos por 50 g de solos (Figura 3) e não foram observadas diferenças significativas. A produção de esporos em vasos de cultivo é normalmente alta, refletindo as condições favoráveis ao

desenvolvimento da simbiose e do fungo. Embora não tenha sido determinada a percentagem de ocorrência de espécies com base na contagem de esporos, observou-se estreita relação entre a ocorrência de esporos de *G.diaphanum* e sua frequência de ocorrência no campo (Figura 3). A presença de *G.diaphanum* em quase todas as épocas

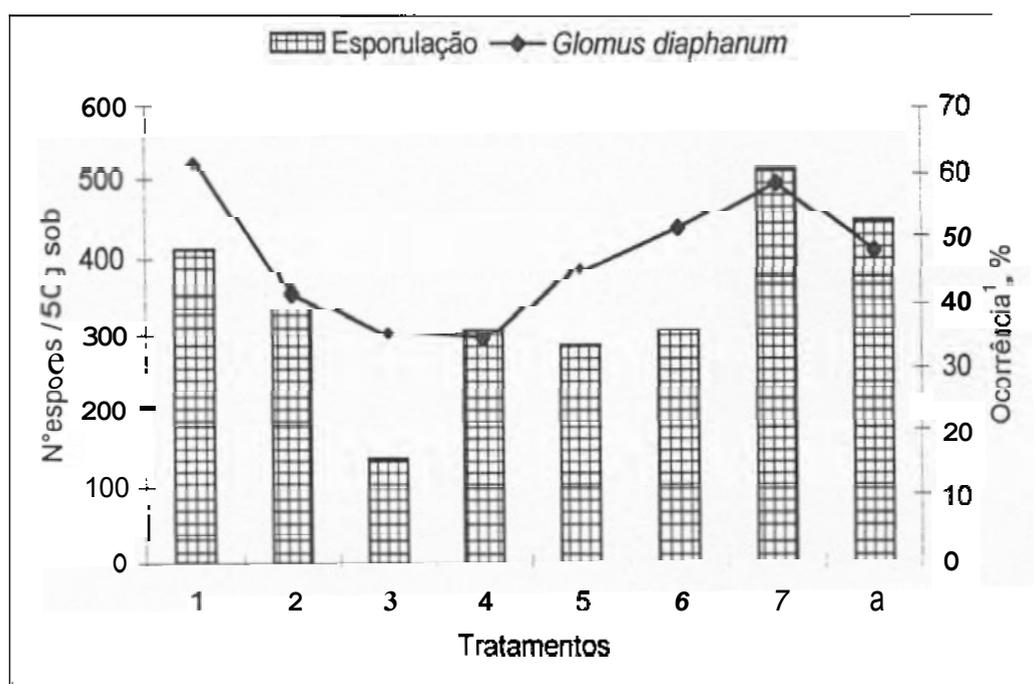


Figura 3. Esporulação de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de milho e sorgo em casa de vegetação e ocorrência de *Glomus diaphanum* a campo. 1 a 7 referem-se ao cafeeiro cultivado a campo com as leguminosas *Leucena*, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna* cinzenta, M. anã, Amendoim cavalo e Caupi na entrelinha, respectivamente. 8 corresponde ao cafeeiro cultivado na ausência de leguminosas (Controle). Média de 3 repetições. E = Número de esporos da espécie pelo total de esporos observados na amostra.

e tratamentos avaliados e o grande número de esporos produzidos mostraram sua alta adaptabilidade ao ambiente e agressividade em colonizar as plantas.

Para investigar a possibilidade de que variáveis de solo (P disponível, pH) estivessem atuando sobre a não colonização do cafeeiro por *Gigasporaceae*, em casa de vegetação cultivou-se o cafeeiro em solo coletado na linha de plantio das leguminosas a campo. Os resultados mostraram ocorrência e frequência de ocorrência de *Gigasporaceae* menor quando se cultivou cafeeiro no solo original em que foram observadas (Tabela 5). No mesmo solo onde se observou 100% de Frequência de ocorrência de *S.gilmorei* quando cultivado com leguminosas a campo (Tabela 33, se observou no máximo 25% de ocorrência deste mesmo fungo após o cultivo do cafeeiro (Tabela 5B). Também *S. heterogama* e *Gi. decipiens*, de ocorrência baixa no campo, não foram mais recuperadas. Por outro lado, observou-se grande frequência de ocorrência de *G.diaphanum*, que mais uma vez confirma sua condição de oportunista agressivo, capaz de se estabelecer em situações de solo e hospedeiro variada, estressantes para a maioria dos outros fungos MA. Quando se cultivou o cafeeiro em solo proveniente de áreas cultivadas com cafeeiro, *A.scrobiculata*, *A.longula* e *G.diaphanum* apresentaram maior frequência de ocorrência, concordando com os resultados obtidos no campo (Tabela 3). Espécies de menor frequência de ocorrência no campo como *S.heterogama*, *A.appendicula*, *A.spinosa* não foram mais recuperadas

A colonização radicular e a esporulação foram maiores em cafeeiros cultivados em solo proveniente da linha de plantio das leguminosas a campo, sendo este efeito maior para *C.breviflora* e *M.aná*, respectivamente (Tabela 6). Em cafeeiros cultivados em solo de café, a colonização radicular não diferiu e a esporulação foi maior quando se cultivou *C.breviflora* na entrelinha (Tabela 6), o que concorda com os dados obtidos no campo (Tabela 2).

Tabela 5. Ocorrência e frequência de ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivado em casa de vegetação em A): solo proveniente de experimento a campo, coletado na projeção da copa de cafeeiro cultivado com adubos verdes e B): solo proveniente da linha de cultivo dos adubos verdes. Média de 3 repetições.

Ocorrência ¹ de espécies	Frequência de ocorrência ² , %							
	Tratamentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A - solo da projeção da copa do cafeeiro.								
<i>Scutellospora gilmorei</i>			5,7			33	6	
<i>S. pellucida</i>		7					4,5	
<i>Gigaspora decipiens</i>			1,5					
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	40	50	40	54	37,5	40	64	20
<i>A. longula</i>	24,4	7	18	19	17		1,5	20
<i>Acaulospora sp.</i>							4,5	
<i>Glomus sp.</i>			1,5		4,2		3	
<i>G. diaphanum</i>	28	19,6	24	8	29	27	16	60
Não identificado	7,3	8,9	9	19	12,5			
B - solo da linha de cultivo das leguminosas.								
<i>Scutellospora gilmorei</i>	0,9	9,5	6,5	25	9,7	18	11,8	14,3
<i>S. pellucida</i>	3,8				0,6	1,4	1,5	1,3
<i>Gigaspora margarita</i>					1,3	1,4		1,3
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	18,9	14,6	11	13	19	2,8	11,8	11,7
<i>A. longula</i>	19,8				1,9	1,4	4,4	15,6
<i>Glomus sp.</i>					6,4			
<i>G. diaphanum</i>	47	63	65	52	52	68	52,9	49
Não identificado	9,4	12,9	17,4	10	9	6,9	17,6	6,5

1. Ocorrência = presença no tratamento; 2. Frequência de ocorrência = % de ocorrência da espécie no total de amostras avaliadas; 1 a 7 referem-se aos tratamentos onde se cultiva o cafeeiro com as leguminosas *Leucena*, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna cinzenta*, *M. anã*, *Amendoim* cavalo e *Caupi* na entrelinha, respectivamente. 8 (Controle) corresponde ao cafeeiro cultivado na ausência de leguminosas.

Tabela 6. Esporulação e colonização radicular de **fungos micorrízicos arbusculares** em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivado em casa de vegetação em **A): sola** proveniente de experimento **a** campo, coletado na projeção **da copa** de cafeeiro **cultivado** com adubos verdes e **B): sola** do **campo** proveniente da linha de cultivo **dos** adubos verdes. Média de 3 repetições.

Leguminosas	Esporos, nº .50g de solo''		Colonização, %	
	A	B	A	B
Leucena	26ab ⁽¹⁾	34ab	23a	58a
<i>Crotalaria spectabilis</i>	28ab	38ab	33a	37b
<i>C. breviflora</i>	34a	32ab	22a	51a
Mucuna cinzenta.	7c	38ab	22a	29bc
M. anã	19b	51a	24a	24c
Amendoim cavalo	5c	22b	25a	31bc
Caupi	21ab	42ab	27a	36bc
Controle	3d	25b	27a	30bc
C.V. %	9,5	9,5	13,7	8,8

I. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si **pelo teste** de Duncan **a 5%** de probabilidade.

3.6 Discussão

O cultivo de plantas diferentes em **uma** mesma área, na forma de **pré-cultivo**, rotação e/ou associação de **culturas** ou cultivo intercalar, **pode** aumentar **a** diversidade de espécies e **o** inóculo de fungos micorrízicos arbusculares do solo, aumentando seu potencial (Dood **e** al. 1990a; Baltruschat & Dehne, 1988; Gomes-da-Costa, 1993). Neste trabalho **relata-se** o aumento da diversidade de espécies e do número de esporos de fungos **MA** na rizosfera do cafeeiro, **quando** cultivado com leguminosas de **verão** na entrelinha para adubação verde. *Crotalaria breviflora* mostrou-se altamente micorrízica, capaz de formar simbiose com várias espécies de fungos micorrízicos, o que resultou em

maior diversidade de espécies e número de esporos de **fungos MA** no solo, em todas as **épocas** avaliadas. Este efeito foi observado também na rizosfera do cafeeiro cultivado **ao** lado. Entretanto, **parte** dos **fungos** presentes na rizosfera do *cafeeiro* não foram recuperados na rizosfera de milho e sorgo quando se **utilizou** raízes colonizadas como inóculo, evidenciando **que parte** da diversidade de **espécies** e concentração de **esporos** observada na rizosfera de cafeeiro **são** provenientes de raízes de **leguminosas** que crescem sob **a projeção da copa** do **cafeeiro**. Estes resultados sugerem também a ocorrência de **relações** preferenciais entre **fungos** e hospedeiro. Estas **relações são** importantes e podem determinar o estabelecimento e a eficiência da **simbiose** e a exclusão de algumas **espécies** do sistema radicular da planta. A ocorrência de **relações** preferenciais entre fungo e hospedeiro, associadas **às variações** no número de **esporos** e no potencial de inóculo, precisam ser conhecidas **quando se pensa** em manejo **como** alternativa **para** aumentar o efeito biofertilizante das micorrizas.

Segundo Abbott & Robson (1991), esporos são estruturas de resistência e de **propagação** dos **fungos MA** e juntamente com outras **estruturas** produzidas externamente **às rakes** (micélio e células auxiliares) e fragmentos de rakes colonizadas e hifas nas raízes e no solo compõem o inóculo do solo. A infectividade destes propágulos determina o potencial de inóculo do solo. Entretanto, não se conhece relação quantitativa entre os componentes do inóculo do solo e sabe-se **que sua infectividade** é bastante variável. Considerando-se os esporos como parte do inóculo natural do solo e analisando seu comportamento na rizosfera do cafeeiro em função do cultivo de adubos verdes, observou-se aumento no número de esporos na rizosfera e portanto é possível **que tenha ocorrido** aumento no potencial de inóculo natural do solo. O número médio de esporos recuperados no cafeeiro cultivado sem adubos verdes foi de 63 esporos em 50 g de solos, o que **concorda** com dados de esporulação em cafeeiro obtidos a campo por Balota & Lopes (1996a) e Siqueira et al. (1989). Nas parcelas em que *C. breviflora* foi cultivada na entrelinha o número médio de esporos foi de 99 em 50 g de solos, correspondendo a um aumento de 64%.

A produção de **esporos** no solo é possivelmente uma resposta do fungo a mudanças fisiológicas ocorridas na planta hospedeira, e pode estar relacionada à

diminuição no **fluxo** de **carboidratos** solúveis das raízes para o **micélio**, **que** ocorre no **final** do **ciclo** da **planta**. E a intensidade da **esporulação** depende da espécie de **fungo MA** e da capacidade da **planta** hospedeira em fornecer carboidratos ao fungo (Douds & Schenck, 1990). Leguminosas **tropicais** possuem elevada capacidade fotossintética e independente da **disponibilidade** de nutrientes no solo são **capazes** de **disponibilizar** grandes **quantidades** de compostos assimilados para a microbiota (Graham & Eissenstat, 1994). Além disso, leguminosas tem sido **citadas como** plantas altamente micorrízicas (Cardoso, 1985; Herrera et al., 1984) podendo **portanto** influenciar a **ocorrência** dos **fungos MA**. Entretanto, a maneira como isto acontece **não** é conhecida. A maior diversidade de **espécies** e concentração de **esporos** no solo observada nas leguminosas **pode ser** pela produção de **metabólitos secundários como** por exemplo compostos aromáticos biologicamente ativos como **os flavonóides** (Siqueira et al. 1991) que tem capacidade de estimular ou **inibir populações** de fungos MA na **rizosfera**, atuando sobre **sua** ocorrência e distribuição. É possível também **que**, com **ciclo** médio de **120 dias** e dinâmica de **ciclagem** rápida, compostos liberados pelas **crotalárias** estimulem **os** fungos a produzirem mais **esporos no solo** e garantirem sua **sobrevivência até o verão** seguinte.

Dados de campo sugerem **que** a dinâmica da **esporulação** **esta relacionada aos** processos de **desenvolvimento fisiológico** da **planta**. No **verão (Fev.96)**, época de maior crescimento vegetativo das culturas, a **esporulação** no solo foi menor. **Ao final** da **ciclo** das leguminosas ou **após o** florescimento do cafeeiro, o número de **esporos** recuperados no solo foi **maior**. Estes resultados concordam **com os** de Balota (1989), que **observou** número de esporos crescente no cafeeiro **a partir** de março/abril, atingindo valores máximos **em** setembro/outubro. **Também** Smith (1980), estudando o efeito de **épocas** e de **rotação de** culturas sobre a **esporulação de** fungos MA relatou maior número de **esporos** recuperados da rizosfera de trigo ao final do **ciclo da cultura, na** maturação do hospedeiro.

Embora não existam evidências consistentes que relacionem **colonização** e **esporulação em** FMA C necessário que haja um mínimo de colonização **para que** a **esporulação ocorra**. Frankie & Morton (1994) citaram como **condição para** **esporulação** de *Acaulospora* e *Scutellospora*, colonização de no mínima três **vezes** o comprimento

radicular. Neste trabalho observou-se **que** as maiores **esporulações** ocorreram **em** períodos de maior **colonização** radicular (junho e julho), no cafeeiro e nas leguminosas.

A colonização radicular tem sido freqüentemente relacionada com pH e concentração de nutrientes no solo (Koide & Li, 1990; Siqueira & Saggin Júnior, 1995). **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** drenados **pelos fungos** (Graham & Eissenstat, 1994) que podem chegar a 39% do total do produto da fotossíntese (Peng et al., 1993). Mas algumas plantas **têm a** habilidade **ou a necessidade de** manterem **alta colonização** radicular mesmo em situação de **elevada** fertilidade de solo (Porter et al., 1987; Bethlenfalvay et al., 1983), por serem **micotróficas** obrigatórias e possuírem **algum tipo** de deficiência **de natureza** fisiológica ou mesmo morfológica (Janos, 1988; Manjunath & Habte, 1990; Koide, 1991; Smith et al., 1994). Por outro lado, alguns fungos tem habilidade de se associarem **as** raízes indiscriminadamente, produzindo **efeitos** que variam de neutros a negativos **para as** plantas, sendo **por isso** denominados oportunistas ou comensalistas (Peng et al., 1993).

Neste **trabalho** observaram-se altas **taxas** de **colonização** no **cafeeiro** (70% em julho) crescendo em substrata com alta concentração de P disponível (28 mg.dm^{-3}) e **também** grande **esporulação** de *G.diaphanum* quando se cultivou milho e sorgo, inoculados **com raízes** de cafeeiro **provenientes** do campo. em solo coletado na linha de plantio das leguminosas. Portanto, acredita-se **que** neste experimento possa **estar** ocorrendo tanto a **colonização** facilitada pelo cafeeiro **quanta** a **multiplicação** indiscriminada do **oportunista** *G.diaphanum*, **pela** sua elevada **freqüência de** ocorrência e representatividade nas amostras. Entretanto. com **a** metodologia utilizada neste trabalho **não** foi **possível** identificar a **origem da colonização** radicular **do** cafeeiro.

Não se observaram diferenças na ocorrência **de espécies** de **fungos MA** entre a rizosfera do cafeeiro **e das** leguminosas **cultivadas na** entrelinha. Nestas plantas foram identificadas 12 espécies de **fungos MA**. No cafeeiro crescendo sem adubação verde e

na parcela não cultivada somente 10 espécies foram recuperadas. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), em levantamentos feitos em lavouras cafeeiras no sudeste brasileiro já foram identificadas **45** espécies de *Glomales*, sendo 12 do gênero *Acaulospora*, 17 *Glomus*, 6 *Scutellospora*, 4 *Sclerocystis* e 2 *Entrophospora*, além de várias espécies não descritas. Neste trabalho identificou-se *Scutellospora gilmorei*, *S.pellucida*, *S.heterogama*, *Gigaspora margarita*, *Gi.decipiens*, *Acaulospora scrobiculata*, *A.appendicula*, *A.longula*, *A.spinosa*, *Acaulospora sp.*, *Glomus sp.* e *G.diaphanum*.

A frequência de ocorrência de espécies, analisada a campo e em casa de vegetação mostrou que na rizosfera do cafeeiro foram estimuladas populações diferentes daquelas encontradas com maior frequência nas leguminosas. Esporos de *A.longula* e *G.diaphanum* ocorreram com 100% de frequência em cafeeiro enquanto que *S.gilmorei* e *A.scrobiculata* foram as mais frequentes (100%) nas leguminosas. Fernandes (1987) e Balota & Lopes (1996b) também relataram maior ocorrência de *Acaulospora* e *Glomus* em cafeeiros a campo. Ainda segundo Fernandes (1987), o índice de ocorrência de *Gigaspora* e *Scutellospora* em lavouras do sudeste brasileiro foi de aproximadamente 15 e 12% respectivamente, bem inferior ao índice de ocorrência de *Acaulosporas* (100%). De maneira geral, na rizosfera do cafeeiro predominaram *Acaulosporaceae*, enquanto que na rizosfera das leguminosas predominaram as *Gigasporaceae*. Entretanto, em vasos de cultivo em casa de vegetação utilizando como inóculo raízes de cafeeiro cultivados no campo, nenhuma *Gigasporaceae* foi recuperada. Foram multiplicadas *A.scrobiculata*, *A.longula*, *Glomus sp.* e *G.diaphanum*, sendo o último os mais frequentes, seguido das *Acaulosporas*. Quando o inóculo foi raízes de leguminosas foram recuperadas *S.gilmorei*, *S.pellucida*, *S.heterogama*, *A.scrobiculata*, *A.longula*, *Glomus sp.* e *G.diaphanum*, sendo a primeira e a última as mais frequentes. Estes resultados mostraram que, apesar de ocorrerem na rizosfera do cafeeiro, as *Gigasporaceae* não estão colonizando suas raízes. Quando se cultivou o cafeeiro em solo previamente cultivado com leguminosas contendo várias espécies de *Gigasporaceae*, poucos esporos destes fungos foram recuperados sendo possível que alguns deles sejam ainda resultantes do cultivo anterior, porque se apresentavam velhos e parasitados.

Gigaspora margarita, que tem sido citada como eficiente em aumentar o crescimento do cafeeiro (Lopes et al., 1983b; Antunes et al., 1988, Colozzi Filho et al., 1985), foi encontrada na rizosfera das leguminosas e do cafeeiro, mas não foi recuperada quando se inoculou plantas hospedeiras com raízes de cafeeiro colonizadas, em nenhuma época avaliada. Também quando o cafeeiro foi cultivado no solo previamente cultivado com leguminosas, nenhuma esporulação evidente desta espécie foi observada, mas observou-se multiplicação de *A.scrobiculata*, *A.longula* e abundante esporulação de *G.diaphanum*.

Segundo Johnson et al. (1992), monoculturas prolongadas selecionam espécies de fungos MA mais adaptadas ao ecossistema, que nem sempre são as mais eficientes em promover os efeitos da micorrização. Neste trabalho observou-se a ocorrência de *A.longula* e *A.scrobiculata* com maior frequência no cafeeiro, e *Gigasporaceae* nas leguminosas. *G.diaphanum* se mostrou um oportunista agressivo e não específico, colonizando na mesma intensidade cafeeiro e leguminosas. Conforme relatado por Balota & Lopes (1986b), populações de fungos MA podem se influenciar na rizosfera, de forma variada e dependente das condições de solo e planta. Os resultados obtidos neste experimento sugerem que *G.diaphanum* esteja influenciando negativamente a colonização do cafeeiro por *Gigasporaceae*, mas este aspecto não foi investigado.

Portanto, espécies de fungos MA nativas altamente adaptadas ao ecossistema e que exibem relações preferenciais com as plantas podem estar atuando negativamente sobre a frequência de ocorrência de outras espécies nativas mas menos adaptadas, diminuindo sua representatividade. É possível que a ocorrência de relações preferenciais entre fungo e hospedeiro seja um dos mecanismos através dos quais fungos são excluídos do sistema solo planta.

3.7 Conclusões

- O cultivo de leguminosas aumentou a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e a concentração de esporos no solo.
 - O cultivo de leguminosas **para adubação verde na entrelinha** do cafeeiro, aumentou a diversidade de **espécies** e o número de esporas de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera da **cafeeiro**.
 - O Cafeeiro e as leguminosas estimularam **populações de** fungos micorrízicos diferentes na sua rizosfera. *Acaulosporaceae* foram **m i s** freqüentes no cafeeiro e *Gigasporaceae*, principalmente *Scutellospora gilmorei*, nas leguminosas,
 - *Glomus diaphanum* mostrou-se **um oportunista agressiva e inespecífico**.
- Em bioensaios **em casa de vegetação**, *Gigasporaceae* não foram encontradas colonizando **as** raízes do cafeeiro.
- **A** adubação verde pode não ser eficiente em aumentar o efeito biofertilizante da micorrização, devido a ocorrência de relações preferencias entre fungo e hospedeiro.

4 METODOLOGIA SIMPLIFICADA PARA ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE UM ÚNICO ESPORO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

4.1 Resuma

O desenvolvimento de **novas técnicas** de biologia molecular tem **facilitado** a **taxonomia** e estudos **ecológicos** dos fungos micorrízicos arbusculares (MA) através da **comparação** de seu DNA genômico amplificado **pela PCR** (Polimerase chain reaction). Diversos pesquisadores tem utilizado a PCR para amplificar regiões ITS (Internal transcribed **spacer**) do DNA ribossomal destes fungos **como uma técnica** auxiliar para sua **detecção** e **identificação** no solo ou em simbiose com **raízes** em **diferentes** ecossistemas. Entretanto, os métodos **pela** extração de DNA disponíveis são complicados e trabalhosos, de **difícil aplicação** quando se utiliza grande número de amostras. Neste trabalho relata-se um método **simples e rápido** para o isolamento de DNA genômico de **um único** esporo de fungos MA de diferentes **gêneros**. Com este método, o DNA genômico obtido foi de **qualidade** e em quantidade suficiente para a **reação** da PCR e a amplificação de fragmentos da região de ITS, usando **os** primers ITS **4 e 5**. Este procedimento mostrou-se altamente reproduzível. Fragmentos de PCR foram obtidos de **86 a 22%** dos esporos estudados, comprovando a eficiência do **método**. Tamanhos de fragmentos de DNA idênticos e de mesma seqüência parcial de DNA foram obtidos de muitos dos esporos, previamente selecionados por critérios **morfológicos**. Portanto, **acreditamos** que **este** procedimento **rápido e fácil** é ideal para projetos **que** objetivam **estudos** de dinâmica da população de fungos MA no solo visto que permite o estudo de grande número de amostras.

4.2 Summary: A SIMPLE METHOD FOR ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM A SINGLE SPORES OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI.

The development of new molecular techniques has facilitated taxonomic and ecological field studies of arbuscular-mycorrhizal fungi (AM) by comparison of amplified genomic DNA. Several researchers have been using PCR (Polimerase chain reaction) amplified ITS (Internal transcribed spacer) region of the ribosomal DNA as an auxiliary technique for identification of these fungi in the soil or in symbiosis in different ecosystems. Nevertheless, currently used methods for DNA extraction are very elaborate and thus difficult to apply with large sample numbers.

In this work, we thus report on a simple and quick method for isolation of genomic DNA from single spores of AM fungi of different genera. The obtained genomic DNA was of sufficient quality for PCR-amplification of the ITS-region using ITS 4 and 5 primers. The procedure was highly reproduceable. PCR fragments were obtained from 86 to 22 % of the investigated spores revealing the efficiency of the method. Identical DNA-fragment sizes and partial DNA sequences were obtained from most spores preselected by morphological criteria. This easy and quick procedure is thus ideally suited for large scale projects dealing with population dynamics of AM fungi in soil.

4.3 Introdução

A associação simbiótica entre fungos micorrízicos arbusculares (MA) e raízes de plantas é comum na natureza. Os efeitos positivos da inoculação de fungos MA em sistemas de cultivo agrícolas têm sido intensivamente demonstrados e comprovados e incluem melhoria do estado nutricional e efeitos benéficos na regulação do crescimento de plantas, redução nos efeitos provocados em plantas por estresses de natureza biótica (pragas e doenças) ou abiótica (déficit hídrico, nutricional ou térmico) e também melhor utilização e conservação dos nutrientes no sistema solo-planta.

Entretanto, a **utilização** destes fungos **a** nível comercial e também a realização de estudos mais aprofundados sobre fisiologia **e bioquímica** do **simbionte** e da **simbiose** tem sido dificultados devido **a** impossibilidade de cultivo destes microrganismos em sistemas artificiais (in-vitro), na ausência de raízes vivas. Esporos assexuados produzidos **no solo são a** principal fonte de inóculo e também **a base para** descrição taxonômica das aproximadamente 130 espécies identificadas (Morton & Benny, 1990). Atualmente, a identificação baseia-se em características **morfológicas e** estruturais dos esporos, **que** consome muito tempo **e** muitas **vezes não** é possível **porque estas características** podem **ser influenciadas por** condições ambientais ou mesmo por diferentes fases **de** maturidade dos **esporos** (Morton & Bentivenga, 1994).

O desenvolvimento de novas e **avançadas** técnicas **de** biologia molecular tem possibilitado estudos taxonômicos de fungos MA através da comparação de **seu** DNA genômico. **A** introdução **e aplicação da** técnica de amplificação **do DNA por** PCR (Polymerase chain reaction) White et al. (1990) reduziu **a** quantidade de **DNA** isolado necessária **para** estudos genéticos, permitindo **que** organismos de **difícil** multiplicação **e** obtenção de **DNA** como os fungos MA pudessem ser estudados. **A partir daí**, diversos **pesquisadores** tem utilizado a PCR como **técnica** auxiliar para identificação **destes** fungos no solo (Gardes & Bruns, 1993; Lanfranco et al., 1993; Henrion et al., 1992; Egger & Fortin, 1990) ou mesmo quando em simbiose colonizando **as raízes** (Simon et al., 1992; Bonito et al., 1995). em diferentes ecossistemas.

A partir da PCR, **dentre várias técnicas**, a utilização de primers específicos **que** permitem a **amplificação de** Fragmentos de **DNA** obtidos **a** partir da região ITS (Internal transcribed spacer) tem **sido usada para** estudar **as relações** filogenéticas entre **grupos de fungos**. Os primers universais ITS1 e ITS4 amplificam o **gene** 5.8S rRNA e duas regiões de **ITS** **que** flanqueiam este gene (White et al., 1990). O **gene** 5.8S é altamente conservado e tem possibilitado que **a análise das seqüências** da região ITS **seja** usada com **sucesso para** a identificação **de** relações filogenéticas **entre** fungos ectomicorrízicos (Gardes & Bruns, 1993; Bruns & Gardes, 1993; Gardes et al., 1991). **A** região ITS de *Pleurotus* tem uma **taxa** de substituição genética sete **vezes** maior **que** **aquela** da maior sub-unidade rRNA. e revelou variação genética entre isolados de diferentes localidades

geográficas. Para fungos MA, recentemente Sanders et al. (1995) relataram a observação de três seqüências de ITS em um único esporo de *Glomus mosseae*. Lloyd-Macgilp et al. (1996) confirmaram a ocorrência de seqüências heterogêneas de ITS em um mesmo esporo de fungo MA e não encontraram relações claras entre esta divergência genética e a morfologia dos esporos. Por outro lado, Zeze et al. (1996) publicou seqüências para *Scutellospora castanea* e tem descrito primers específicos para detecção destes fungos em raízes colonizadas.

Diante das dificuldades e potencialidades que a técnica da PCR representa para o estudo dos fungos MA, é importante o desenvolvimento ou adaptação de metodologias que facilitem o trabalho e tornem os resultados mais precisos. Nós utilizamos a maioria dos protocolos para extração de DNA de esporos publicados e observamos que são complexos, envolvendo a execução de diferentes procedimentos de centrifugação e ou aquecimento, utilizando diferentes soluções para extração tais como Tris Cl⁻ pH 8.0 (Sanders et al., 1995), tampão de extração CTAB (Lloyd-Macgilp et al., 1996) e Chelex para a retirada de íons da solução (Wyss & Bonfante, 1993; Harney et al., 1997). Também a quantidade de esporos utilizada para extração de DNA nos trabalhos publicados varia de 1 único esporo ou de grupos de 5 a 10 esporos (Wyss & Bonfante, 1993) para 10 esporos (Harney et al., 1997) ou até grupos de 20 a 60 esporos (Simon et al., 1992).

Neste trabalho relata-se o isolamento e amplificação com primers ITS de DNA de um único esporo de espécies de diferentes gêneros de fungos MA, a partir de uma metodologia simples, rápida e eficiente de extração, considerando que o DNA extraído de um único esporo pode permitir estudos de variações intra-específicas e também que, quanto mais simples e eficiente for o protocolo, maior será o rendimento do trabalho e menores serão as interferências sobre a amplificação e sequenciamento.

4.4 Material e Métodos

4.4.1 Os esporos de fungos MA

Utilizaram-se esporos de *Acaulospora* sp. provenientes da rizosfera de cafeeiros (*Coffea arabica* L.), *Scutellospora* sp. da rizosfera de *Crotalaria breviflora* e *Glomus* sp. e *Entrophospora* sp. provenientes da rizosfera de araucária (*Araucaria angustifolia* [Bert.] O. Ktze). Para as coletas de esporos no cafeeiro e leguminosas utilizou-se um experimento instalado no campo e conduzido a 10 anos pelo Instituto Agrônomo do Paraná, em Mirassol, PR. Os esporos provenientes da Araucária foram coletados na rizosfera de plantas cultivadas em substrato misto contendo solo e matéria orgânica (1:1 vol:vol) e conduzidos a 12 meses em casa de vegetação do Instituto de Botânica da Eberhard-Karls-Universität, em Tübingen, Alemanha. A campo, os esporos foram extraídos de amostras de solo compostas coletadas a profundidade de 0 a 20 cm sob a projeção da copa do cafeeiro e da Crotalaria. O solo inóculo foi seco ao ar e armazenado em sacos plásticos em câmara fria (6°C) até sua utilização. Em casa de vegetação os esporos foram obtidos de amostras de substrato coletadas diretamente no vaso de cultivo. Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963) e centrifugados em água a 300 rpm por 3 min e em sacarose 50% a 2000 rpm por 2 min. Após a extração os esporos foram lavados por quatro vezes em água destilada estéril e então submetidos ao ultra-som por trinta segundos, na potência máxima, para eliminar esporos velhos e também partículas de solo e microrganismos contaminantes aderidos superficialmente aos esporos. Para eliminar os debris resultantes da sonicação, os esporos são novamente lavados por quatro vezes em água destilada estéril e então selecionados morfológicamente. Os esporos foram selecionados baseando-se em critérios como cor, tamanho, forma, conteúdo visível e Forma da hifa de sustentação, de modo que aqueles de aparência similar formassem um grupo. Através deste critério foram selecionados esporos de *Scutellospora* sp, *Glomus* sp, *Entrophospora* sp. e *Acaulospora* sp. A escolha destes gêneros foi em função da maior disponibilidade de esporos no solo.

Observações sobre a morfologia externa dos esporos foram feitas em microscópio estereoscópio (aumento de 80x) com luz refletida. Somente esporos de forma globosa, de aparência saudável e com vacúolos visíveis foram selecionados dentro do mesmo grupo de esporos. Estes critérios puderam ajudar na seleção de esporos uma vez que são facilmente observáveis nestas espécies, mas podem não ser aplicáveis a outras espécies como por exemplo algumas scutellosporas de coloração escura. Esporos de forma irregular e com características diferentes foram eliminados.

4.4.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se um único esporo para um volume final de reação de 50µl. Com o auxílio de uma pinça de ponta ultra fina e sob microscópio estereoscópio de luz refletida, os esporos foram coletados individualmente e transferidos para 5µl de água estéril (Figura 1).

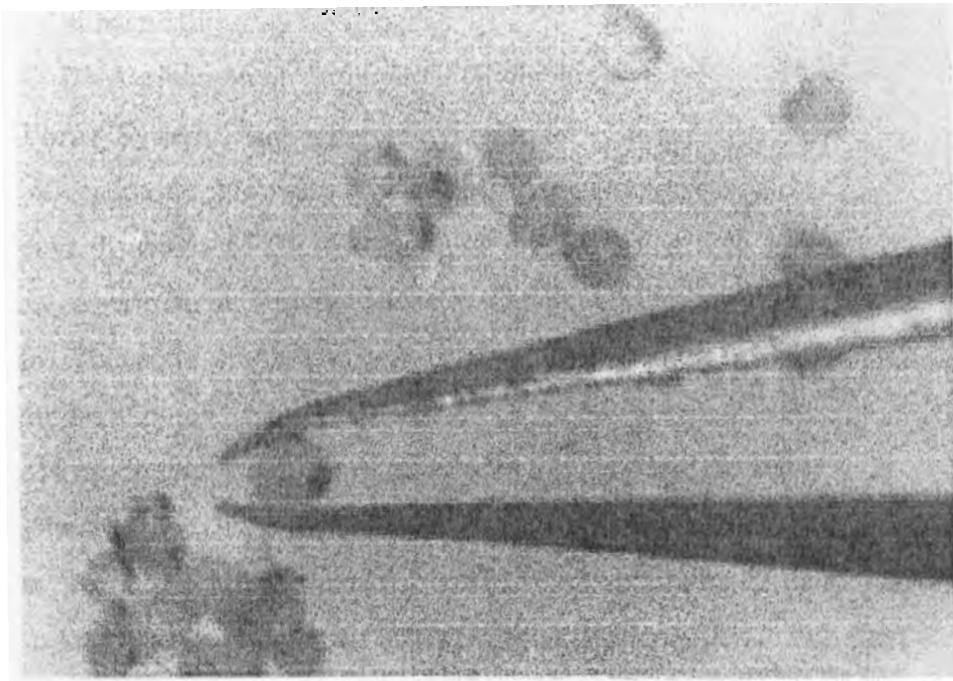


Figura 1. Esporo de *Scutellospora* sp sendo transferido para o mix da PCR com pinça de ponta ultra fina (Aumento de 20x).

Uma vez transferidos, foram então cuidadosamente quebrados com as pontas da pinça, garantindo a liberação de seu conteúdo na água, compondo então o extrato em. Este extrato contendo 5µl de água mais o protoplasma fúngico e pedaços de parede dos esporos foi então rapidamente coletado e colocado em tubos de microcentrífuga contendo o *mix para a* reação de PCR, completando o volume final da reação 50 µl. Nenhum tratamento ou procedimento adicional foi aplicado ao extrato cru ou a reação até esta ser colocada no termociclador para amplificação. Toda material utilizado para o manuseio dos esporos foi esterilizado. A água para obtenção do extrato cru deve ser bidestilada estéril.

A reação da PCR consistiu de 125 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer, 7,5 mM MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq* polymerase Goldstar (Eurogentec, Seraing, Belgica) sendo o tampão fornecido com a enzima e usado nas concentrações conforme as indicações do fabricante. Os primers ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 8MWG-Biotech, Ebersberg, Alemanha) foram utilizados combinados.

O DNA ribossomal da região ITS foi amplificado usando um termociclador Perkin-Elmer System 2400 programado para 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial. 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 50°C para anelamento, 1 minuto a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. Em todos os experimentos foram usados tratamentos controle onde nenhum DNA foi colocado. Todos os tubos e materiais utilizados na composição das soluções e no manuseio dos esporos foram esterilizados.

Os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.4%. Os fragmentos de DNA resultantes foram visualizados através de coloração com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.. Os produtos da PCR foram purificados usando o kit Quiagen para purificação (Quiagen. Hilden. Alemanha). Para subclonagem dos fragmentos da PCR foi usado o kit T-cloning (Promega, Madison, USA). O sequenciamento (Sanger et al., 1977) foi feito usando os primers ITS 4 e 5 e o kit para sequenciamento da Amersham (Branschweig, Alemanha), em sequenciador automático (ABI 373, Perkin Elmer, Forster City, USA).

4.5 Resultados

Usando o protocolo descrito foi possível obter um estrato cru que contém DNA em quantidades suficientes e de qualidade para amplificação. através da PCR, de fragmentos de DNA da região ITS de um único esporo de fungos MA.

A ciclagem e as concentrações dos componentes usados na PCR foram otimizadas testando-se diferentes reagentes em diferentes concentrações e condições de incubação, inclusive Taq-polymerases de diversos fornecedores (dados não apresentados). Foram obtidos melhores resultados com a Taq-polymerase "Goldstar" sob as condições descritas no material e métodos.

Interferências na amplificação freqüentemente causadas pelo uso de EDTA, SDS e outras combinações de substâncias químicas utilizados para extração de DNA foram eliminadas por este procedimento.

DNA de esporos diferentes mas de mesma espécie de fungos MA (de acordo com critérios morfológicos) apresentaram fragmentos de ITS de tamanhos quase idênticos, após eletroforese da DNA amplificado (Figura 2).

Somente para *Entrophospora* sp., dois esporos em 10 originaram fragmentos de ITS de tamanhos diferentes. Algumas variações na intensidade das bandas produzidas (Figura 2) e na freqüência de amplificações de ITS de esporos (Tabela 1) foram observadas.

Para *Scutellospora* sp., aproximadamente 81% dos esporos originaram fragmentos de ITS. A freqüência de amplificação destes fragmentos para *Entrophospora* sp., *Glomus* sp. e *Acaulospora* sp. foi de 86, 22, e 35% respectivamente (Tabela 1).

Os produtos da amplificação da região ITS revelaram diferenças no peso molecular entre gêneros de fungos MA. DNA de *Scutellospora* sp. resultou em fragmentos de PCR de aproximadamente 540 bases pares (bp), *Entrophospora* sp. e *Glomus* sp. aproximadamente 580 bp e *Acaulospora* sp. aproximadamente 560 bp. (Figura 2).

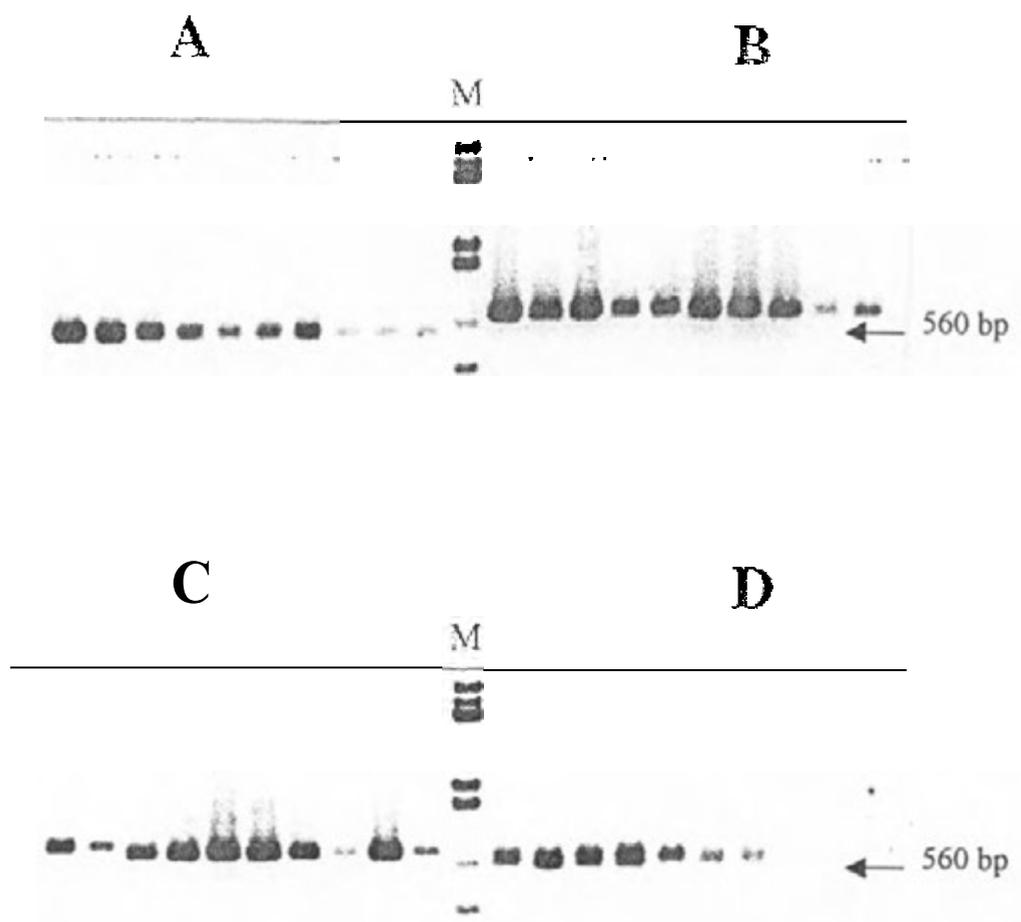


Figura 2. Produtos de amplificação de 10 PCRs obtidos a partir de extratos crus preparados de um único esporo de fungos micorrízicos arbusculares usando os primers de ITS 4 e 5 combinados. A = *Scutellospora* sp; B = *Glomus* sp ; C = *Entrophospora* sp; D = *Acaulospora* sp; M = marcadores (DNA de fago lambda digerido com *Hind*III e pBR322 digerido com *Mva*I).

A análise da seqüência dos fragmentos do DNA amplificado, obtida pelo sequenciamento direto dos fragmentos ou após subclonagem em um plasmídeo vetor, e o alinhamento com seqüências de ITS conhecidas e registradas em bancos de dados,

confirmaram a identificação morfológica dos gêneros de FMA estudados (dados não apresentados).

Tabela 1. **Freqüência de obtenção de produtos da PCR de DNA de um único esporo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), usando os primers ITS 4 e 5 combinados.**

FMA	Esporos, nº	Amplificações positivas, nº	Freqüência, %
<i>Scutellospora</i> sp.	32	26	81
<i>Entrophospora</i> sp.	44	38	86
<i>Glomus</i> sp.	36	8	22
<i>Acaulospora</i> sp.	43	15	35

4.6 Discussão

O estudo da dinâmica das populações de fungos MA é importante para o entendimento da simbiose endomicorrizica sob condições de campo.

Para contribuir com este estudo, métodos moleculares que possibilitam a identificação de espécies de FMA tem sido recentemente desenvolvidos. O ponto de partida foi o isolamento de DNA genômico de um único esporo ou grupos de 5 a 60 esporos (Simon et al., 1992; Wyss & Bonfante, 1993; Harney et al., 1997). Entretanto, a extração de DNA consistia-se, até o presente momento, em um processo laborioso, que consumia muito tempo e trabalho, usando procedimentos de extração complexos e caros (Sanders et al., 1995; Lloyd-Macgilp et al., 1996; Wyss & Bonfante, 1993; Harney et al., 1997).

Neste trabalho descreve-se um método extremamente simples, rápido e eficiente para extração de DNA de um único esporo de *Scutellospora* sp., *Acaulospora* sp., *Glomus* sp. e *Entrophospora* sp., capaz de permitir a amplificação de regiões de ITS através da PCR. Este método elimina a necessidade de procedimentos de aquecimento,

centrifugações e incubações em várias soluções como tem sido feito', sendo portanto ideal para estudos em larga escala de populações de FMA **em campo**.

Com *este* procedimento de extração de DNA observou-se diferenças na eficiência de amplificação de ITS entre espécies de FMA, produzindo-se fragmentos de PCR que variaram de 86% a 22% dos esporos investigados. Porém, não se observou correlação entre eficiência de amplificação e origem dos esporos. Para esporos isolados do campo (*Scutellospora* sp e *Acaulospora* sp), obtiveram-se taxas de amplificação de 81 e 35% respectivamente. Similarmente, de esporos obtidos de substratos em casa de vegetação (*Entrophospora* sp. e *Glomus* sp.) observou-se taxas de amplificação de 86 e 22%. respectivamente.

Também diferenças no tamanho dos esporos e portanto no número de núcleos, não puderam explicar a diferente eficiência de amplificação de ITS entre *Entrophospora* sp. e *Scutellospora* sp., que, com tamanho de esporos significativamente diferentes, resultaram em rendimento de amplificação de ITS de aproximadamente 85%. De acordo com Wyss & Bonfante (1993), a quantidade de DNA de fungos MA requerida para amplificação normalmente é muito pequena (15 a 20 pg) e um único esporo destes fungos contém em média aproximadamente 1.5 a 2.0 ng de DNA. Portanto, até mesmo os esporos de tamanho menor contêm DNA suficiente para a PCR, e não deveriam apresentar frequências baixas de amplificações positivas.

Sobre a grande variação em eficiência de amplificação de regiões de ITS entre espécies (Tabela1) assume-se duas razões principais:

- 1) A variabilidade na viabilidade dos esporos de diferentes espécies de fungos MA no solo (isso não foi determinado antes da execução da PCR) ou
- 2) Inibidores contidos nos extratos de esporos. Fatores de solo tais como íons aderidos superficialmente aos esporos podem agir como inibidores da PCR, como sugerido por vários autores. Eles recomendam a uso de resinas para a eliminação de íons de solo presentes no extrato (Wyss & Bonfante, 1993; Bonito et al, 1995). Porém, obteve-se taxas de amplificação excelentes e baixas no mesmo solo. sem a adição de resinas ou qualquer outro componente no extrato. Assim, provavelmente as baixas taxas de

amplificação de regiões de ITS observadas **para** *Glomus* sp. e *Acaulospora* sp. estejam relacionadas a presença de inibidores espécie-dependentes internos.

O **uso** do ultra-som nos esporos por 30 segundos foi eficiente para livrar os **esporos** de partículas de solo e microorganismos aderidos **superficialmente**. Este procedimento **é importante e necessário porque** os esporos **não** foram superficialmente desinfestados antes **de** extração do **DNA**.

Soluções esterilizantes como **Cloramina-T** ou o antibiótico **estreptomicina** podem inibir **a** reação de PCR (Sanders et al., 1995) **além** de **não** serem suficientemente eficientes **para** eliminarem os **BLO's** (Bacterial like organisms) freqüentemente presentes no citoplasma **de** fungos MA (Scannerini & Bonfante, 1991). Contaminantes de **esporos** tem **sido** citados como **produtores de fragmentos** de ITS de tamanhos diferentes dos observados em fungos MA (Sanders et al., 1995). A possibilidade que **contaminantes** produzam **fragmentos** de ITS do mesmo **tamanho daqueles** produzidos por **fungos MA e que estes produtos** de amplificação se confundam com os de fungos MA parece **pouco** provável uma **vez que o DNA** de **possíveis contaminantes** representa uma pequena **parte** de DNA total do **esporo**, tendo portanto menor possibilidade **de amplificação**. Nos experimentos descritos **aqui**, não se encontrou **amplificações de DNA** de contaminantes uma **vez que** nenhuma banda dupla foi observada nos **géis**. **Além** disso, **a** análise do **sequenciamento de** fragmentos de **ITS** do **DNA** amplificado **e o** alinhamento destes resultados **cum** seqüências **de ITS** descritas **em** bancos de dados confirmaram a identificação morfológica dos **FMA** estudados.

Como **outros** autores (Sanders et al., 1995; Lloyd-Macgilp et al., 1996), neste trabalho também se observou variabilidade **genética na seqüência** de ITS amplificada de um **único** esporo. Fragmentos **de ITS** amplificados de *Scutellospora* sp., por exemplo, precisaram ser subclonados **para** se obter **uma seqüência clara**.

Portanto, com a metodologia descrita neste trabalho pode-se, de maneira simples, auxiliar na identificação de **fungos MA** e acelerar **os** estudos de populações **destes** fungos em condições de **campo**, utilizando-se técnicas de biologia molecular.

4.7 Conclusões

- A metodologia desenvolvida para extração de DNA de fungos micorrízicos arbusculares permite a extração de DNA de um único esporo, de forma rápida e de maneira simplificada.
- O DNA de fungos micorrízicos arbusculares obtido através da metodologia de extração desenvolvida neste trabalho é de qualidade e em quantidade suficiente para amplificação e sequenciamento.
- A eficiência da amplificação de fragmentos de DNA através da PCR varia em função da espécie de fungo micorrízico arbuscular.

5 OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CAFEIEIRO (*COFFEA ARABICA* L.) CULTIVADO COM *CROTALARIA* *BREVIFLORA* NA ENTRELINHA E SUA DETECÇÃO EM RAÍZES ATRAVÉS DA PCR

5.1 Resumo

Avaliou-se a ocorrência e a frequência de ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (MA) no solo rizosférico e nas raízes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e de *Crotalaria breviflora* cultivada na entrelinha como adubo verde. Amostras de solo rizosférico e raízes foram coletadas em julho de 1997, em parte de um experimento de longa duração conduzido a campo pelo Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR, no município de Mirassol, PR. O experimento está instalado a 10 anos, em uma Área de latossolo vermelho escuro distrófico (LEd) onde, nas linhas principais cultiva-se o cafeeiro 'Catuaí Amarelo' e nas entrelinhas as leguminosas Leucena (*Leucaena leucocephala*), *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, Mucuna cinzenta (*Stizolobium pruriens*), Mucuna anã (*Stizolobium deeringianum*), Amendoim cavalo (*Arachis hipogaeae*) e Caupi (*Vigna unguiculata*), para fins de adubação verde. O delineamento experimental é de blocos ao acaso com 3 repetições. Para este trabalho utilizou-se somente o tratamento de adubação verde do cafeeiro com *Crotalaria breviflora* e o controle. Determinou-se a diversidade de espécies de fungos MA através da identificação morfológica dos esporos, a frequência de ocorrência de populações de fungos MA através da contagem direta de esporos no solo e a colonização radicular. Para identificar os fungos MA em raízes do cafeeiro extraiu-se DNA de esporos coletados na rizosfera e de raízes de cafeeiro colonizadas, realizando-se a PCR (Polimerase chain reaction) com primers ITS (Internal transcribed spacer) e comparando os perfis das bandas obtidas.

O cultivo de *Crotalaria breviflora* na entrelinha do cafeeiro aumentou a concentração de esporos de fungos MA na rizosfera do cafeeiro. Cafeeiro e *Crotalaria*

breviflora estimularam populações de fungos MA diferentes. Fungos MA dos gêneros *Acaulospora* predominaram na rizosfera da cafeeiro e *Scutellospora* e *Gigaspora* na rizosfera dm leguminosas. Usando técnicas moleculares foi possível caracterizar fungos na rizosfera e nas rakes colonizadas do cafeeiro, o que pode auxiliar no estudo da dinâmica destes fungos a campo. O fungo micorrízico *Scutellospora gilmorei*, de ocorrência comum em cafeeiro e em *Crotalaria breviflora*, não foi encontrado colonizando as raízes do cafeeiro.

5.2 Summary: OCCURRENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN COFFEE (*COFFEA ARABICA* L.) INTERCROPPED WITH *CROTALARIA BREVIFLORA* AND DETECTION OF THESE FUNGI IN ROOTS USING PCR

The sporulation and occurrence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi was evaluated in the coffee trees (*Coffea arabica* L.) and *Crotalaria breviflora* rhizosphere and roots. *Crotalaria breviflora* is intercropped for green manure between rows of the coffee plants. Samples of rizosphere soil and roots were collected in July of 1997, in a long time experiment localized at the Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, in Mirassolva. PR. The AM diversity was determined through the morphologic identification of spores, the AM occurrence frequency by the direct counting of spores in the soil and the root colonization evaluated with the grid-line method using stained roots. To identify AM in coffee roots, DNA from spores collected in the rizosphere and from colonized coffee roots was extracted and used for PCR (Polimerase chain reaction) with ITS (Internal transcribed spacer) primers, comparing the obtained bands.

The legume intercropping cultivation increased the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in the soil. Coffee plants and *Crotalaria breviflora* stimulated populations of different AM fungi in their rhizospheres. *Scutellospora* spp. and *Gigaspora* spp. were more abundant at the legume rizosphere. *Acaulospora* spp. occurred more often in coffee plant rhizospheres. Using molecular techniques, it was

possible to characterize AM fungi in the rhizosphere and in the colonized roots of the coffee plants. which is of great help in the study of AM fungal dynamics in the field. *Scutellospora gilmorei*, of common occurrence in coffee plants and *Crotalaria breviflora*, was not found colonizing the roots of coffee plants.

53 Introdução

As micorrizas arbusculares (MA) são associações simbiotróficas entre fungos da ordem Glomales e raízes da maioria das plantas vasculares. As MA atuam como um complemento do sistema radicular da planta hospedeira, capaz de aumentar a absorção de P e outros nutrientes, promover a proteção das plantas contra patógenos e desencadear no hospedeiro diversos outros efeitos ainda não de todo compreendidos.

A simbiose micorrízica é particularmente importante para o cafeeiro porque este apresenta elevada dependência aos fungos MA na fase de produção de mudas (Siqueira & Colozzi Filho, 1986). Entretanto, as informações sobre a ocorrência de fungos MA em cafeeiros adultos não inoculados e em produção, mostram a predominância de espécies indígenas de baixa eficiência simbiótica (Fernandes, 1987; Balota & Lopes, 1996a). Espécies selecionadas eficientes normalmente não ocorrem no campo (Lopes et al., 1983a) e quando introduzidas via inoculação, têm dificuldade de permanecer no agrossistema (Balota & Lopes, 1996a). Através do manejo das culturas é possível aumentar a diversidade de espécies e o potencial de inóculo natural do solo (Baltruschat & Dehne, 1988), promovendo população de fungos MA diversificada no solo e maior sustentabilidade do agrossistema (Bethlenfalvay & Linderman, 1992).

Leguminosas fixam nitrogênio, são micorrízicas e desenvolvem-se bem em solos com baixos teores de P (Cardoso, 1985; Herrera et al., 1984). O seu cultivo na entrelinha do cafeeiro para fins de adubação verde pode promover aumento na densidade de raízes por unidade de área, devido ao crescimento vigoroso de seu sistema radicular, o que estimula a micorrização, aumenta a diversidade de espécies de fungos MA e o potencial infectivo natural do solo. Esta prática de agricultura sustentável pode

evitar que o monocultivo selecione espécies de fungos MA pouco eficientes, conforme citado por Johnson & Pflieger (1992).

Entretanto, além de aumentar a diversidade de espécies e o potencial de inóculo natural, as leguminosas devem também ser capazes de introduzir no agrossistema espécies de fungos MA que sejam efetivas em colonizar e eficientes em promover os benefícios da micorrização no cafeeiro.

O estudo de ocorrência e dinâmica das populações de fungos MA no solo é um desafio devido à dificuldade de identificação destes fungos, tanto livres no solo como internamente às raízes. Estudos com culturas armadilha são difíceis de serem executados e muitas vezes fornecem resultados não conclusivos. Este desafio entretanto está sendo vencido com o auxílio de novas técnicas de biologia molecular. Estas técnicas tem permitido identificar fungos a partir de esporos coletados diretamente do campo e também identificar fungos MA colonizando raízes de plantas (Bonito et al., 1995)

Análises de fragmentos de restrição de DNA amplificadas por PCR (Polimerase chain reaction) são uma ferramenta poderosa que permitem a detecção de moléculas de ácidos nucleicos específicos presentes em pequenas quantidades (Steffan & Atlas. 1991) e tem sido aplicada com sucesso na identificação de fungos MA. O uso da PCR com primers que flanqueiam a região genômica do ITS (Internal transcribed spacer) (Redecker et al., 1997) ou mesmo primers específicos como os desenvolvidos para *Glomus mosseae* (Lanfranco et al., 1995) e para *Scutellospora castanea* (Zeze et al., 1996), tem permitido a identificação taxonômica destes fungos sem os problemas de variações nos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional. Estas técnicas também tem sido aplicadas como ferramentas auxiliares para a identificação de fungos MA internamente às raízes (Bonito et al., 1995; Edwards et al., 1997).

Neste trabalho estudou-se a composição das populações de fungos MA, sua esporulação e frequência de ocorrência na rizosfera do cafeeiro e da *Crotalaria breviflora* cultivada na entrelinha como adubo verde, e a colonização radicular do cafeeiro. utilizando-se metodologias tradicionais de identificação de espécies e também através da PCR com primers de ITS.

5.4 Material e Métodos

Este estudo foi realizado em amostras de solo rizosférico e rakes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e de *Crotalaria breviflora*, cultivados a campo, como parte de um experimento de longa duração que tem como objetivo estudar os efeitos do cultivo intercalar de adubos verdes sobre as propriedades do solo e a produtividade do cafeeiro.

Este experimento vem sendo conduzido desde 1988 pelo Instituto Agrônomo do Paraná- IAPAR, no município de Mirassolva, PR, e está instalado em uma área de latossolo vermelho escuro distrófico (LEd) cujo solo apresentava as seguintes características químicas na época da amostragem:

	pH	C	P	K	Ca	Mg	Al
		g dm ⁻³	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³ de solo		
Cafeeiro	3,90	7,87	28,55	0,17	0,7	0,48	
Leguminosas	5,11	7,97	4,8	0,21	1,9	1,14	0,0

No experimento cultiva-se o cafeeiro 'Catuaí Amarelo' nas linhas principais e nas entrelinhas as leguminosas Leucena (*Leucaena leucocephala*), *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, Mucuna cinzenta (*Stizolobium pruriens*), Mucuna anã (*Stizolobium deeringianum*), Amendoim cavalo (*Arachis hipogaeae*) e Caupi (*Vigna unguiculata*) para fins de adubação verde. Como controle cultiva-se o cafeeiro na limpo. O delineamento experimental C de blocos ao acaso com 3 repetições. O cafeeiro C cultivado no espaçamento 4,0 x 2,0 m por cova de 2 plantas e cada parcela possui 32 covas (4 linhas de 8 covas), sendo as 8 plantas centrais a área útil da parcela. Para as leguminosas, a data de semeadura é na primeira quinzena de outubro e a densidade de sementes varia em função da espécie. Por ocasião da floração, que ocorre em épocas diferentes para cada espécie, as leguminosas são cortadas, deixando-se os resíduos amontoados na área para cobertura do solo e decomposição. No controle são feitas capinas manuais durante o ano, sempre que necessário

Para as avaliações, em julho de 1997 coletaram-se amostras nos tratamentos: a) cafeeiro cultivado com *Crotalaria breviflora* como adubo verde na entrelinha; h)

Controle (cafeeiro cultivado sem adubo verde na entrelinha) e também na linha de cultivo da leguminosa *Crotalaria breviflora*, cultivada como adubo verde para o cafeeiro.

Foram coletadas 3 amostras compostas por tratamento (4 sub-amostras por parcela), a uma profundidade de 0 a 20 cm, contendo aproximadamente 1 kg de solo rizosférico e raízes. Para o cafeeiro, as subamostras foram coletadas em 4 pontos equidistantes sob a projeção da copa e orientados para as direções norte, sul, leste e oeste. Na *Crotalaria breviflora* as sub-amostras foram coletadas alternadas na linha de plantio.

Do material amostrado (solo e raízes), 100g de solo foram utilizadas para análises químicas de rotina (pH, C, P, K, Ca, Mg e Al) e 50g de solo para determinações quantitativas (número de esporos) e qualitativas (diversidade de espécies) de fungos MA.

As raízes foram invadidas e coradas com azul de tripano para determinação da colonização radicular e extração de DNA.

5.4.1 Esporos de fungos MA

Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963) e centrifugados em água a 3000 rpm por 3 min e em sacarose 50% a 2000 rpm por 2 min. Após a extração, estes foram lavados por quatro vezes em água destilada estéril e então submetidos ao ultra-som por trinta segundos, na potência máxima, para eliminar esporos velhos e também partículas de solo e microrganismos contaminantes aderidos superficialmente, sendo então novamente lavados por quatro vezes em água destilada estéril.

Para as determinações qualitativas (identificação de espécies) e quantitativas (contagem) os esporos foram fixados com PVL (Polivinil-alcool) em lâminas microscópicas e observados em microscópio óptico composto. A identificação das espécies foi feita baseando-se em critérios morfológicos, conforme Schenck & Perez (1987) e Morton & Beny (1990).

Para extração de DNA, esporos de *Acaulospora longula* e *Scutellospora gilmorei*, observados na rizosfera do cafeeiro, foram obtidos em uma nova extração e separados por espécie do restante da população de MA, sob microscópio estereoscópio

(aumento de 80x) com luz refletida. Os esporos foram selecionados pela aparência externa, considerando-se a coloração uniforme, forma globosa regular e ausência de solo aderido externamente. Esporos com características discrepantes foram descartados.

O DNA foi extraído através da quebra de um único esporo em 5 µl de água estéril, garantindo a liberação de todo seu conteúdo na água para formação do extrato cru, que foi rapidamente colocado no mix para a reação de PCR, conforme detalhado no capítulo 4 desta tese,

5.4.2 Raízes

Raízes do cafeeiro foram separadas do solo rizosférico em água corrente e lavadas. Para a determinação da colonização radicular por fungos MA as raízes foram aquecidas a 60°C em KOH 10% por 10 minutos para clarificação; lavadas em água destilada 4 vezes, acidificadas com HCl 1% por 2 minutos e fervidas por 10 minutos em solução de glicerol-ácido + azul de tripano 0,05% (Phillips & Hayman, 1970). A determinação da percentagem de colonização radicular foi feita em microscópio, pelo método da placa quadriculada, segundo Giovannetti & Mosse (1980).

Para extração do DNA de raízes do cafeeiro, coletaram-se 50 mg de raízes colonizadas ou não nas amostras compostas representativas de cada repetição. As raízes foram selecionadas em microscópio composto, sendo a colonização evidenciada pela presença de arbúsculos e/ou vesículas coradas em azul de tripano. Na seleção procurou-se amostrar diferentes tipos de micélio interno (fino e grosso) ou mesmo a presença de vesículas. O DNA foi extraído segundo metodologia proposta por Bonito et al. (1995) onde, para a retirada de água as raízes foram centrifugadas a 12000 g durante 1 min. e então maceradas em 800 µl de tampão de extração (Tris-HCl 1M, pH 8,5). Ao extrato foi adicionada a resina Chelex 100, a uma concentração final de 5% do volume do tampão de extração. A mistura foi homogeneizada em vórtex e então fervida em banho-maria por 15 min. A resina e os fragmentos das raízes foram removidos por centrifugação a 12000 g por 30 seg., coletando-se o sobrenadante. O material foi imediatamente utilizado ou então armazenado a -20°C. Para a PCR foram feitas séries de diluições em água com concentrações de 1:EO a 1:10.000 (vol:vol).

5.4.3 PCR de DNA de esporos e raízes

A reação da PCR consistiu de 5µl do extrato em contendo DNA de esporos ou raízes, adicionados ao mix para um volume final de 50µl. A concentração final na reação foi 125 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer, 7,5 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq* polymerase Goldstar (Eurogentec, Seraing, Bélgica), sendo o tampão fornecido com a enzima e usado nas concentrações conforme indicações do fabricante. Os primers ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (MWG-Biotech, Ebersberg, Alemanha) foram utilizados combinados,

O DNA ribossomal da região ITS foi amplificado usando um termociclador Perkin-Elmer System 2400 programado para 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 50°C para melamento, 1 minuto a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. Em todos os experimentos foram usados tratamentos controle onde nenhum DNA foi colocado. Todos os tubos e materiais utilizados na composição das soluções e no manuseio foram esterilizados.

Os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Os fragmentos de DNA resultantes foram visualizados através de coloração com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

Os dados de produção de esporos foram tabulados e analisados segundo sua distribuição de frequência

5.5 Resultados

A ocorrência de fungos MA, a esporulação no solo e a frequência de ocorrência de fungos MA na rizosfera do cafeeiro e de *Crotalaria breviflora* são apresentados na Tabela P.

Tabela 1. Ocorrência, esporulação no solo (E) e frequência de ocorrência (F) de fungos micorrízicos arbusculares em solo cultivado com Cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e com *Crotalaria breviflora* na entrelinha para adubação verde, Média de 3 repetições.

Fungos micorrízicos	Cafeeiro		<i>Crotalaria breviflora</i>		Controle	
	E ¹	F ² ,%	E	F,%	E	F,%
<i>Scutellospora gilmorei</i>	26	20	48	45	3	4
<i>S heterogama</i>		-			3	4
<i>Gigaspora margarita</i>	-	-	9	9	-	
<i>Gi.decipiens</i>		-	29	27		-
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	26	20	9	9	3	4
<i>A appendicula</i>	-	-	11	10	7	11
<i>A.longula</i>	49	38	-	-	13	20
<i>A.spinosa</i>		-		-	14	26
<i>Acaulospora sp</i>	6	5	-	-	-	-
<i>Glomus diaphanum</i>	28	22	-	-	19	31
Total	128	100	106	100	62	100

1 = número de esporos "50g solos"; 2 = Porcentagem de ocorrência sobre o total de esporos observados na tratamento.

Foram observadas 10 espécies de fungos MA na área, que são: *Scutellospora gilmorei*, *S.heterogama*, *Gigaspora margarita*, *Gi.decipiens*, *Acaulospora scrobiculata*, *A.longula*, *A.spinosa*, *A.appendicula*, *Acaulospora sp*. e *Glomus diaphanum*. Entretanto, apenas 5 das 10 espécies foram observadas no cafeeiro e 5 na Crotalária. No cafeeiro ocorreram *S.gilmorei*, *A.scrobiculata*, *A.longula*, *Acaulospora sp*. e *G.diaphanum*, com maior ocorrência de esporos dos gêneros *Acaulospora* (60% sobre o total). Na crotalária ocorreram *S.gilmorei*, *Gi.margarita*, *Gi decipiens*, *A.scrobiculata* e *A.appendicula*, com maior frequência de ocorrência de esporos dos gêneros *Scutellospora* e *Gigaspora*, que somados representaram 81% sobre o total (Tabela 1). No cafeeiro sem adubo verde foram observadas 7 espécies: *S.gilmorei*, *A.scrobiculata*, *A.longula*, *A.appendicula*,

A.spinosa e *G.diaphanum*, sendo a mais freqüente, *Acaulospora* com 61% de freqüência de ocorrência.

A.longula, *Acaulospora* sp. e *Glomus* sp foram observados somente em cafeeiro, sendo *A.longula* com freqüência de ocorrência superior a de todos os outros componentes das populações (36%). *Gi.margarita*, *Gi.decipiens* e *A.appendicula* foram observados apenas na Crotalária. Entretanto, nesta. o fungo MA de maior ocorrência foi *S.gilmorei* (45%), que também foi observado no cafeeiro com 19% de freqüência de ocorrência (Tabela 1). A esporulação dos fungos MA, na rizosfera do cafeeiro com adubo verde e na rizosfera da Crotalária, foi maior que no controle.

Os produtos da PCR de DNA genômico de *A.longula*, espécie que mostrou ocorrência especifica no cafeeiro, e *S.gilmorei*, de ocorrência comum mas com freqüência de ocorrência maior na Crotalária, são apresentados na Figura 1.

Observaram-se fragmentos de DNA de peso molecular diferente para as duas espécies de fungo MA estudadas. *A.longula* apresentou fragmentos amplificados de aproximadamente 580 bases pares (bp) e *S.gilmorei* de aproximadamente 540 bp. As amplificações obtidas de esporos diferentes. mas da mesma espécie, apresentaram bandas com o mesmo peso molecular, mas de intensidades diferentes.

Testes de diluição com extratos crus obtidos de raízes de cafeeiro colonizadas e não colonizadas por fungos MA mostraram que, para o extrato obtido e nas condições do experimento. a melhor diluição para se obter produtos de amplificação de PCR usando primers ITS 4 e 5 foi a diluição 1:100 (Figura 2). Entretanto, a freqüência de amplificações positivas foi baixa (dados não apresentados). Extratos não diluído ou diluído de 1:1000 não apresentaram amplificações. Em todas as PCR realizadas não se observaram amplificações em extratos de raízes não colonizadas e na testemunha (sem DNA).

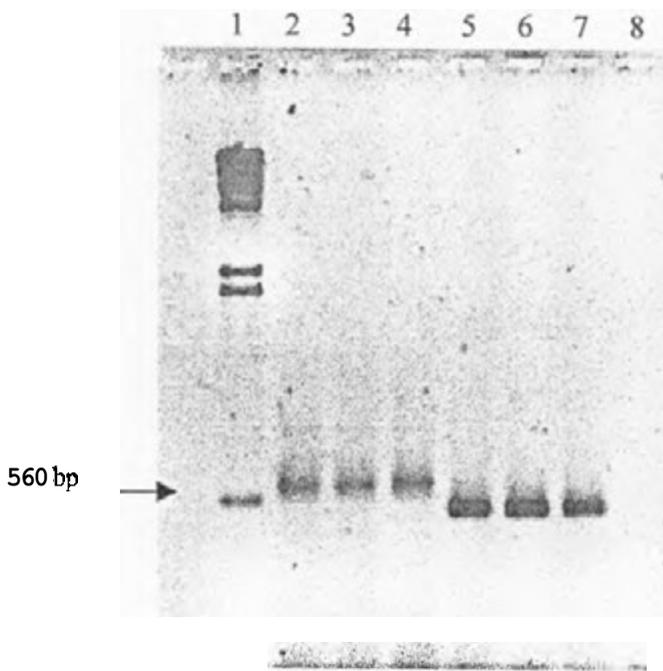


Figura 1. Produtos de amplificação de PCR com “primers” ITS 4 e 5 combinados, usando 3 extratos crus obtidos de esporo único de fungos micorrízicos arburculares. Linha 1, marcador molecular *h* digerido com *Hind*III; Linhas 2 a 4, *Acaulospora longula*; linhas 5 a 7, *Scutellospora gilmorei*. e linha 8, Controle.

Produtos da amplificação de fragmentos de DNA de esporos de *A.longula* e de raízes de cafeeiros colonizadas, usando primers de ITS 4 e 5 combinados, mostraram padrão de bandeamento semelhante e este padrão foi completamente diferente do observado para esporos de *S.gilmorei* (Figura 3). Fragmentos de DNA amplificados de *A.longula* e de raízes colonizadas apresentaram aproximadamente 580 bp. *S.gilmorei* apresentou segmentos amplificados de aproximadamente 540 bp, portanto diferente das raízes colonizadas. Para estas raízes observou-se também uma segunda banda, de peso

molecular ligeiramente superior ao observado para *A. longula*. Raízes não colonizadas e a testemunha sem DNA não apresentaram amplificação.

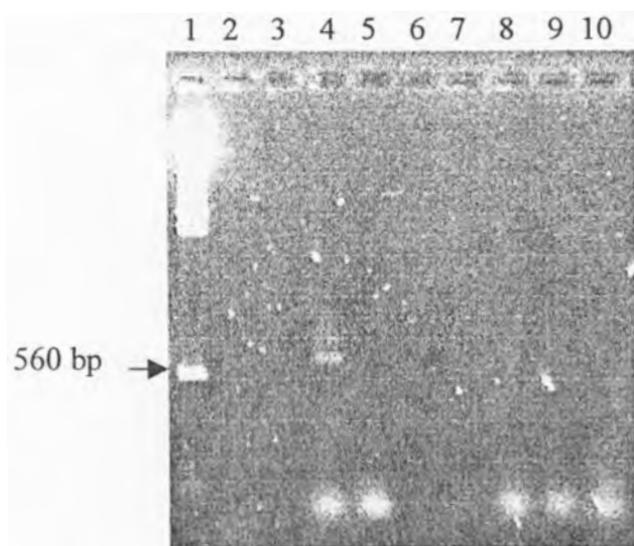


Figura 2. Produto da amplificação de PCR usando os primers ITS 4 e 5 combinados, obtidos de extrato cru de raízes de cafeeiro colonizadas ou não, em diferentes diluições (vol.:vol.). Linha 1, marcador molecular *h* digerido com *Hind*III; **Linha 2**, Raízes colonizadas (C) sem diluição; **Linha 3**, C 1:10; **linha 4**, C 1:100; **linha 5**, C 1:1000; **linha 6**, Não colonizada (NC) sem diluição; **linha 7**, NC 1:10; **linha 8**, NC 1:100; **linha 9**, NC 1:1000; **linha 10**, Controle (sem DNA e sem diluição).

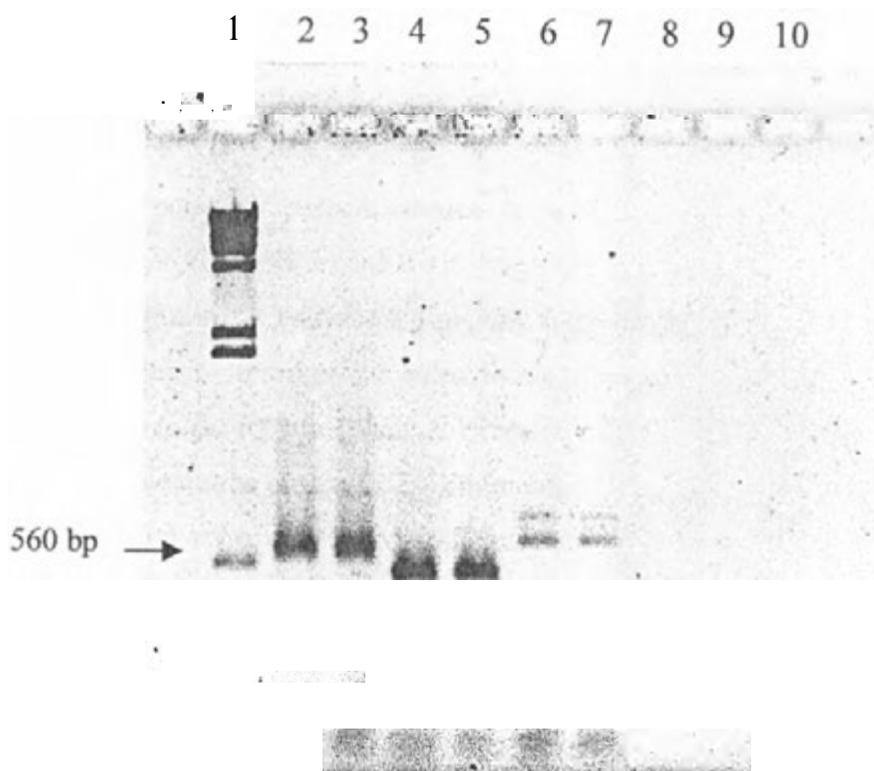


Figura 3. Produto de amplificação de PCRs obtidos de extrato cru de esporo único de fungos micorrízicos arbusculares e de raízes de café colonizadas ou não, usando os primers ITS 4 e 5 combinados. Linha 1, marcador molecular *h* digerido com *Hind*III; Linhas 2 e 3, *Acaulospora longula*; Linhas 4 e 5, *Scutellospora gilmorei*; Linhas 6 e 7, extrato de raízes colonizadas (dil. 1:100); Linhas 8 e 9, extrato de raízes não colonizadas (dil. 1:100); Linha 10, Controle (sem DNA e sem diluição).

5.6 Discussão

O cultivo de leguminosas altamente micorrízicas pode aumentar o potencial de inóculo de fungos MA no solo tanto da região do cultivo como também de áreas vizinhas, e isto pode ser particularmente importante em situações de monocultivos permanentes, como é o caso do cultivo do café e de citros. Potencial de inóculo natural do solo é o conjunto de estruturas fúngicas (esporos, células auxiliares vesículas e fragmentos de hifas) presentes no solo, livres ou associadas à matéria orgânica ou agregados, capazes de infectar plantas, promover colonização radicular e estabelecer micorrizas. Monoculturas prolongadas diminuem o potencial de inóculo natural do solo e a diversidade de espécies de FMA. Segundo Johnson et al, (1992), monoculturas contínuas têm efeito negativo sobre o potencial de inóculo de fungos MA porque geralmente selecionam espécies mais adaptadas ao agrossistema, mas de eficiência simbiótica menor. Smith (1980) observou redução no potencial de inóculo de fungos MA após cultivo permanente com trigo. Entretanto, este efeito se reverteu gradualmente após três rotações na área com pastagens.

Baltruschat & Dehne (1988) relatam efeito semelhante sobre o potencial de inóculo de FMA em solos cultivados continuamente com trigo. Neste trabalho os autores relatam também que o uso de adubação verde com plantas não micorrízicas (*Brassica napus* e *Raphanus sativus*) teve efeito negativo ainda maior sobre o potencial de inóculo de FMA. Nossos resultados mostram que o cultivo de leguminosas altamente micorrízicas na entrelinha de plantio do cafeeiro aumentou a concentração de esporos de fungos MA, tanto na entrelinha quanto na linha de plantio do cafeeiro. É possível que este aumento na concentração de esporos ocasione também aumento no potencial de inóculo natural do solo. Entretanto, isto não foi avaliado neste experimento.

Além de características de solo, a compatibilidade entre os simbiontes precisa ser considerada como um fato decisivo para a micorrização e a permanência de fungo no agrossistema. Segundo Abbott & Robson (1991), a abundância de fungos micorrízicos nos ecossistemas naturais está relacionada à abundância de espécies de plantas, bem como ao nível de infecção das raízes destas plantas. Gomes-da-Costa (1993) estudando

soja e milho cultivados em monoculturas ou rotação, observou mudanças quantitativas e qualitativas na comunidade de FMA relacionadas às plantas hospedeiras. *Scutellospora coralloides*, *S.calospora* e *S.heterogama* foram observadas apenas na rizosfera de milho em monocultura, sendo eliminadas do solo quando a soja foi cultivada em rotação (Gomes-&Costa, 1993). *Gigaspora ramisporophora*, foi favorecida pela soja cultivada em monocultura. *A.longula* não apresentou especificidade de hospedeiro, não sendo afetada pelo manejo. Neste trabalho em discussão, observou-se a ocorrência de *Gi.margarita* e *Gi.decipiens* apenas na Crotalária e *A.longula* com alta frequência (36%) apenas no cafeeiro. Entretanto, *S.gilmorei* foi observada com alta frequência em Crotalária (45%) e também no cafeeiro (19%), cultivado adjacente (Tabela 1).

Através da análise de fragmentos de restrição de ITS amplificados pela PCR foi possível detectar que *S.gilmorei*, embora presente na rizosfera do cafeeiro, não estava de fato colonizando suas raízes.

A análise de fragmentos de restrição de ITS tem sido citada como uma valorosa ferramenta para caracterização de fungos (Gardes et al., 1991; Henrion et al., 2004; Lee & Taylor, 1992; Zambino & Szabo, 1993) e também de *Glomales*, a nível de gênero ou espécie (Redecker et al., 1997). Para *Glomales*, entretanto, as seqüências de ITS tem se mostrada em alguns casos heterogêneas, como por exemplo em esporos de *Glomus mosseae* (Lloyd-MacGillp, 1996; Sanders et al., 1995) e *Gigaspora* sp. (Redecker et al., 1997). Por isso, tem sido também sugerido o uso de primers de ITS específicos (Abbas et al., 1996). Entretanto, como *S.gilmorei* foi a única scutellospora observada no cafeeiro, as diferenças no padrão de bandas observadas foram suficientes para se poder concluir que *S.gilmorei* não estava colonizando as raízes do cafeeiro, sem a necessidade de análises complementares usando primers específicos.

No estudo de raízes, testes das amostras de extrato de raízes de cafeeiro colonizadas ou não indicaram a necessidade de diluições e do uso da resina Chelex. Diluições são procedimentos frequentemente utilizados em PCR para tentar otimizar a relação primer:concentração de DNA para que os sítios de anelamento se adequem à concentração de primers utilizada. Diluições de amostras também são eficientes em eliminar inibições da PCR por substâncias fenólicas, polissacarídeos ou ácidos húmicos,

que têm sido frequentemente encontrados em associação com DNA de tecidos de plantas e associados com inibições da PCR (Bentivenga & Morton, 3994; Egger & Sigler, 1993). Chelex é uma resina catiônica capaz de eliminar contaminantes de solo capazes de inibir a PCR. O uso do Chelex, associado às diluições, foi suficiente para eliminar essas inibições.

Somente *A.longula* foi detectada em amostras de raízes de cafeeiro contendo 68% de colonização. *A.longula* e *S.gilmorei* nunca foram detectadas em segmentos de raízes não colonizadas e no controle. Produtos não específicos, entretanto, foram amplificados nas amostras de raízes colonizadas. A presença destes produtos de DNA em raízes colonizadas indicam a presença de outra espécie de fungo MA colonizando as raízes ou então que os primers não foram taxon-específicos e puderam amplificar DNA não micorrízico. Entretanto, essa observações não foram estudadas.

Com a técnica utilizada foi possível detectar que as raízes de cafeeiro não estavam colonizadas por *S.gilmorei* mas por *A.longula*. A colonização de raízes do cafeeiro por *A.longula* era esperada devido a alta frequência de ocorrência de esporos deste fungo observada na sua rizosfera. Entretanto, a ausência de bandas de *S.gilmorei* nas raízes do cafeeiro surpreendentemente sugere que este fungo, apesar de ocorrer na rizosfera, não se estabeleceu efetivamente nas raízes do cafeeiro. Uma possível explicação para este fato é que *S.gilmorei* pode ter sido introduzido na rizosfera do cafeeiro através das raízes de Crotalária, que se estenderam até o cafeeiro, em busca de maior disponibilidade de P.

As evidências de que fungos MA multiplicados em *Crotalaria breviflora* estão presentes na rizosfera do cafeeiro, mas não estão efetivamente colonizando suas raízes, sugerem a importância de se conhecer as populações de MA que determinadas espécies de plantas podem estimular, quando se pensa em rotações de culturas, pré cultivos ou cultivo intercalar como prática de manejo para aumentar o potencial de inóculo natural destes fungos no solo.

É possível que o uso de seqüências de ITS amplificadas de extratos de raízes colonizadas usando PCR e primers específicos para fungos MA, possibilite a caracterização das populações ativas destes fungos no campo, a nível de espécies,

permitindo uma melhor compreensão das relações fungo-planta-solo e sistemas de produção.

5.7 Conclusões

- Cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e *Crotalaria breviflora* estimularam populações diferentes de fungos micorrízicos arbusculares na sua rizosfera.
- *Acaulospora longula* e *Scutellospora gilmorei* produziram fragmentos de DNA de pesos moleculares diferentes (580 e 540 pares de bases, respectivamente).
- Usando primers da região ITS 4 e 5 combinados e amplificando fragmentos obtidos através da PCR foi possível identificar fungos micorrízicos colonizando as raízes do cafeeiro.
- Através de técnicas moleculares foi possível detectar que o fungo micorrízico *Scutellospora gilmorei*, de ocorrência comum em rizosfera de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e *Crotalaria breviflora*, não colonizou as raízes do cafeeiro.
- O uso de técnicas moleculares tem potencial para auxiliar no estudo da dinâmica dos fungos micorrízicos arbusculares no sistema solo-planta.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- O cultivo de leguminosas aumentou a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e a concentração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo.
- O cultivo de leguminosas para adubação verde na entrelinha do cafeeiro aumentou a diversidade de espécies e o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera do cafeeiro.
- O cafeeiro e as leguminosas estimularam populações de fungos micorrízicos diferentes na sua rizosfera. *Acaulosporaceae* são mais frequentes no cafeeiro e *Gigasporaceae*, principalmente *Scutellospora gilmorei*, nas leguminosas.
- Em bioensaios em casa de vegetação, *Gigasporaceae* não foram encontradas colonizando as raízes do cafeeiro.
- A adubação verde pode não ser eficiente em aumentar o efeito biofertilizante da micorrização, devido à ocorrência de relações preferenciais entre fungo e hospedeiro.
- A metodologia desenvolvida para extração de DNA de fungos micorrízicos arbusculares permite a extração de DNA de um único esporo, de forma rápida e de maneira simplificada.
- O DNA de fungos micorrízicos arbusculares obtido através da metodologia de extração desenvolvida neste trabalho é de qualidade e em quantidade suficiente para amplificação e sequenciamento.
- A eficiência da amplificação de fragmentos de DNA através da PCR varia em função da espécie de fungo micorrízico arbuscular.
- *Acaulospora longula* e *Scutellospora gilmorei* produziram fragmentos de DNA de pesos moleculares diferentes (580 e 540 pares de bases, respectivamente).
- Usando primers da região ITS 4 e 5 combinados e amplificando fragmentos obtidos através da PCR foi possível identificar fungos micorrízicos colonizando as raízes do cafeeiro.

- Através de técnicas moleculares constatou-se **que** o fungo micorrízico *Scutellospora gilmorei*, de ocorrência comum em Cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e *Crotalaria breviflora*, não estava colonizando **as raízes** do cafeeiro.
- O uso de técnicas moleculares pode auxiliar **no** estudo da dinâmica dos **fungos** micorrízicos arbusculares **no** solo *e* na planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, D.J.; HETRICK, B.A.D.; JURGENSON, J.E. Isolate specific detection of mycorrhizal **fungi** using genome specific primer **pairs**. **Mycologia**, v.88, n.6, p.939-946, 1996.
- ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. **An ecological view of the formation of VA mycorrhizas**. **Plant and Soil**, v. 159, p.69-78, 1994.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal **fungi** in agricultural soils. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.33, p.1049-1059, 1982
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; The effect of VA mycorrhizae on plant growth. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.) **V. A. Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 113-130.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Formation of external hyphae in soil by four **species** of vesicular-arbuscular mycorrhizal **fungi**. **New Phytologist**, v.99, p.245-255, 1985.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; **Factors** influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.35, p.121-150. 1991.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; DE BOER, G. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, v.97, p.437-446, 1984.

ALLEN, M.F. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. New York: Chapman & Hall, 1992. 515p.

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, n.2, p.117-122, 1988.

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

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

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. **Introdução** de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo: II. **Flutuação** sazonal de rakes, de colonização e de fungos micorrízicos arbusculares associados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.20, p.225-232, 1996b.

BALTRUSCHAT, H.; DEHNE, H.W. **The occurrence** of vesicular-arbuscular mycorrhiza in age-ecosystems. I. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter wheat. *Plant and Soil*, v.107, p.279-284, 1988

BALTRUSCHAT, H.; DEHNE, H.W. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agro-ecosystems. II. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter barley. **Plant and Soil**, v.1 13, p.251-256, 1989.

BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significances in in nodulation nitrogen fixing plants. **Advances in Agronomy**, n.36, p.1-54, 1983.

BENTIVENGA, S.P. ; MORTON, J.B. Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.98, p.1419-1426, 1994.

BETHLENFALVAY, G.J. Mycorrhizae and crop productivity. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (Ed.) **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**, Madson: American Society of Agronomy, 1992. p. 1-25.

BETHLENFALVAY, G.J.; BAYNE, H.C.; PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic association between a mycorrhizal fungus and soybean. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.543-549, 1983.

BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; FRANSOS, R.L.; MIHARA, K.L. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis: IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.226-232, 1989.

BETHLENFALVAY, G.J.; LINDREMAN, R.G. Mycorrhizae in sustainable agriculture, Madson: American Society of Agronomy, 1992. 135p.

- BLACK, R.; TINKER, P.B. The development of endomycorrhizal root systems: II. Effect of agronomic factors and soil conditions on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in barley and on the endophyte spore density. *New Phytologist*, v.83, p.401-413, 1979.
- BONITO, R.D.; ELLIOT, M.L.; DES JARDINS, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.2809-2810, 1995.
- BRAUN-BLANQUET, J. Tabulación de las comunidades. In: BRAUN-BLANQUET, J. (Ed.) *Fitosociología - bases para el estudio de las comunidades vegetales*. Madrid: H.Blume ediciones, 1979. p.65-96.
- 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.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology System*, v.22, p.525-564, 1991.
- CARDOSO, E.J.B.N. Ocorrência de micorrizas em café. *Summa Phytopathologica*, v.4, p.136-137, 1978.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fósforo de rocha na simbiose soja-Rhizobium. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.9, p.125-130, 1985.

CLAPP, J.P.; YOUNG, J.P.W.; MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist**, v.130, p.259-266, 1995.

COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em solo cultivado com cafeeiro e leguminosas de verão. In: REUNIÃO BRASILEIRA **SOBRE MICORRIZAS**, V, Florianópolis, 1994. Resumos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1994, p-17.

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

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

COLOZZI FILHO, A.; SOUZA, P.; OLIVEIRA, E.; CARVALHO, M.M. Desenvolvimento de mudas de cafeeiro "Catuaí" micorrizadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.335, 1985.

COOPERBAND, L.R.; BOERNER, R.E.J.; LOGAN, T.J., Humid tropical leguminous tree and pasture grass responsiveness to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. **Mycorrhiza**, v.4, p.233-239, 1994.

- CUENCA, G.; LOVERA, M, Vesicular-arbuscular mycorrhizae en disturb and revegetated sites from La Gran Sabana, Venezuela. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.73-79, 1992.
- DODD, J.C.; ARIAS, I., KOOMEN, I.; HAYMAN, D.S. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a Savanna ecosystem I: The effects of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field. **Plant and Soil**, v. 122, p.229-240, 1990a.
- DODD, J.C.; ARIAS, I.; KOOMEN, I.; HAYMAN, D.S. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem. II. The effects of pre-cropping on the spore populations of native and introduced VAM fungi. **Plant and Soil**, v. 122, p.241-247, 1990b.
- DOUDS, D.D.; SCHENCK, N.C. Relationship of colonization and sporulation by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. **New Phytologist**, v. 116, p.621-627, 1990.
- EDWARDS, S.G.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. **Mycological Research**. v. 101. n. 12. p.1440-1444, 1997.
- EGGER, K.N.; FORTIN, J.A. Identification of taxa of E-strain mycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1482-1488, 1990.

- EGGER, K.N.; SIGLER, L. Relatedness of the ericoid endophytes *Scytalidium vacinii* and *Hymenoscyphus ericae* inferred from analysis of ribosomal DNA. *Mycologia*, v.85, p.219-230, 1993.
- ESPINDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L.; GUERRA, J.G.M.; SILVA, E.M.R. & SOUZA, F.A. Influência da adubação verde sobre a simbiose micorrízica e a produção da batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.). In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, V, Florianópolis, 1994. Resumos, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1994. p.46
- FERNANDES, A.B. Micorrizas vesículo-arbusculares em cafeeiro da região sul do Estado de Minas Gerais. Lavras, 1987. 98p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- FERNANDES, A.B. & SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiros da região sul do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.24, n. 12, p. 1489-1498, 1989.
- FRANKIE, 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.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, v.2, p.113-118, 1993.

- GARDES, M.; WHITE, T.J.; FORTIN, J.A.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial DNA. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.180-190, 1991.
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J.G.; CLARKSON, D.T. (Ed.) **The Development and Function of Roots**. Londres:Academic Press, 1975. p.575-591.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.
- 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.; AVIO, L.; CITERNESI, A.S.; LOGI, C. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. **New Phytologist**, v.125, p.587-594, 1993.
- 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.
- GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; LOGI, C. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.127, p.703-79, 1994.

- GOMES-DA-COSTA, S.M. **Fungos** micorrízicos arbusculares em monoculturas e rotações de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill, Rio Claro, SP, 1993, 112p Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- GOMES-DA-COSTA, S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Crescimento de soja em solos com diferentes potenciais de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares autóctones. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, XLVII, Nova Friburgo, 1996. Resumos, Nova Friburgo, Sociedade de Botânica do Brasil, 1996. p.312.
- 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.
- GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G.; MENGE, J.A. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. *New Phytologist*, v.91, p.183-189, 1982.
- GRAVES, J.D.; WATKINS, N.K.; FITTER, A.H.; ROBINSON, D.; SCRIMGEOUR, C. Intraspecific transfer of carbon between plants linked by a common mycorrhizal network. *Plant and Soil*. v.192, p.153-159, 1997.
- HALL, I.R. Potential for exploiting vesicular-arbuscular mycorrhizas in agriculture. In: MIZARAH, A. (Ed.) **Advances in Biotechnological Processes**. New York: Alan Liss Inc., 1988. p.141-174.
- HARINIKUMAR, K.M.; BAGYARAJ, D.J. Effect of crop rotation on native vesicular-arbuscular mycorrhizal propagules in soil. *Plant and Soil*, v. 110, p.77-80, 1988.

- HARNEY, S.K.; EDWARDS, F.S.; ALLEN, M.F. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. *Mycologia*, v.89, n.4, p.547-550, 1997.
- HENRION, B.; CHEVALIER, G.; 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 ribosomal RNA genes. *New Phytologist*, v.122, p.289-298, 1992.
- HEPPER, C.M.; SEN, R.; AZCON-AGUILAR, C.; GRACE, C. Variation in certain isozymes among different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus monosporum* and *Glomus mossae*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.20, p.51-59, 1988.
- HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.1, p.206-210, 1984.
- HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T. Effects of mycorrhizal fungus species and metalaxyl application on microbial suppression of mycorrhizal symbiosis. *Mycologia*, v.83, p.97-102, 1991.

- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob 'cultivo na região sul do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM, 6., Londrina, 1994. **Anais**. Londrina: IAPAR, 1994. p.234-270.
- INGLEBY, K.; DIAGNE, O.; DEANS, J.D.; LINDLEY, D.K.; NEYRA, M.; DUCOUSSO, M. Distribution of roots, arbuscular mycorrhizal colonization and spores fast-growing tree species in Senegal. **Forest Ecology and Management**, v.90, p.19-27, 1997.
- JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. **Biotropica**, v.12, p.56-64, 1980.
- 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. 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,
- JOHNSON, N.C.; COPELAND, P.J.; CROOKSTON, R.K.; PFLEGER, F.L. Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. **Agronomy Journal**, v.84, p.387-390, 1992.

- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. **Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses.** In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (Ed.) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*, Madison: ASA Special Publication, 1992. p.71-99.
- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L.; CROOKSTON, R.K.; SIMMONS, S.R.; COPELAND, P.J. **Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybeans cropping history.** *New Phytologist*, v.117, p.657-663, 1991
- KOIDE, R. **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.
- LANFRANCO, L.; WYSS, P.; MARZACHI, C.; BONFANTE, P. **DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico.** *FEMS Microbiology Letters*, v.114, p.245-252, 1993.
- 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.
- LEE, S.B.; TAYOR, J.W. **Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores.** In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990, p.282-287

- LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of **five** fungus-like protocistan Phytophthora species, **inferred from** the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.636-653, 1992.
- LLOYD-MACGILP, A.S.; CHAMBERS, 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 Phytologist**, v.133, p.103-111, 1996.
- LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, N.C. Occurrence **and** distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (Coffea arabica L.) plantations in central São Paulo State, **Brazil**. **Turrialba**, v.33, n.4, p.417-422, 1983a.
- LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L.; MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes **espécies** de fungos micorrizicos vesicular-arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, n.2, p.137-141, 1983b.
- MANJUNATH, A.; HABTE, M. Establishment of soil solution P levels for studies involving vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.21, n.7-8, p.557-566, 1990.
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C. Growth and ectomicorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil **infested** with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. **Forest Science**, v. 21, p. 245-254, 1975.
- McGONIGLE, T.P.; FITTER, A.H. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. **Mycological Research**. v.94, n.1, p.120-122. 1990.

- MICALES, J.A.; PONB, M.R.; PETERSON, G.L. The use of *isozyme analysis* in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon*, v.27, p.405-409, 1986.
- MICHELMORE, R. W.; HUMBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, v.25, p.383-404,1987.
- MILLER, R.M The ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae in grass and shrublands. In: SAFIR, G.R. (Ed.) *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Florida: CRC Press. 1987. p.135-169.
- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and biogeochemical cycling. In: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. (Ed.) *Mycorrhizae and Plant Health*. Minnesota.: APS Press. 1994. p 189-212.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, v.37, p.471-491, 1990.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, P. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. IN: ROBSON, A.D.; ABBOT, L.K.; MALAJCZUK; N. (Ed.) *Management of mycorrhizae in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, 1994, p 47-59.
- MOSSE. B. Specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER. P.B. (Ed.) *Endomycorrhizas*. New York: Academic Press, 1975. p.469-484.

- NEWMAN, E.I. Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. **Advanced Ecological Research.**, v. 38, p.243-270, 1988.
- OLIVEIRA, E. Fungos endogonaceae em cafeeiros das regiões “Alto Paranaíba” e “Triângulo” em Minas Gerais. Lavras, 1988. 73p. Dissertação (M.S.)- Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- OLIVEIRA, E.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, R.D.; COLOZZI FILHO, A.; SOUZA, P. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em cafeeiros da região do Alto Paranaíba e Triângulo no Estado de Minas Gerais. **Hoehnea**, v.17, n.2, p.117-125, 1990.
- PACOVSKY, R.S. Carbohydrate, proteins and amino-acids status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 346-354, 1989.
- PACOVSKY, R.S.; BETHLENFALVAY, G.J. Measurement of the extraradical mycelium of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin determination. **Plant and Soil**, v.68, p.143-147, 1982.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n.12, p.25-31, 1988.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply: Analysis of carbon costs. **Plant Physiology**, v. 101, p.1063-1071, 1993.

- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and **staining** parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal **fungi** for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, n. 1, p.158-60, 1970.
- PICHÉ, Y.; SIMON, L.; SÉGUIN, A. genetic manipulation in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.159, p.171-178, 1994
- PORTER, W.M.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Field survey of the **distribution of** vesicular-arbuscular mycorrhizal **fungi** in relation to soil pH. **Journal of Applied Ecology**, v.24, p.659-662. 1987.
- READ, D.J. Mycorrhizas *in* ecosystems. **Experientia**, v.47, p.376-390, 1991.
- 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 **genera** of the order Glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.1756-1761, 1997.
- ROSS, J.P. & DANIELS, B.A. Hyperparasitism of endomycorrhizal fungi. *in*: N.C. SCHENCK, (Ed.), **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1982. p.55-58.
- ROSENDAHL, S.; SEN, R. Isozyme **analysis** of micorrhizal **fungi** and their mycorrhiza. *in*: NORRIS; J.R.; READ; D.J.; VARMA; A. K. (Ed.) **Methods in microbiology**. New York: Academic Press, 1992. p.169-194.

- SAGGIN JUNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, 1996, p.202-254.
- SANDERS, I.R.; ALT, M.; GROPE, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**. v.130, p.419-427, 1995.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Proceedings of the National Academic Science**, v.74, p.5463-546, 1977.
- SCANNERINI, S.; BONFANTE, P. Bacteria and bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi (Glomaceae). In: MARGULIS, L.; FESTER, R. **Symbioses as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis**. Cambridge: MIT Press. 1991. p.273-283.
- SCHENK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**.: Gainesville: University of Florida. 1987. 242p.
- SCHENCK, N.C.; SIQUEIRA, J.O. Ecology of VA mycorrhizal fungi in temperate agroecosystems. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, VII. Gainesville, 1987 **Mycorrhizae in the next decade-practical applications and research priorities**, Proceedings. Gainesville, 1987. p 2-4.

- SCHOWALTER, D.B.; SOMMER, S.S. The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v.177, p.90-94, 1989.
- SCHWAB, S.M.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Quantitative and qualitative comparison of roots exudates of mycorrhizal and nonmycorrhizal plant species. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.1227-1231, 1984.
- SIEVERDING, E. **Vesicular - arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn, Germany: GTZ, 1991. 371p.
- SIEVERDING, E.; LIEHNER, D.E. Influence of crop rotation and intercropping of cassava with legumes on VA mycorrhizal symbiosis of cassava. **Plant and Soil**, v.80, p. 143-146, 1984.
- SILVEIRA, A.P.D. **Micorrizas**. 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.257-282.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.291-295, 1992.
- SIMON, L.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single strand conforming polymorphism polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, V.59, p.4211-4215, 1993.

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

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; FARIA, F.H.S.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares para o algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, n.3, p.213-218, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; GUIMARÃES, P.T.G.; OLIVEIRA, E. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência da inoculação com fungos micorrízicos e superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, n. 1, p.3-87, 1993.

SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. **Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Lavras: Esal/Faepe, 1988. 236p.

SIQUEIRA, J.O.; ROCHA JÚNIOR, W.F.; 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 Soils**, v.10, p.65-71, 1990.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n. 12, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Stimulation of vesicular arbuscular mycorrhizal formation and growth of white clover by glavonoids compounds. **New Phytologist**, v. 11R, p.87-93, 1991.

- SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN JUNIOR, O.J. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; SILVA, A.F. (Ed.) **Proceedings International Symposium on Environmental Stress: Maize in Perspective**. Brasil/México; EMBRAPA/CYMMYT/UNDT, 1995. p.240-280.
- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review on Plant Physiology and 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: structure, physiology and consequences for the symbiosis. **Plant and Soil**, v. 159, p.103-113, 1994.
- SMITH, T.F. The effect of season and crop rotation on the abundance of spores of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal endophytes. **Plant and Soil**, v.57, p.475-479, 1980.
- SOUZA, F.A.; ALMEIDA, D.L.; SILVA, E.M.R.; GUERRA, J.G.M. Pré-cultivos com espécies vegetais distintas atuam de forma diferenciada sobre o potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (MA) nativos do solo. I. Influência de algumas leguminosas e sorgo sobre o número de propágulos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, V, Florianópolis, SC. 1994. **Resumos**, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1994. p 68.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples, **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2185-2191, 1988.

- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Polymerase **chain** reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, v.45, p.137-161, 1991.
- TOMMERUP, I.C.; ABBOTT, L.K. Prolonged **survival** and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. **Soil Biology Biochemistry**, v.13, p.431-433, 1981.
- THOMAS, G.V. Vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis in coconut (*Cocos nucifera*) in relation to the root (wilt) disease and intercropping or **mixed** cropping. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.57, n.2, p.145-147, 1988.
- THOMPSON, J.P. Decline of vesicular-arbuscular mycorrhizae in **long fallow** disorder of field crops and its expression in phosphorous **deficiency** of sunflower. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.38, p.847-867, 1987.
- 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.
- VARMA, A. Ecophysiology and application of arbuscular mycorrhizal **fungi** in arid **soils**. In: VARMA, A. & HOCK, R. (Ed.) **Mycorrhiza. Structure, function, molecular biology and biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p 561-591.

- WANG, G.; WHITTAM, T.S.; BERG, M.; BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than the multilocus enzymes electrophoresis for distinguishing related bacteria strains. **Nucleic acids Research**, v.21, p.5930-5935, 1993.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) **PCR protocols: a guide to methods and application**. New York: Academic Press, 1990, p.315-322.
- WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, **Nucleic Acids Research**, v. 18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, v.97, p.1351-1357, 1993.
- ZAMBINO, P.J.; SZABO, L.J. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. **Mycologia**, v.85, p.401-414, 1993.
- ZEZE, A.; HOSNY, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DULIEU, H. Characterisation of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in planta **Applied and environmental Microbiology**, v.62, p.2443-2448, 1996.