

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Fungos Micorrízicos Arbusculares em Briófitas e
Raízes Modificadas de Manjeriçãõ (*Ocimum
basilicum* L.) *in vitro***

Camila Pinheiro Nobre

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM
BRIÓFITAS E RAÍZES MODIFICADAS DE MANJERICÃO
(*Ocimum basilicum* L.) IN VITRO**

CAMILA PINHEIRO NOBRE

Sob orientação do professor
Ricardo Luís Louro Berbara

e Co-orientação do pesquisador
Orivaldo José Saggin Júnior

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

579.5
N754f
T

Nobre, Camila Pinheiro, 1985-.
Fungos micorrízicos arbusculares em
briófitas e raízes modificadas de
manjerição (*Ocimum basilicum* L.) *in vitro* /
Camila Pinheiro Nobre - 2011.
75 f.: il.

Orientador: Ricardo Luís Louro Berbara.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 60-71.

1. Fungos - Desenvolvimento - Teses. 2.
Manjerição - Teses. 3. Ácido húmico -
Teses. I. Berbara, Ricardo Luís Louro,
1957-. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

CAMILA PINHEIRO NOBRE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2011.

Ricardo Luis Louro Berbara. Dr. UFRRJ
(orientador)

Bruno Tomio Goto. Dr. UFRN

Eliane Maria Ribeiro da Silva Dr. EMBRAPA CNPAB

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Wilson Arruda Nobre (*in memoriam*) por todas as lições de vida, pela dedicação e por mostrar como é ser agrônomo de verdade.

À minha mãe Valdênia Nobre pelo exemplo de perseverança.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

A minha mãe por entender minha ausência em momentos tão especiais de sua vida e por conviver com a distância e tantos momentos de despedidas.

Aos meus irmãos de sangue Rafael e Luiza Nobre e ao irmão de coração Vinicius Geissler.

A minha avó Helena;

Ao Luis Zanin pela amizade, por puxar minha orelha, por momentos descontraídos e pela ótima companhia.

Ao Patrick Haim por todos os momentos de amizade e carinho nesses dois anos de convivência.

Aos meus primeiros orientadores que acreditaram no meu trabalho ainda quando não tinha produzido resultados: Altamiro Ferraz Júnior ('pai') e Christoph Gehring (alemão).

Ao meu orientador Dr Ricardo Berbara pelo exemplo de profissional e por sempre cobrar um pouco mais de mim.

Ao meu co-orientador Dr Orivaldo Saggin Junior pelas conversas e 'luzes' durante o decorrer da pesquisa.

Ao doutor Bruno Goto pela paciência e disposição no ensino de taxonomia de FMA e pela amizade.

À professora Eliane pela disponibilidade de participação na banca.

Ao doutor Wallace Lima pelos incentivos e disposição para tirar dúvidas, além da amizade e 'presença' nessa fase tão difícil (Superação é tudo, né prezado?).

Aos amigos feitos na Rural e que ficarão para sempre: Hugo Zoffoli, Eloísa Benazzi, Fábio Freitas, Beto, Paula Fernanda e Érica Souto.

Aos amigos do laboratório de Biologia do Solo: Sael Sanchez, Eduardo Mondino, Fernanda Covacevich, Adriana França, Natalia Zatorre, Jacson, Beto, François, Nardele, Renata, Renata Fontes, Mariana, Mariana nematóides, Fernando, Thiago, Michael, Andrés, Orlando, Jurema e Pedro Paulo.

Ao Rogério Tardin pela ajuda imensurável no capítulo de briófitas, principalmente no trabalho das imagens.

Aos amigos do laboratório de Química e Poluição do solo: Jair Guedes, Márcio Magalhães, Érica, Leilane, Michel, Izabela, Bruna, Felipe e Carol.

Aos amigos do laboratório de Gênese e Morfologia do Solo: Paula Fernanda, Anderson, Deivid, Itaynara, Fernando, Guilherme e Arcângelo.

Aos amigos do laboratório de Fertilidade: Carla Andréia, Juliano, Eloísa, Rafael Pressoto, Ana Paula e Rosimar.

Aos amigos do laboratório de Micorrizas da Embrapa: Itamar (obrigada por toda ajuda!), Cristiane, Guilherme, Divino e Veralu.

Aos colegas de curso: Ana Carolina, Débora, Marcus Loss, Selenobaldo, Alessandro, Juliana, Daniela, Jakson, Rafael, Willian, Rosi, Péricles, Walter, Paulo Boa Sorte.

Aos amigos do laboratório de nutrição de plantas: Leandro Azevedo, Carlos Bücher, Osmário, Leandro, Carlos, Rafael, Vinicius.

Aos mestres que, durante o curso, fizeram (ou tentaram fazer) com que eu entendesse um pouco mais sobre a ciência do solo e toda sua amplitude: Marcos Gervasio, Lúcia Helena, Manlio, Sonia, Gabriel, Érika, Zonta, Eliane, Beth, Verônica, Vera Baldani, Nelson Moura, Nelson Mazur e Adelson.

As pessoas que fazem o CPGA-CS e sempre estão dispostas a ajudar: Roberto, Marquinhos, Beth e Moraes.

A UFRRJ por permitir que eu fizesse parte de sua história e ao CPGA-CS pela oportunidade de cursar o programa de pós-graduação.

A CAPES pelo apoio financeiro sem o qual teria sido impossível a realização do curso.

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

Camila Pinheiro Nobre nasceu na cidade de Imperatriz (MA), em 13 de fevereiro de 1985. Ingressou na Universidade Estadual do Maranhão no curso de Agronomia no ano 2003 onde foi monitora da disciplina de bioquímica e bolsista de iniciação científica pelo CNPq e BIC/UEMA. Diplomou-se em 2008. No ano seguinte, 2009, iniciou o Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e concluiu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2011.

RESUMO

Nobre, Camila Pinheiro. **Fungos micorrízicos arbusculares em briófitas e raízes modificadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) *in vitro***. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O objetivo do trabalho foi observar a germinação e produção de glomalina e acompanhar desenvolvimento de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do banco de germoplasma da Embrapa em raízes geneticamente modificadas de manjeriço e em briófitas *in vitro*. Ainda, avaliar sua interação com os hospedeiros e a influência de meio de cultura enriquecido com ácidos húmicos no crescimento do fungo e da briófita *Lunularia cruciata*. Para isso algumas espécies de FMAs foram selecionadas e tiveram seus glomerosporos extraídos e submetidos ao processo de desinfestação superficial, colocados em meio Agar-água e câmara com temperatura controlada para germinar. Realizou-se teste de germinação por 15 dias e os resultados foram submetidos a análise de variância e aplicado teste de Tukey à 5% de probabilidade. Espécies com glomerosporos germinados (*Gigaspora margarita*, *Glomus manihots*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus proliferum*) foram colocadas em raízes modificadas de manjeriço roxo onde tiveram seu crescimento observado até 100 dias após a inoculação. Ainda como parte da caracterização de espécies de FMAs foi realizado a quantificação dos teores de glomalina nas amostras de multiplicação sendo os resultados submetidos a análise de variância e aplicado teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade. No segundo capítulo foi verificado o efeito da associação FMAs em raízes modificadas de manjeriço roxo e no terceiro capítulo a influência da associação ácido húmico em diferentes concentrações, briófita *Lunularia cruciata* (área e comprimento) e FMAs. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Scutellospora heterogama* foi a espécie com maiores taxas de germinação de glomerosporos, seguida da *Gigaspora margarita*. As espécies de *Glomus* esporularam logo após a formação da simbiose. A quantidade de glomalina produzida pelos diferentes FMAs foi distinta, em especial na fração glomalina total. As diferentes espécies de FMAs não apresentaram distinção na eficiência de promover o desenvolvimento das raízes transformadas de *Ocimum basilicum*. O crescimento de raízes transformadas de manjeriço em meio MSR foi ampliado a partir dos 15 dias após a inoculação de fungos micorrízicos. O uso de ácidos húmicos no meio de cultura em concentrações de 20 e 80 mg C.L⁻¹ incrementou o crescimento da briófita *Lunularia cruciata* e sua associação com fungos micorrízicos arbusculares, assim como promoveram a maior esporulação de *Gl. proliferum*. A associação *Lunularia cruciata* e FMAs foi caracterizada como mutualista já que ambos apresentaram benefícios em crescimento e esporulação. *Gigaspora margarita* e *Glomus proliferum* promoveram maior crescimento de *Lunularia cruciata*.

Palavras-chave: Cultivo. Monoxênico. Substâncias Húmicas. Esporulação.

ABSTRACT

Nobre, Camila Pinheiro. **Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in bryophytes and basil (*Ocimum basilicum* L.) genetic modified roots *in vitro***. 2011. 75p. Dissertation (Master Science in Agronomia, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The aim of this study was to observe the germination, production of glomalin and monitor development of species of mycorrhizal fungi (AMF) of the germplasm bank of Embrapa in root organ culture (ROC) of basil and bryophytes *in vitro*, analyzing their interaction with the hosts and the influence of the culture medium enriched with humic acids on fungal growth and bryophyte *Lunularia cruciata*. For this, some AMF species were selected and had their glomerospores extracted and subjected to surface disinfection process, placed in water-agar medium and temperature-controlled chamber to germinate. A germination test was conducted for 15 days, and the results were analyzed by ANOVA and Tukey test applied to 5% probability. Species with germinated glomerospores (*Gigaspora margarita*, *Glomus manihots*, *Scutellospora heterogama* and *Glomus proliferum*) were placed in ROC of purple basil where they had their growth observed until 100 days after inoculation. Also as part of the characterization of AMF species it was quantified the level of glomalin in the samples of multiplication and the results were subjected to analysis of variance and Scott-Knott test at 5% probability. In the second chapter it was investigated the effect of mycorrhizal association in ROC of purple basil, and in the third chapter the influence of different concentrations of humic acid and association with growth of *Lunularia cruciata* (area and length). The results were submitted to ANOVA and Tukey test at 5% probability. *Scutellospora heterogama* was the species with higher germination rates of glomerospores, followed by *Gigaspora margarita*. The species of *Glomus* sporulated after formation of symbiosis. The amount of glomalin produced by different AMF was distinct, especially in total glomalin fraction. Different AMF species did not show difference in efficiency to promote development of *Ocimum basilicum* transformed roots. The growth of basil transformed roots in the MSR was extended from 15 days after inoculation with mycorrhizal fungi. The usage of humic acids in the culture medium in concentrations of 20 and 80 mg CL⁻¹ enhanced growth of bryophyte *L. cruciata*, and its association with mycorrhizal fungi, as well as promoted the highest number of spores of *Gl. proliferum*. The association *L. cruciata* and AMF was characterized as mutualistic, since both had advantages in growth and sporulation. *Gigaspora margarita* and *Glomus proliferum* increased growth of *Lunularia cruciata*.

Key words: Monoxenic culture. Humic Substances. Sporulation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Principais características diferenciais dos tipos de micorrizas (Adaptado de Smith & Read, 1997).....2
- Tabela 2** – Classificação dos FMAs, atualizada em novembro de 2010. (Fonte: <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>).....6
- Tabela 3** – Terminologias utilizadas para as diversas frações protéicas do solo e glomalina. Adaptado de Rillig (2004).9
- Tabela 4** - Colonização micorrízica das raízes, abundância de arbúsculos e comprimento de micélio (cm.cm⁻²) de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares em raízes transformadas de manjeriço roxo.41
- Tabela 5** - Composição elementar, relação entre elementos, razão E4/E6 e acidez por grupos funcionais e total dos AHs.....50
- Tabela 6** - Efeito das diferentes doses de ácidos húmicos (0,0; 40,0 e 80,0 mg C.L⁻¹) e das espécies de FMAs no crescimento de *Lunularia cruciata* (área e comprimento).....54
- Tabela 7** - Crescimento de *Lunularia cruciata* (área de cobertura e comprimento) inoculada ou não com *Glomus proliferum*.....55
- Tabela 8** - **Esporulação** de *Glomus proliferum* em meio com diferentes doses de ácidos húmicos (0, 20, 40 e 80 mg C.L⁻¹).....57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Árvore filogenética proposta por Morton & Benny (1990) e modificado por Morton & Redecker (2001) tendo como base dados morfológicos e moleculares. (Fonte: <http://invam.caf.wvu.edu>).....4
- Figura 2** – Filogenia de fungos baseadas na sequência SSU do rRNA mostrando a separação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em um clado diferente dos Zygomycetos..5
- Figura 3** - Teores de Glomalina Facilmente Extraível nas diferentes espécies de FMA da coleção da Embrapa Agrobiologia em duas épocas de coletas dos inoculos.....20
- Figura 4** - Teores de Glomalina Total nas diferentes espécies de FMA da coleção da Embrapa Agrobiologia em duas épocas de coletas dos inoculos.....21
- Figura 5** - Taxa de germinação (%) de glomerosporos de fungos micorrízicos arbusculares após desinfestação superficial.....22
- Figura 6** - Glomerosporo de *Gigaspora margarita*: detalhe da hifa bulbosa e das papilas próximas à hifa. Foto:Goto, 2009.....23
- Figura 7** - Glomerosporo de *Scutellospora heterogama*. Foto: Goto, 2009.24
- Figura 8** - Glomerosporo de *Acaulospora morrowiae* com reação no Melzer no componente germinativo. Foto: Goto, 2009.....25
- Figura 9** - Ornamentação de *Acaulospora scrobiculata*.Foto: Goto, 2009.....25
- Figura 10** - Glomerosporo de *Glomus manihots*. Fonte: Ignácio, 2011.....26
- Figura 11** - Glomerosporo de *Kuklospora colombiana*. Fonte: Ignácio,2011.....27
- Figura 12** - Glomerosporos de *G. proliferum* em PVLG. Foto: Ignácio, 2011.....27
- Figura 13** - Tubos germinativos (TG) de *Gigaspora margarita*.28
- Figura 14** - Micélio externo (ME) de *Gigaspora margarita* e célula auxiliar (AUX).....28
- Figura 15** - Célula auxiliar de *Gi margarita* e detalhe dos septos das hifas.....29
- Figura 16** - Desenvolvimento de *Glomus manihots in vitro* com crescimento de micélio (ME) e formação de novo glomerosporo (S). (HS = Hifa de sustentação).....30
- Figura 17** - Detalhe da formação intercalar de novo glomerosporo (S) de *Glomus manihots*. (ME = micélio externo; HS = Hifa de sustentação).....30
- Figura 18** - Representação esquemática da ontogenia de esporos de *Glomus clarum*. Estágio 1. Note a formação de septos (s) na parte apical da hifa (ah) esporogênica. O fluxo citoplasmático (cf) contínuo através da hifa basal (bh) permite que o esporo se desenvolva. A linha pontilhada mostra onde a parede da hifa (hw) irá entumecer. Estágio 2. Observe o entumecimento da hifa esporogênica. Nesta fase somente a parede da hifa está presente. Estágio 3. Nesta fase a parede do esporo (sw) e da hifa de sustentação (sh) são sintetizadas na parte interna a partir da hifa de esporogênica. Estágio 4. Esporo maduro, sem a parede da hifa. (Adaptado de Souza & Berbara, 1998).....31
- Figura 19** - Glomerosporos de *Glomus proliferum*: A – fotografia em lupa de diferentes estágios de desenvolvimento (SM = glomerosporos maduros; SI = glomerosporos imaturos; ME = micélio externo). B – fotomicrografia de esporocarpo de *Gl. proliferum*.....31
- Figura 20** - Área ocupada por raízes de manjeriçãoxo em placas Petri inoculadas com quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes épocas após a inoculação.....39
- Figura 21** - Comprimento (cm) de raízes transformadas de manjeriçãoxo inoculadas com quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes épocas após a inoculação.....40

Figura 22 - Espectro de transmitância de Infravermelho com transformada de Fourier do ácido húmico por número de ondas (frequência).....	51
Figura 23 - Área de cobertura da placa com a briófito <i>Lunularia cruciata</i> cultivada <i>in vitro</i> em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.....	52
Figura 24 - Comprimento (cm) de cobertura da placa com a briófito <i>Lunularia cruciata</i> cultivada <i>in vitro</i> em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.....	53
Figura 25 - Células auxiliares de <i>Scutellospora heterogama</i> (A) e <i>Gigaspora margarita</i> (B).....	54
Figura 26 - Micélio externo de <i>Gigaspora margarita</i> e células suspensórias.....	54
Figura 27 - Área de cobertura da placa com a briófito <i>Lunularia cruciata</i> cultivada <i>in vitro</i> em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares aos 0, 7, 14, 21, 28, 43, 52 e 60 dias após a repicagem.....	55
Figura 28 - Número de glomerosporos de <i>Glomus proliferum</i> produzidos <i>in vitro</i> em cultura de <i>L. cruciata</i> em meio com diferentes de ácido húmico.....	56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA).....	2
2.1.1 Classificação dos glomeromicetos.....	3
2.1.2 Função e importância.....	6
2.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> de FMA.....	7
2.1.4 Glomalina.....	8
2.2 Raízes Modificadas Geneticamente.....	9
2.3 Briófitas.....	11
2.4 Substâncias Húmicas e Ácidos Húmicos.....	12
CAPÍTULO I- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE GLOMEROSPOROS, PRODUÇÃO DE GLOMALINA, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Extração e Quantificação de Glomalina.....	18
2.2 Desinfestação Superficial dos Glomerosporos e Teste de Germinação.....	18
2.3 Desenvolvimento <i>in vitro</i> das Espécies de FMA.....	19
2.4 Caracterização Morfológica das Espécies de FMAs.....	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Teores de Glomalina.....	20
3.2 Germinação de Glomerosporos.....	21
3.3 Caracterização Morfológica das Espécies de FMA.....	21
3.3.1 <i>Gigaspora margarita</i> W.N. Becker & I.R. Hall.....	23
3.3.2 <i>Scutellospora heterogama</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders.....	23
3.3.3 <i>Acaulospora morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck.....	24
3.3.4 <i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe.....	25
3.3.5 <i>Glomus manihots</i> R.H. Howeler, Sieverd. & N.C. Schenck.....	26
3.3.6 <i>Kuklospora colombiana</i> (Spain & N.C. Schenck) Oehl & Sieverd.....	26
3.3.7 <i>Glomus proliferum</i> Dalpé & & Declerck.....	27
3.4 – Desenvolvimento <i>in vitro</i> de Espécies de FMA.....	27
4. CONCLUSÕES.....	34

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO ROXO (<i>OCIMUM BASILICUM</i> L.) ASSOCIADAS A DIFERENTES FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÕES.....	42
CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DA BRIÓFITA <i>LUNULARIA CRUCIATA</i> SOB O EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS E ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.....	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Isolamento e Purificação dos Ácidos Húmicos.....	47
2.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos.....	47
2.3 Extração e Desinfestação Superficial dos Glomerosporos.....	47
2.4 Preparo do Meio de Cultura e Instalação dos Experimentos.....	48
2.4.1 Experimento I - Influência de doses de ácido húmico e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no crescimento <i>in vitro</i> de <i>Lunularia cruciata</i>	48
2.4.2 Experimento II - Influência de diferentes doses de ácido húmico (AH) e inoculação de <i>Glomus proliferum</i> no crescimento <i>in vitro</i> de <i>Lunularia cruciata</i>	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Caracterização dos Ácidos Húmicos.....	50
3.2 Influência de Doses de Ácido Húmico e Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) no Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Lunularia cruciata</i>	51
3.3 Influência de Diferentes Doses de Ácido Húmico (AH) e Inoculação de <i>Glomus proliferum</i> no Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Lunularia cruciata</i>	55
4. CONCLUSÕES.....	58
CONCLUSÕES GERAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, estabelecem simbiose com a maioria dos vegetais superiores e inferiores das mais diversas famílias e têm sido apontados como um grupo de organismos chave na produtividade dos ecossistemas terrestres e para a manutenção da diversidade florística. Esses fungos são biotróficos obrigatórios, necessitando do estabelecimento da simbiose com órgãos vegetais compatíveis e metabolicamente ativos para que possam completar seu ciclo de vida. A importância desses fungos na agricultura se deve à melhora na capacidade nutricional das plantas além de amenização a estresses bióticos e abióticos.

Entretanto, esses fungos ainda têm limitações quanto seu uso em larga escala devido à deficiência na produção de inoculantes. Há necessidade de grandes espaços em casas de vegetação para o cultivo em potes e os esporos produzidos não são em condições axênicas. Algumas soluções têm sido propostas para solucionar tal problema, dentre elas o cultivo *in vitro*. Neste sistema os problemas enfrentados são: a biotrofia obrigatória e a dificuldade de estabelecer a maioria das espécies de FMAs *in vitro*.

Diversas pesquisas objetivando o desenvolvimento de tecnologias que permitam o crescimento de FMAs em meio de cultura (axenicamente) são de grande importância para o desenvolvimento dos estudos na micorrizologia. O uso de raízes modificadas através de *Agrobacterium rhizogenes* vem permitindo a multiplicação de FMAs *in vitro*, contudo, poucos laboratórios possuem licença e condições físicas para trabalhar com tais organismos modificados. Outra solução encontrada é o uso de planta 'inferiores' tais como as briófitas. Esses vegetais conseguem realizar associações com os FMAs e seria uma grande vantagem na produção de inoculantes *in vitro* devido a sua baixa taxa de crescimento quando comparadas com as raízes modificadas, o material propagativo é de obtenção mais fácil e não há necessidade de certificação e fiscalização de órgãos de biossegurança.

O objetivo desse trabalho foi verificar a germinação e acompanhar desenvolvimento de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em raízes geneticamente modificadas de manjerição roxo e briófitas em meio de cultura com diferentes dosagens de ácido húmico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA)

Dentre os organismos do solo, os pertencentes ao Reino Fungi representam a maior biomassa total do solo. Eles estão envolvidos em vários processos, tais como: decomposição da matéria orgânica (CROMACK & CALDWELL, 1992), amonificação e nitrificação do nitrogênio orgânico (READ, 1989), intemperismo dos solos através da excreção de ácidos orgânicos e sideróforos e influência na estrutura do solo pelo crescimento hifálico e produção de proteínas (MILLER & JASTROW, 1992; WRIGHT & UPADHYAYA, 1998).

Um grupo de fungos do solo, em especial, possui um papel chave no processo evolutivo das plantas. Pertencentes ao filo Glomeromycota, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são uns dos mais importantes organismos do planeta (READ, 1992). Estes fungos são considerados muito importantes para a nutrição das plantas afetando sua saúde e sua capacidade de competir nos ecossistemas. Influencia também a ciclagem de nutrientes, a estrutura do solo e, particularmente, permite a sustentabilidade dos ecossistemas baseados em solo de baixa fertilidade ou da agricultura de baixo uso de insumos (BETHENFALVY & LINDERMAN, 1992).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam simbiose obrigatória com raízes de um grande número de famílias vegetais, melhorando desde o desenvolvimento até a tolerância aos vegetais afetados por estresses bióticos ou abióticos, causada pelas melhorias na absorção de íons de baixa mobilidade no solo, como o fósforo (Tabela 1). Caracterizam-se por produzir, no córtex das raízes hospedeiras, estruturas ramificadas responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbioses, conhecidas como arbúsculos (SMITH & READ, 1997). Além disso, produzem estruturas reprodutivas típicas, de natureza assexual, denominadas glomerosporos, que apresentam alta diversidade estrutural (GOTO & MAIA, 2006), relacionada principalmente a parede, que geralmente varia em número de camadas, em aparência, cor e espessura (MORTON, 1988). Estes glomerosporos são unidades biológicas em estado de dormência que precisam ser ativados para desencadear os processos celulares e as funções metabólicas responsáveis pela germinação e o subsequente crescimento da fase filamentosa (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Tabela 1 – Principais características diferenciais dos tipos de micorrizas (Adaptado de Smith & Read, 1997).

Tipo de Micorriza	Arbuscular	Ecto	Ectendo	Arbutóide	Monotropóide	Ericóide	Orquidaceae
Taxa de Fungo	Glomero	Basidi Asco Zygo	Basídio Asco	Basidio	Basiodio	Asco	Basídio
Taxa de planta	Brio Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotro- poideae	Ericales Brio	Orqui- daceae
Colonização intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Manto Fúngico	-	+	+/-	+/-	+	-	-

Os FMAs são simbioses obrigatórios, pois, para completar seu ciclo de vida, precisam estar associados às raízes de plantas vivas as quais provêm nutrientes necessários para seu desenvolvimento (SIQUEIRA et al., 1985). Este fato vem dificultando tanto estudos básicos como sua aplicação em escala comercial na agricultura, como a produção de um inóculo de qualidade e livre de impurezas (SYLVIA & JARSTFER, 1994).

WANG & QIU (2006) relatam a ocorrência da simbiose micorrízica em plantas terrestres, o qual indicou que, respectivamente 80% e 92% das plantas e famílias avaliadas formam micorrizas e que a simbiose micorrízica arbuscular é a predominante e também a mais ancestral. A ocorrência da simbiose micorrízica na grande maioria das famílias de plantas terrestres e nas linhagens primordiais das hepáticas (classe Hepaticae, divisão Briófitas) também suporta a hipótese de que os glomeromicetos foram fundamentais para a colonização inicial do ambiente terrestre das plantas.

Essa associação pode ser detectada em raízes de pteridófitas, gimnospermas e magnoliófitas e é encontrada na maioria dos ambientes terrestres naturais (dunas, florestas tropicais, savanas, pastagens), assim como em agroecossistemas e áreas degradadas. Contudo, não apenas plantas vasculares são capazes de formar associação micorrízica. Estruturas análogas às associações micorrízicas foram encontradas em complexos de briófitas talóides, indicando a possibilidade de exercer função similar àquela das plantas superiores (READ et al., 2000; NEBEL et al., 2004; LIGRONE et al., 2007).

O registro fóssil mais antigo de esporos de fungos e hifas similares aos atuais FMAs é do segundo período da Era Paleozóica, Ordoviciano, e data de 460 milhões de anos atrás, período no qual a flora possivelmente estava no nível evolutivo das briófitas (REDECKER, KODNER, & GRAHAM, 2000). Estudos no sítio aqueológico datado do início do Devoniano (cerca de 400 milhões de anos), 'Rhynie chert' na Escócia demonstraram um dos primeiros registros da simbiose de membros do filo Glomeromycota com plantas terrestres (REMY et al. 1994; REDECKER, 2002). DOZTLER et al. (2006), também verificaram associação micorrízica trabalhando nesse sítio aqueológico. Esporos de um ancestral de fungo micorrízico arbuscular com escudo de germinação, provavelmente um antecessor de *Scutellospora*, foram encontrados no tecido cortical parcialmente degradado de *Asteroxylon mackiei*, uma licófitas ancestral. Esse fato, além de contribuir para o registro da simbiose micorrízica permite um melhor entendimento da evolução do filo, sugerindo uma maior diversificação dentro do grupo antes do Devoniano mais remoto. Além de antecessores de indivíduos do gênero *Scutellospora*, DOZTLER et al. (2009), ainda observaram a presença de esporos similares a esporos do gênero *Acaulospora*.

2.1.1 Classificação dos glomeromicetos

A classificação desse grupo de fungos já teve diversas modificações. Primeiro foram incluídos na família Endogonaceae dentro do filo dos Zygomycetos por TAXTER (1922) na primeira revisão realizada sobre esse grupo de fungos. Em 1974, GERDEMAN & TRAPPE, revisando Endogonaceae, propuseram as bases até hoje utilizadas para a identificação e a classificação dos FMA. Ainda descreveram *Acaulospora* e *Gigaspora*, mas matendo todos esses gêneros em Endogonaceae. Assim, a partir de 1974 os FMA foram representados pelos gêneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Sclerocystis*.

WALKER & SANDERS (1986) estudando algumas espécies do gênero *Gigaspora*, observaram que alguns representantes possuíam parede interna (germinativa *sensu* Morton) e uma placa germinativa. Separaram então essas espécies em um novo gênero (*Scutellospora*), levando em consideração principalmente seu modo de germinação.

MORTON & BENNY (1990), proporam a ordem Glomales para agrupar os fungos que formavam micorrizas arbusculares, a qual era caracterizada pela formação de arbúsculos no córtex das plantas hospedeiras. Essa ordem possuía duas subordens, Glomineae com duas

famílias: Glomaceae e Acaulosporaceae, e Gigasporinae com apenas uma família Gigasporaceae. A diferença entre as subordens consistia na formação de vesículas no córtex das raízes dos vegetais e na capacidade do fungo em apresentar o micélio (Glomineae) enquanto Gigasporineae se caracteriza pela ausência de vesículas no cortex e presença de células auxiliares ao longo do micélio externo, no solo.

Com o advento da biologia molecular, novas famílias foram criadas (Archaeosporaceae e Paraglomaceae) (MORTON & REDECKER, 2001). Em 2001, SCHUSSLER et al. proporam a criação do filo *Glomeromycota* (monofilético) constituído por uma classe: Glomeromycetes e quatro ordens: Diversisporales (Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae), Archaeosporales (Archaeosporaceae, Geosiphonaceae), Paraglomerales (Paraglomeraceae) e Glomerales (Glomeraceae). Essa classificação se baseou no sequenciamento da subunidade menor do DNA ribossomal e estudos filogenéticos posteriores, onde se usou sequenciamento de outros genes (JAMES et al., 2006; HIBBETT et al., 2007), que confirmaram evidências apontadas por SCHUSSLER et al. (2001) (Figura 1).

Com os avanços nas pesquisas e nas técnicas moleculares, mais gêneros e espécies foram propostas e antes que fossem consolidadas foram derrubadas por trabalhos posteriores. Um exemplo disto é o trabalho de OEHL et al. (2008) unindo dados moleculares e morfológicos (número de paredes e complexidade das placas germinativas) revisaram muitas espécies de *Scutellospora* descritas e concluíram que a maioria desses representantes poderia ser realocada em cinco novos gêneros. As espécies foram agrupadas nos seis gêneros que foram distribuídos em três novas famílias Scutellosporaceae (*Scutellospora* com apenas 10 representantes), Racocetraceae (*Racocetra* e *Cetraspora*) e Dentiscutataceae (*Fuscutata*, *Dentiscutata* e *Quatunica*). MORTON & MSISKA (2010) testaram a classificação em vigência através da construção de árvores filogenéticas reconstruídas através do 25S do rRNA e de sequências do gene da β -tubulina, além de verificar essas informações com a morfologia dos escudos germinativos. Como conclusão os autores verificaram que apenas três clados (*Gigaspora* e *Racocetra* e *Scutellospora*) conseguiam ser bem diferenciados nas árvores filogenéticas e que dos cinco tipos morfológicos de escudos germinativos propostos, apenas três conseguiram ser diferenciados nas análises moleculares, discordando, portanto do trabalho de OEHL et al., 2008.

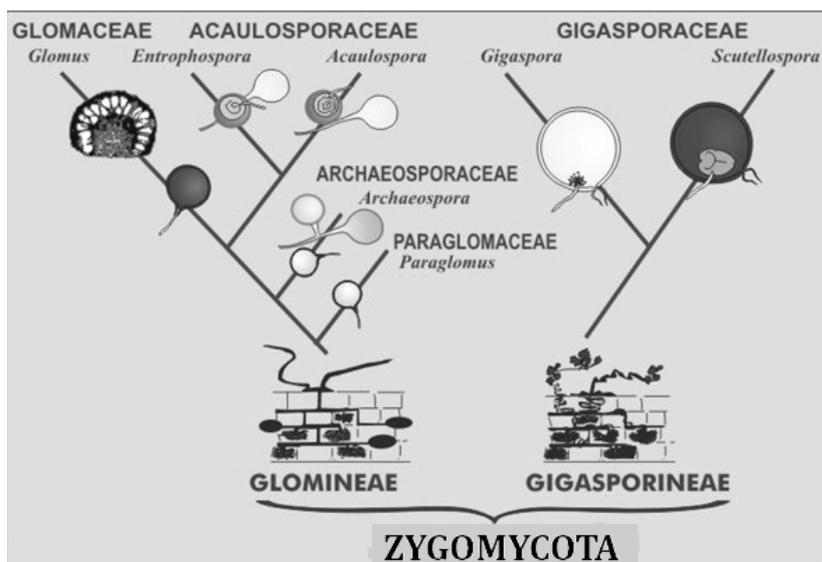


Figura 1 - Árvore filogenética proposta por Morton & Benny (1990) e modificado por Morton & Redecker (2001) tendo como base dados morfológicos e moleculares. (Fonte: <http://invam.caf.wvu.edu>).

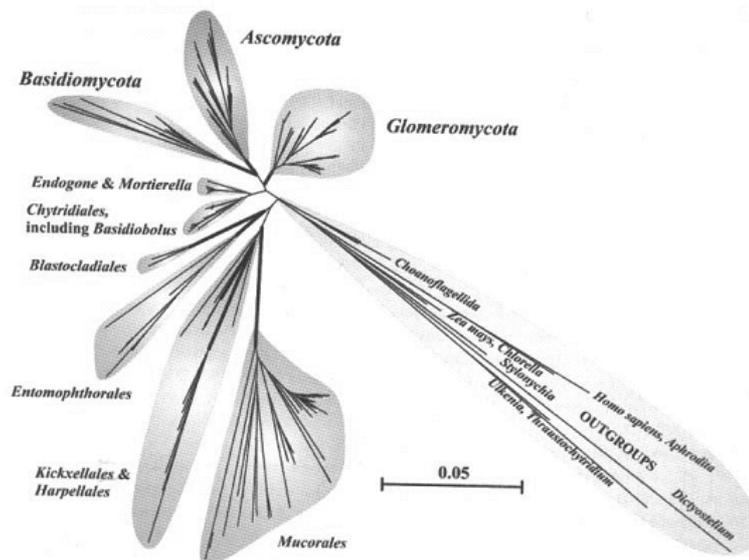


Figura 2 – Filogenia de fungos baseadas na sequência SSU do rRNA mostrando a separação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em um clado diferente dos Zygomycetos. (fonte: SCHUESSLER et al. 2001)

Até meados do ano de 2010, os fungos micorrízicos arbusculares estavam distribuídos em quatro ordens (Archaeosporales, Diversisporales, Paraglomerales e Glomerales) com treze famílias (Geociphonaceae, Archaeosporaceae, Diversisporaceae, Paraglomeraceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae, Entrophosporaceae, Scutellosporaceae, Gigasporaceae, Racocetraceae, Dentiscutataceae, Pacisporaceae e Ambisporaceae) e 19 gêneros: *Acaulospora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Intraspora*, *Kuklospora*, *Glomus*, *Ambispora*, *Otophora*, *Racocetra*, *Fuscutata*, *Cetraspora*, *Quatunica*, *Dentiscutata* e *Geosiphon* (SCHUESSLER et al., 2001; OEHL et al., 2006; OEHL et al., 2008; PALENZUELA et al., 2008; WALKER, 2008; SILVA et al., 2008)

Em recente trabalho, KAONONBUA et al. (2010) propõem a transferência de espécies do gênero *Kuklospora* para *Acaulospora*. Os autores realizaram análises moleculares de sequências do gene nrLSU e observaram o surgimento do esporo em relação ao sáculo esporífero, verificando que diferença entre esses dois gêneros consistiria apenas na posição do esporo em relação ao sáculo esporífero, sendo as etapas seguintes de formação e desenvolvimento do esporo idênticas. Com essas duas informações, o gênero *Kuklospora* foi rejeitado como um grupo monofilético válido e integrado taxonomicamente ao gênero *Acaulospora*.

No final de 2010, SCHUESSLER & WALKER publicaram uma lista de espécies com novas famílias e gêneros do filo Glomeromycota. Sua reclassificação foi baseada nas recentes análises filogenéticas realizadas por seus grupos de pesquisa e a combinação de caracteres morfológicos (quantidades e tipos de paredes, escudo germinativo, hifas e cicatrizes). As espécies que não possuíam essas evidências foram incluídas como ‘espécies em posição incerta’. Os autores ainda afirmam que a classificação proposta pode sofrer alteração à medida que forem elucidadas as dúvidas em relação a essas espécies. Contudo, optou-se por continuar utilizando a classificação proposta por OEHL et al. (2008) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação dos FMAs, atualizada em novembro de 2010. (Fonte: <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>)

Ordem	Família	Gêneros
Glomerales	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>
	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>
	<i>Scutellosporaceae</i>	<i>Scutellospora</i>
Diversisporales	<i>Racocetraceae</i>	<i>Racocetra</i> <i>Cetraspora</i>
	<i>Dentiscutataceae</i>	<i>Dentiscutata</i> <i>Fuscutata</i> <i>Quatunica</i> <i>Acaulospora</i> <i>Kuklospora</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Kuklospora</i>
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i> <i>Otopora</i>
Paraglomerales	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geophison</i>
Archaeosporales	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i> <i>Intraspora</i>

2.1.2 Função e importância

Micorrizas arbusculares são associações mutualistas entre as raízes da maioria das plantas terrestres e os fungos do filo Glomeromycota. Além do crescimento intercelular, típico nas ectomicorrizas, o processo de colonização das raízes pelos fungos micorrízicos arbusculares é caracterizado pelo crescimento intercelular das hifas no tecido cortical e pela diferenciação de hifas intracelular terminais em estruturas efêmeras e semelhantes a haustórios, chamadas arbúsculos (BONFANTE-FASOLO, 1984). Segundo MOREIRA & SIQUEIRA (2006) a associação de fungos micorrízicos arbusculares com as plantas não é uma exceção e sim uma regra já que a maioria das famílias vegetais conhecidas formam a associação.

Para que a micorriza (associação entre fungos micorrízicos e raízes de plantas) se forme é necessário que ocorram uma sequência de eventos. Segundo SIQUEIRA (1994), a colonização se inicia com o crescimento de uma hifa infectiva proveniente de qualquer propágulo do fungo. Estas hifas, quando em contato com as raízes, emitem apressórios para que a penetração seja permitida. Após o reconhecimento celular, na superfície da raiz, ocorre a infecção propriamente dita com a diferenciação da hifa em apressório seguida da penetração, a qual se dá através da combinação da pressão mecânica e degradação parcial da parede celular vegetal por enzimas produzidas pelo fungo. Logo após a penetração nas células das raízes, o fungo forma enovelamentos simples e coloniza o apoplasto e células do córtex,

formando estruturas conhecidas como arbúsculos, os quais são responsáveis pelas trocas de carbono entre a planta e o fungo. A planta fornecerá carbono para o fungo e, em contrapartida, este fornecerá ao vegetal água e nutrientes, em especial fósforo.

Segundo NUNES (2004), a eficiência da simbiose é influenciada por fatores ambientais no qual o sistema micorrízico (fungo e planta) está inserido. No solo, fatores nutricionais influenciam a germinação dos esporos, a taxa de colonização radicular, o crescimento micelial e a esporulação. Para que simbiose possa alcançar seu objetivo é necessário que o solo tenha níveis equilibrados de nutrientes.

A principal contrapartida dos fungos micorrízicos arbusculares é a absorção e transporte de nutrientes às plantas, principalmente o fósforo, elemento de baixa mobilidade em solos tropicais. Com a melhora do equilíbrio nutricional da planta, esta se torna mais tolerante a doenças e estresses abióticos (NUNES, 2004).

2.1.3 Cultivo *in vitro* de FMA

Atualmente ainda não se obteve o crescimento de FMAs em meio sintético com ausência de raízes, sendo este o maior entrave para os estudos desses fungos (STRULLU, ROMAND & PLENCHETTE, 1991). Além disso, o ciclo de vida da maioria das espécies dos fungos do filo Glomeromycota é desconhecido.

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante e a decorrente produção de raízes transformadas permitiu o cultivo *in vitro* de FMAs e têm possibilitado o monitoramento não destrutivo da simbiose micorrízica por longos períodos, suficientes para acompanhar o estabelecimento e desenvolvimento, desde a colonização radicular até a formação completa de novos glomerosporos e, especificamente, para identificação dos compostos produzidos antes, durante e após o estabelecimento da simbiose (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991). O uso de culturas de FMAs nestas raízes também permite avaliar interações metabólicas (SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2002). A possibilidade de monitoramento *in vivo* permite a observação e descrição de esporos e a formação de outras estruturas permitindo acompanhar a ontogenia destes fungos simbióticos.

Um dos primeiros relatos sobre o estabelecimento *in vitro* de FMA foi no início dos anos 1960 (MOSSE, 1962) quando a presença de *Pseudomonas* foi considerada necessária para garantir a colonização. Contudo, no início dos anos 1970 uma simbiose sem bactérias foi relatada (PHILLIPS, 1971; MOSSE, 1972).

O trabalho pioneiro de infecção de FMAs em culturas de raízes *in vitro* foi desenvolvido por MOSSE & HEPPER (1975) utilizando raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e trevo (*Trifolium pratense* L.) estabelecendo colonização de *Glomus mosseae*. Porém, as raízes não modificadas apresentavam pouco crescimento em meio com pouco açúcares, necessário para não inibir o crescimento dos FMAs. Este problema foi reduzido com a utilização de culturas de raízes transformadas pelos genes Ri ("root-inducing") da bactéria fitopatogênica *Agrobacterium rhizogenes* (MUGNIER & MOSSE, 1987).

Após o desenvolvimento da técnica de transformação pelo genes Ri e com o desenvolvimento dos meios de cultura, vários pesquisadores obtiveram esporulação de FMA em raízes transformadas cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo assim a obtenção de culturas monospóricas de FMAs (DECLERCK et al., 2006; BÉCARD & PICHÉ, 1992; BERBARA, 1995; BERBARA et al., 2006), tal fato tem possibilitado avanços substanciais em novos campos do conhecimento como biologia molecular.

A grande maioria dos trabalhos realizados com FMA se limitam a espécies do gênero *Glomus* e *Gigaspora* (SOUZA & DECLERCK, 2003). HEPPER (1981) em trabalho pioneiro com *Trifolium* sp. associado com *Glomus mosseae* e *Glomus caledonium* usando agar, papel,

ou vidro para suporte conseguiu acompanhar o estágio inicial da penetração radicular pelos fungos.

Recentemente, VOETS et al. (2005) e DUPRE de BOULOIS et al. (2006) desenvolveram dois novos sistemas autotróficos associados com o cultivo *in vitro* de esporos de FMA com *Solanum tuberosum* L. e *Medicago truncatula* Gaertner, respectivamente. Grande produção de glomerosporos foi obtida (cerca de 12.000 em 22 semanas) com batata (VOETS et al. 2005), e o transporte de C da parte aérea de *Medicago truncatula* para o fungo (VOETS et al. 2008) e do fósforo e céσιο para a parte aérea via micélio extraradicular (DUPRÉ de BOULIS et al., 2006) foi demonstrado. Contudo, várias semanas se passaram para que os níveis de infecção fossem altos. Uma razão para tal pode ser atribuída ao tempo necessário para o inóculo do fungo germinar, crescer, entrar em contato e colonizar a raiz (VOETS et al., 2009).

A técnica de cultivo de FMAs em raízes transformadas possibilita a obtenção de material padrão inicial axênico, de alta pureza e conseqüentemente permitirá o desenvolvimento de metodologias que servirão como ferramentas para estudos básicos e aplicados sobre micorrizas. O entendimento dos fenômenos que controlam a esporulação em sistemas micorrízicos permitirá, eventualmente, a produção de um meio de cultura onde FMAs possam ser multiplicados *in vitro* na ausência de raízes, retirando-se, com isso, um dos maiores obstáculos para sua utilização em larga escala na agricultura.

2.1.4 Glomalina

A identificação dos FMAs sempre foi um dos grandes entraves nos estudos ecológicos desse grupo de fungos. Tendo em vista esse problema WRIGHT e colaboradores iniciaram estudos com anticorpos para a detecção de FMAs, mas os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos não eram capazes de reconhecer sequências que possibilitassem a diferenciação de espécies (WRIGHT et al., 1987).

Os estudos avançaram nesse campo com a intenção de entender as propriedades desses antígenos. WRIGHT et al. (1996) utilizaram o anticorpo monoclonal MAb32B11, obtido de *Glomus intraradices* para visualizar o antígeno. Usando imunofluorescência indireta com este anticorpo, a glomalina foi revelada em hifas fúngicas de FMA, em raízes colonizadas, matéria orgânica, partículas do solo e dentro das células das raízes (WRIGHT et al., 1996; WRIGHT & UPADHYAYA, 1999; WRIGHT, 2000). No mesmo estudo sugeriu-se que a glomalina fosse uma proteína e se iniciou a busca por metodologias de extração tanto de solo quanto de micélio (WRIGHT et al., 1996; WRIGHT & UPADHYAYA, 1998). Os autores ainda demonstraram que tal antígeno possuía natureza protéica por este possuir bandas eletroforéticas similares às bandas observadas em proteínas do solo extraídas pelo método de Bradford (WRIGHT & UPADHYAYA, 1999) e pelo antígeno apresentar resultado positivo para lectina ligadora (WRIGHT et al., 1996) e eletroforese capilar (WRIGHT et al., 1998).

PURIN & RILLIG (2008) trabalhando com *Glomus intraradices*, em culturas *in vitro* e utilizando anticorpo monoclonal, MAb32B11, detectaram produção de glomalina em células citoplasmáticas das paredes das hifas e dos esporos de FMA.

A quantidade de glomalina é abundante (normalmente, 2-15 mg.g⁻¹ de proteína reativa por no solo) e já foi detectada em diversos ambientes (WRIGHT & UPADHYAYA, 1998; WRIGHT et al., 1999; RILLIG et al., 2001).

De acordo com as diferentes formas de quantificação, RILLIG (2004) introduziu nova nomenclatura para identificar a glomalina do solo, substituindo a então proposta por WRIGHT & UPADHYAYA (1998). Se ela for quantificada via método de ELISA é chamada de GRSP (glomalin related soil-protein - proteína do solo relacionada com a glomalina). Caso ela seja quantificado pelo método de Bradford, a concentração de glomalina total é

denominada BRSP (Bradford related soil protein - proteína do solo relacionada com Bradford) e representa a concentração de glomalina total no solo. (Tabela 3)

A principal função atribuída à glomalina é a de agregação do solo e essa proteína é bastante sensível às alterações no uso do solo, podendo ser utilizada como bom indicador de qualidade. Contudo, alguns autores (RILLIG et al. 2003; PURIN, 2005) conferem papel secundário da glomalina na agregação do solo. Devido à ligação da GRSP com os FMAs, vários estudos utilizam os teores dessa substância para identificar a presença desses fungos em culturas de casa de vegetação (WRIGHT et al., 1996).

A ecologia dos FMAs é um campo com limitada amplitude de mensuração da abundância e atividade. Isso é feito através da identificação dos esporos de campo, do comprimento do micélio externo, a colonização radicular e do potencial de inoculação. Todas essas variáveis tem limitações técnicas. A inclusão da GRSP dentre as variáveis de ecologia dos FMAs é interessante, pois a quantificação da proteína é rápida, objetiva, barata e relativamente fácil de ser conduzida (PURIN & RILLING, 2007).

Tabela 3 – Terminologias utilizadas para as diversas frações protéicas do solo e glomalina. Adaptado de Rillig (2004).

Termos propostos por Wright	Termos atuais	Justificativa
TG (glomalina total)	BRSP (proteína total reativa pelo método de Bradford)	O método de Bradford não é específico para uma única proteína
EEG (Glomalina facilmente extraível)	EE-BRSP (proteína facilmente extraível reativa pelo método de Bradford)	O método de Bradford não é específico para uma única proteína
IRTG (Glomalina total imunoreativa)	IRSP (fração de BRSP reativa com MAb32b11)	Possibilidade de reatividade cruzada com o anticorpo
IREEG (Glomalina facilmente extraível imuno-reativa)	EE-IRSP (fração de EE-BRSP reativa com MAb32b11)	Possibilidade de reatividade cruzada com o anticorpo
Glomalina	GRSP (glomalina e proteínas do solo relacionadas)	O termo glomalina deve ser utilizado apenas para o nome da proteína como produto do gene.

2.2 Raízes Modificadas Geneticamente

Culturas de órgãos e tecidos vegetais são técnicas que permitem o crescimento e a manutenção destes materiais em soluções nutritivas, sob condições axênicas. A produção destas culturas *in vitro* é uma idéia antiga (século XIX) e partiu do princípio de que as células vegetais teriam a habilidade de totipotência, ou seja, eles poderiam regenerar uma planta inteira (LIMA, 2008).

A descoberta de bactérias do solo capazes de causar modificações nas raízes foi um passo importante para o processo de produção desses órgãos vegetais *in vitro*. Bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, em especial *A. rhizogenes* (Riker) Conn que são agentes patogênicos responsáveis pela proliferação excessiva de raízes em cabeleira ou *A. tumefaciens* Smith & Townsend que causam tumores no ponto de infecção são os responsáveis pela produção das raízes modificadas. Quando as células são infectadas por *A. rhizogenes*, o DNA de transferência (T-DNA) oriundo do plasmídeo bacteriano (indutor de

raízes - Ri) é transferido, integrado e expresso na célula vegetal do hospedeiro (FLORES, 1992; ZAMBRYSKI et al., 1989). As raízes transformadas são chamadas de 'hairy roots'.

O vegetal infectado passa por sucessivas modificações em seu metabolismo, produzindo enzimas que sintetizam substâncias usadas como fonte de energia pela bactéria (opinas) e de hormônios que alteram a produção e a sensibilidade das células vegetais a auxinas (e citocininas) provocando um desbalanço no metabolismo celular, induzindo a proliferação de raízes adventícias de rápido crescimento na região de infecção (SAITO et al., 1992). O processo de integração do T-DNA no genoma da planta faz do plasmídeo Ri, vetor importante para a transferência de genes para as plantas. O processo de integração do T-DNA na célula vegetal é chamado de "transformação genética" e a raiz produzida, "raiz transgênica"(LIMA, 2008).

Existe uma certa especificidade entre as bactérias do gênero *Agrobacterium* e as espécies vegetais. Em linhas gerais, as *Agrobacterium* vêm sendo utilizadas para a produção de uma ampla variedade de dicotiledôneas transformadas. As gramíneas, entretanto, são menos suscetíveis às transformações devido a diferenças no processo de resposta a infecção. Apesar da *Agrobacterium* poder transferir T-DNA às gramíneas, as células transformadas não se dividem e, portanto, não são usadas para a regeneração de plantas transformadas (FISK & DANDEKAR, 1993).

As raízes transformadas com o T-DNA do plasmídeo Ri de *A. rhizogenes*, por ser uma doença de ocorrência natural em várias plantas não será designada no presente estudo como raízes transgênicas, termo este que está sendo usado para inserções artificiais de genes, inclusive genes exóticos ao reino vegetal. Será, portanto, utilizado neste estudo os termos raízes modificadas ou transformadas. Estas podem ser prontamente sub-cultivadas *in vitro* como culturas axênicas de raízes.

Esses "clones radiculares" são capazes de crescimento indefinido *in vitro* (SOUZA et al., 2002; BERBARA et al., 1995; FLORES, 1992). A partir destas culturas, plantas inteiras podem então ser regeneradas. Partindo-se de um material inicial com apenas alguns miligramas (uma ou duas pontas de raízes de dois a três centímetros), uma típica raiz transformada pode produzir aumentos em sua biomassa de várias centenas de vezes em apenas 3-4 semanas (SOUZA et al., 2006, SOUZA et al., 2002; BERBARA, 1995).

A síntese de metabólitos secundários por estas raízes é bastante estável e a taxa de produção destes compostos pode ser significativamente superior às encontradas em raízes não transformadas (FLORES & CURTIS, 1992; FLORES & FILNER, 1985). As raízes transformadas oferecem uma grande contribuição para o entendimento de importantes eventos relacionadas à fisiologia de plantas e à trocas de sinais entre simbiontes, como o registrado em fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) durante os processos de colonização e esporulação (DECLERCK et al., 2006; SOUZA et al., 2002; BERBARA et al., 1995).

Através do estudo das raízes modificadas, pode-se entender os mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos nos processos de colonização e esporulação micorrízica, já que se pode monitorar todos os estágios de desenvolvimento do simbionte *in vivo*, de forma não destrutiva por longo período. Como consequência, o uso de raízes transformadas como sistema modelo para o estudo de associações micorrízicas, vem se tornando cada vez mais comum (DECLERCK et al., 2006; LIMA, 2004; SOUZA et al., 2002; BÉCARD et al., 1992; BERBARA et al., 1995; FONSECA, 1994; BENHAMOU et al., 1994; SIMONEAU et al., 1994; BÉCARD & FORTIN, 1988; MUGNIER & MOSSE, 1987).

A possibilidade de utilização de raízes transformadas de espécies vegetais com dependência micorrízica tem sido proposta para a ontogenia dos glomerosporos (BERBARA et al., 1999), para o estudo do processo de colonização radicular e, especificamente, para a identificação dos compostos produzidos antes, durante e após o estabelecimento da simbiose (SOUZA et al., 2002; AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991). Utilizando as raízes

modificadas em estudos de FMAs, reduz-se os efeitos das variáveis ambientais envolvidas na simbiose, permitindo avaliar suas interações metabólicas.

Vários pesquisadores obtiveram recentemente esporulação de FMA em raízes transformadas cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo assim a obtenção de culturas monospóricas de FMAs (DECLERCK et al., 2006; LIMA, 2004; SOUZA & BERBARA, 1997; BERBARA et al., 1995; BÉCARD & PICHÉ, 1992). Cerca de 25 espécies de FMAs tem sido cultivadas com sucesso em culturas monoxênicas (FORTIN et al., 2002). Entretanto, a maior parte dessas espécies pertencem aos gêneros *Glomus* e *Gigaspora*. Contudo, espécies do gênero *Scutellospora* começam a apresentar resultados em observações *in vitro* com raízes modificadas (SOUZA & DECLERCK, 2003; SOUZA et al., 2005; KANDULA et al., 2006).

Tal fato tem possibilitado avanços substanciais em novos campos do conhecimento, superando um dos principais entraves ao uso de técnicas imunológicas e moleculares em trabalhos com FMAs que consistia na falta de material puro, com estabilidade genética e fenotípica, o que permitirá o desenvolvimento de metodologias que servirão como ferramentas para estudos básicos e aplicados de micorrizas arbusculares. Por outro lado, espera-se que estudos básicos, acerca dos mecanismos ligados as vias de fixação do carbono pelo hospedeiro, possibilitem aumentos na produção de esporos *in vitro* (LIMA, 2008).

2.3 Briófitas

Briófitas é a nomenclatura geral dada a uma divisão de plantas que não possuem vasos condutores e cujo transporte de água e nutrientes se dá através de difusão celular. Estes vegetais estão inseridos em três divisões - hepáticas (Hepatophyta), antóceros (Anthocerotophyta) e musgos (Bryophyta) (RAVEN, 2003; GOFFINET & SHAW, 2009).

As hepáticas (“liverworts”) são compostas por pequenos vegetais herbáceos com cerca de 5000 espécies distribuídas em 391 gêneros. Ocupam diversos ambientes como rochas e troncos de árvores, ocorrendo em todos os continentes, incluindo a Antártida, mas são mais diversas em florestas úmidas do hemisfério Sul (GOFFINET & SHAW, 2009).

Seu ciclo de vida é heteromórfico assim como os musgos e antóceros; com um esporófito de vida curta e dependente nutricionalmente do gametófito de vida livre e, geralmente, perene. Entretanto, estes diferem dos demais grupos em várias características citológicas, anatômicas e bioquímicas (CRANDALL-STROLLER, 1984).

De acordo com CRANDALL-STROLLER et al. (2008) as características diagnósticas da divisão são possuir aparência achatada mesmo quando frondosa, devido a organização de suas ‘folhas’ em linhas, nunca em espiral; rizóides unicelulares, com parede espessa e, normalmente, hialino; ambas as formas (frondosa ou talóide) frequentemente desenvolvem simbiose com fungos endosimbióticos; os esporófitos maduros estão fechados no tecido do gametófito e não realizam fotossíntese; as cerdas do esporófito são parenquimatosas e se alogam pela expansão das células, dificilmente por divisão celular; estruturas comuns em musgos e antóceros estão ausentes (estômatos, cutículas e columelas).

Em relação à sua evolução, julga-se que as hepáticas formam um grupo irmão com todas as outras plantas terrestres (QIU et al., 2006). Fósseis de esporos semelhantes aos de hepáticas datam de 475 milhões de anos atrás (WELLMAN et al., 2003) e estimativas do tempo de divergência baseadas em evidências moleculares sugerem que o filo tenha se originado no final do período Ordoviciano (HEINREICHS et al., 2007). As briófitas tipo hepáticas estão entre os organismos colonizadores do habitat terrestre e parecem ter mantido suas características primitivas de forma inalterada através do tempo, provavelmente é peça chave para a colonização pioneira da terra e diversificação das plantas terrestres (READ et al., 2000; RENZAGLIA et al., 2007).

As hepáticas são, tradicionalmente, subdivididas em dois subgrupos: Marchantióides ou talóides complexas; e Jungermanniíde que, por sua vez é subdividido em dois grupos morfológicos (anacrogineos ou talóides simples e acrogineos ou hepáticas frondosas) (CRANDALL-STOTLER et al., 2008).

Fungos micorrízicos são conhecidos por utilizar as briófitas como fonte de nutrientes e parecem se aproveitar das plantas. Períodos alternados de alagamento e seca resultam numa perda de nutrientes por lixiviação dos gametófitos das briófitas, os quais serão usados pelos fungos micorrízicos para proliferar nas superfícies das camadas do solo (CARLETON & READ, 1991).

Musgos, o maior grupo de briófitas, são geralmente não micorrízicos, mas sempre contém hifas endofíticas de FMA (RABATIN, 1980). Hepáticas e Antóceros formam associações similares a micorrizas com fungos do filo *Glomeromycota*. Espécies desse filo com hifas finas são comuns em briófitas, mas outros FMAs, como os do gênero *Glomus*, também estão presentes (SCHUSSLER, 2000). Algumas briófitas talóides (Marchantiales) são conhecidas por formarem associações similares a micorrizas (FONSECA et al., 2009).

Uma das espécies de hepáticas capazes de formar associação com fungos micorrízicos é a *Lunularia cruciata* (L.) Lindb. Pertencente ao filo Marchantiophyta (STOTLER & CRAND.-STOTLER), ordem Lunulariales (D.G. Long), família Lunulariaceae (CRANDALL-STOTLER et al., 2008).

O uso de briófitas para a produção de FMAs *in vitro* também é uma opção para os estudos sobre desenvolvimento e produção de glomerosporos já que esses vegetais também são capazes de formar associação micorrízica e são de fácil multiplicação em cultivo *in vitro* (LIGRONE et al. 2007; NEBEL et al. 2004; READ et al. 2000).

Portanto, para se entender as associações micorrízicas são necessários estudos, não apenas sobre o sistema de produção *in vitro* com o uso de raízes transformadas geneticamente, mas também devem ser avaliadas as modificações metabólicas que ocorrem neste sistema de cultivo, já que elas podem influenciar a esporulação dos FMA. Além disso, a opção por outros vegetais em cultivo *in vitro* pode favorecer os estudos da simbiose e reduzir os custos de produção e manutenção de um banco de germoplasma *in vitro*.

2.4 Substâncias Húmicas e Ácidos Húmicos

As substâncias húmicas são macromoléculas de alto peso molecular, sem fórmula definida e geralmente composta de cadeias aromáticas e alifáticas, grupos cetônicos, fenólicos, enólicos, entre outros; estão presentes no solo e vermicompostos (SANTOS & CAMARGO, 1999). São constituídas por vários compostos de elevado peso molecular, coloração escura e separáveis pelo uso de bases. Geralmente, são divididas em três frações: humina (insolúveis em meio alcalino); ácidos húmicos (fração escura extraída em meio alcalino e insolúvel em meio ácido diluído) e ácidos fúlvicos (fração colorida alcalino-solúvel que se mantém em solução após a remoção dos ácidos húmicos por acidificação) (STEVENSON, 1994).

As substâncias húmicas desempenham um papel importante na qualidade dos sistemas agrícolas, pois interferem na disponibilidade de nutrientes para as plantas, são fontes de energia para os microrganismos do solo, influenciam de maneira decisiva nas características químicas, físicas e biológicas do solo (MIELNICZUK, 2008) e exercem efeitos diretos sobre o desenvolvimento das culturas (STEVENSON & COLE, 1999).

Em relação aos ácidos húmicos, vários autores acreditam que essa fração influenciem na fertilidade do solo por meio de uma melhoria geral das condições químicas e físicas para a atividade biológica tendo, além disso, substâncias ativas fisiologicamente (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a e b; FAÇANHA et al., 2002;

CANELLAS et al., 2001; SONNTAG, 1995; STEVENSON, 1994; GUMINSKI et al, 1968) podendo influenciar também a biota rizosférica, particularmente os FMAs (LIMA, 2008).

Os efeitos dos ácidos húmicos (AH) sobre as micorrizas ainda é pouco estudado. Entretanto, já foi observado acréscimo na densidade de esporos em solos quando submetidos à incorporação de matéria orgânica (ZAMBOLIM et al., 1992), provavelmente devido ao favorecimento da aeração e aumento do desenvolvimento radicular. JOHNSON (1998) verificou que a colonização micorrízica era favorecida por aumentos no conteúdo de matéria orgânica do solo.

GRYNDLER et al. (2009) em estudos sobre a influência da decomposição da matéria orgânica do solo (MOS) por FMAs e seu efeito no crescimento de hifas e colonização radicular verificaram que pequenas quantidades de matéria orgânica do solo podem influenciar o desenvolvimento dos fungos micorrízicos e que os componentes produzidos durante a decomposição da matéria orgânica estão envolvidos na resposta ao crescimento do micélio dos fungos.

Em outro trabalho, GRYNDLER et al. (2005) estudaram o crescimento de hifas e formação de micorriza arbuscular de *Glomus claroideum* (BEG 23) estimulado por substância húmicas e verificaram que a adição dessa substância húmica promove o desenvolvimento intra e extraradicular.

LIMA (2008) avaliou a interação micorriza/nitrato redutase/ácido húmico na atividade de bombas de prótons e no metabolismo de N em raízes transformadas de manjeriço e trevo e verificou que a adição de ácidos húmicos na solução de cultivo (20 mg C L^{-1}) estimulou a colonização de *Glomus clarum* nas raízes de manjeriço e trevo, e também na atividade das bombas de prótons (P-H⁺-ATPase e H⁺-PPase), nos teores de N-NO₃⁻ e na atividade da nitrato redutase nas raízes colonizadas ou não pelos FMAs e a presença de ácido húmico proporcionou as maiores taxas de colonização micorrízica em ambas às raízes estudadas, sendo mais expressivas em baixos níveis de N-NO₃⁻ ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE GLOMEROSPOROS, PRODUÇÃO DE GLOMALINA, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são organismos presentes na maioria dos ecossistemas, são simbiontes obrigatórios e produzem de uma proteína responsável, principalmente, pela agregação do solo. Sua identificação é feita baseada em caracteres morfológicos e em biologia molecular. Estudos *in vitro* de FMA ainda são restritos devido a inúmeras limitações nas técnicas, mas são de grande importância para o conhecimento da biologia desses organismos. Com o objetivo de verificar diferenças entre a quantidade dos teores de glomalina produzida pelas diferentes espécies de FMA, suas características morfológicas e sua capacidade e forma de desenvolvimento *in vitro*, foram estudadas diferentes espécies de fungos micorrízicos do banco de germoplasma da Embrapa Agrobiologia. Para a quantificação dos teores de glomalina foram utilizados oito isolados das seguintes espécies: *Acaulospora morrowiae* (A19), *Acaulospora scrobiculata* (A38), *Kuklospora colombiana* (A87), *Glomus formosanum* (A20), *Glomus manihots* (A83), *Scutellospora heterogama* (A2) e duas linhagens de *Gigaspora margarita* (A1 e A49). Foram realizadas extrações com citrato de sódio 20 mM e 50 mM, respectivamente, para glomalina facilmente extraível (GFE) e glomalina total (GT). A proteína foi quantificada pelo método de Bradford. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o teste de germinação, glomerosporos de *Gi. margarita* (A1 e A49), *S. heterogama* (A2), *A. scrobiculata* (A38), *G. manihots* (A83) e *K. colombiana* (A87) foram extraídos, desinfestados superficialmente e colocados em placa Petri com meio Agar-água (1%) em câmaras termostáticas com temperatura controlada a 26 °C e na ausência da luz para germinação. O teste de germinação das espécies de FMAs foi montado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6x4 (6 espécies de FMAs e 4 períodos de avaliação: 5, 7, 10 e 15 dias após a inoculação) e seis repetições, sendo a parcela experimental constituída de um compartimento de placa contendo 15 glomerosporos. A porcentagem de germinação obtida em relação ao total de esporos presentes no compartimento foi submetida à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Os glomerosporos de *Gi. margarita*, *G. manihots* e *G. proliferum* (esta espécie em cultivo *in vitro* com briófita *Lunularia cruciata*) germinados foram colocados em placas com raízes de manjeriço modificadas e seu desenvolvimento *in vitro* foi observado até os 100 dias após a inoculação. A quantidade de glomalina produzida pelos diferentes FMAs é distinta, sendo mais eficiente evidenciar essas diferenças na extração da glomalina total. Há necessidade de mais estudos para caracterizar espécies de FMAs quanto à produção de glomalina, mas há indícios que esta distinção seja possível pelo menos até gênero. *S. heterogama* foi a espécie com maiores taxas de germinação de glomerosporos, seguida da *Gi. margarita*. O padrão de desenvolvimento das espécies de FMAs *in vitro* foi semelhante aos estudos anterior sendo a forma de desenvolvimento do *G. manihots* similar à entrofosporóide. As espécies de *Glomus* possuem ciclo de vida mais curto, com a esporulação ocorrendo logo após a formação da simbiose.

Palavras chave: Ontogenia. Proteína relacionada à glomalina do solo. Taxonomia.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are organisms present in most ecosystems, they are obligatory symbionts and produce a protein primarily responsible for soil aggregation. The identification of the group is based on morphological and molecular biology. *In vitro* studies of AMF are still restricted due to numerous limitations in the techniques, but have great importance for the understanding of the biology of these organisms. Aiming to assess the differences between the quantity of the contents of glomalin produced by different AMF species, their morphological characteristics and their ability and form of development *in vitro*, we studied different species of mycorrhizal fungi of the germplasm bank of Embrapa Agrobiologia. To quantify the levels of glomalin were used eight strains of the following species: *Acaulospora morrowiae* (A19), *Acaulospora scrobiculata* (A38), *Kuklospora colombiana* (A87), *Glomus formosanum* (A20), *Glomus manihots* (A83), *Scutellospora heterogama* (A2) and two strains of *Gigaspora margarita* (A1 and A49). The extraction was made using 20 mM sodium citrate and 50 mM, respectively, to easily extractable glomalin (GFE) and total glomalin (TG). The protein was quantified by Bradford method. The results were subjected to analysis of variance and Scott-Knott test at 5% probability. To test germination of *Gi. margarita* glomerospores (A1 and A49), *S. heterogama* (A2), *A. scrobiculata* (A38), *G. manihots* (A83) and *K. colombiana* (A87) were extracted, superficially disinfested and placed in Petri plate with Agar-water (1%) in chambers with temperature thermostatically controlled at 26 ° C and in the absence of light for germination. The germination of the AMF species was assembled in a randomized design in factorial arrangement 6x4 (6 AMF and four assessment periods: 5, 7, 10 and 15 days after inoculation) and six replications, and the plot was constituted of a compartment plate containing 15 glomerospores. The germination percentage obtained in relation to total spores in the compartment was subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% probability. The glomerospores of *Gi. margarita*, *G. proliferum* and *G. manihots* (this species in cultivation *in vitro* with bryophyte *Lunularia cruciata*) germinated were placed on plates with modified basil roots and their development *in vitro* was observed until 100 days after inoculation. The amount of glomalin produced by different AMF is distinct, being more efficient highlight these differences in the extraction of total glomalin. There is a need for further studies to characterize AMF species on the production of glomalin, but evidence suggests that such distinction is possible at least to genus. *Scutellospora heterogama* was the species with higher germination rates of glomerospores, followed by *Gi. margarita*. The pattern of development of AMF *in vitro* was similar to previous studies and the development of form similar to *G. manihots* entrophosporoide. *Glomus* species have a shorter life cycle, with sporulation occurring shortly after the formation of symbiosis.

Key words: Ontogeny. Glomalin related soil protein. Taxonomy

1- INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são abundantes na maioria dos biomas (TRESEDER & CROSS, 2006) e formam associação mutualista com mais de 80% de todas as famílias de plantas conhecidas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esses fungos produzem uma glicoproteína denominada glomalina (DRIVER et al., 2005; WRIGHT & UPADYAYA, 1996), cujo principal papel é o de agregação do solo. Nas pesquisas iniciais com essa proteína, acreditava-se que ela era apenas produzida nas hifas dos fungos micorrízicos, porém, estudo de PURIN & RILLIG (2008) com a espécie *Glomus intraradices* (Schenck & Sm.), em culturas *in vitro* e com anticorpo monoclonal, MAb32B11, detectaram produção de glomalina também em células citoplasmáticas das paredes das hifas e dos esporos de FMA.

Devido a relação da glomalina com os FMAs, vários estudos utilizam os teores dessa substância para identificar a presença desses fungos em culturas mantidas em casa de vegetação (WRIGHT et al., 1996). Sugere-se que a produção de glomalina seja afetada diretamente pela abundância e composição da comunidade de FMAs e, indiretamente pelo balanço de nutrientes na planta, pelo comprimento das raízes e pela planta hospedeira presente. (TRESEDER & TURNER, 2007). Dentro destes aspectos, merece particular estudo a possibilidade que diferentes espécies de FMA colonizando uma mesma planta hospedeira possam produzir quantidades variáveis de glomalina.

A ecologia dos FMAs é um campo com limitada quantificação da abundância e atividade das comunidades, sendo que estas características quantitativas ecológicas somente são aferidas através de análise taxonomica clássica, por caracteres morfológicos, dos glomerosporos no solo, estimativa do comprimento do micélio extrarradicular, colonização micorrízica das raízes e estimativa do potencial de inoculação. Todas essas variáveis tem limitações das técnicas de análise resultando em dados com alta variabilidade. A inclusão da análise da proteína do solo relacionada à glomalina' (PSRG) dentre as variáveis de ecologia dos FMAs é interessante e sua quantificação é rápida, de leitura direta em espectrofotômetro, barata e relativamente fácil de ser conduzida em laboratório (PURIN & RILLING, 2007).

Estudos com FMA são de difícil condução, pois esses organismos, como simbioses obrigatórios, não crescem em meios tradicionais, dificultando os trabalhos taxonômicos (morfológicos e moleculares) e fisiológicos. Estudos de multiplicação *in vitro* são restritos a algumas espécies. A viabilidade dos glomerosporos, pureza e estabilidade são os principais entraves encontrados. A viabilidade é confirmada a partir do crescimento do FMA em meio de cultura adequado. Os testes de viabilidade são feitos pela germinação dos glomerosporos ou da colonização radicular após certos períodos de cultivo. A pureza da estirpe é um dos pontos cruciais para o estabelecimento das culturas. Além disso, muitas bactérias e propágulos de fungos não micorrízicos habitam as paredes dos glomerosporos e o processo de desinfestação superficial com fungicidas e bactericidas é ineficiente ou prejudicial aos FMAs.

A manutenção da estabilidade da cultura é fator importante. Com diversos ciclos de multiplicação dos glomerosporos pode haver perda de características morfológicas ou de infectividade (DECLERCK et al., 2005). Algumas culturas não tiveram sucesso na manutenção, tais como *Acaulospora rehmsii* (DALPÉ & DECLERCK, 2002) e espécies de *Gigaspora* (FORTIN et al., 2002). Assim devem ser aprimoradas as técnicas de germinação e desenvolvimento de várias espécies FMAs *in vitro*, para ampliar a disponibilidade de material axênico para estudos moleculares e biotecnológicos.

O objetivo deste trabalho foi estimar a produção de glomalina, caracterizar morfológicamente os glomerosporos e estimar taxa de germinação e desenvolvimento *in vitro* para espécies de FMAs, multiplicadas sob a mesma planta hospedeira.

2- MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de FMA foram obtidas da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia (COFMEA), sendo *Acaulospora morrowiae* (A19), *Acaulospora scrobiculata* (A38), *Kuklospora colombiana* (A87), *Glomus formosanum* (A20), *Glomus manihots* (A83), *Scutellospora heterogama* (A2) e duas linhagens de *Gigaspora margarita* (A1 e A49), num total de oito isolados.

Os fungos foram multiplicados em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas em vasos com substrato esterilizado composto de areia e solo argiloso na proporção (1:1) e como planta hospedeira foi utilizada *Brachiaria decumbens* Stapf. Os vasos foram irrigados uma vez por semana para que a gramínea apresentasse estresse, induzindo a esporulação dos fungos. Cada vaso foi mantido por cerca de um ano em casa de vegetação quando suspendeu-se a irrigação até a completa desidratação da planta. Então os vasos foram armazenados e o solo utilizado como inoculante nos experimentos. Foram utilizados fungos multiplicados em dois anos diferentes, 2008 e 2009. Os vasos de multiplicação foram considerados num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X8 (dois anos de multiplicação e oito espécies de FMA) sendo tomadas duas amostragens por vaso consideradas como repetições.

2.1 Extração e Quantificação de Glomalina

A extração da proteína do solo relacionada à glomalina (PSRG) foi realizada segundo metodologia de WRIGHT & UPDAHYAYA, 1998. Foram estimadas duas frações da PSRG, a glomalina facilmente extraível (GFE) e a glomalina total (GT).

Para cada fração pesou-se 1g de terra fina seca ao ar (TFSA) dos inóculos de cada fungo em cada ano de multiplicação. A GFE foi obtida utilizando-se 8 mL de solução citrato de sódio 20mM, pH 7,0 a temperatura de 121° C por 30min. A GT foi obtida adicionando-se 8 mL de citrato de sódio 50 mM, pH 8,0 a 121° C, por 60 min. Foram necessários dois ciclos para a extração completa da fração GT até que as amostras apresentassem coloração amarelado-claro. A fração GFE foi centrifugada por 15 min a 5000 rpm e a fração GT, por 10 min a 5000 rpm.

Os sobrenadantes foram coletados e foi quantificado o teor de proteína através do método de Bradford (1976) modificado por WRIGHT et al. (1996), usando como padrão soroalbumina bovina. As concentrações de glomalina foram corrigidas para mg.g^{-1} de solo, considerando o volume total de sobrenadante e o peso seco do solo.

Os dados foram testados quanto a normalidade e submetidos a análise de variância com a aplicação nas médias do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.2 Desinfestação Superficial dos Glomerosporos e Teste de Germinação

Os glomerosporos de *Gigaspora margarita* (A1 e A49), *Scutellospora heterogama* (A2), *Acaulospora scrobiculata* (A38), *Glomus manihots* (A83) e *Kuklospora colombiana* (A87) foram extraído do solo dos vasos de multiplicação através das técnicas de peneiramento úmido e centrifugação com sacarose a 50% (GERDEMAN & NICHOLSON, 1963; DANIELS & SKIPPER, 1982). Estes foram levados a lupa e os de melhor aparência selecionados. Após a seleção, procedeu-se a desinfestação superficial (BÉCARD & PICHE, 1992) onde os glomerosporos foram lavados com água e três gotas de TWEEN 20 por um minuto, depois foram lavados e sonicados por 10 minutos, duas vezes, em cloramina T 2%. Na sequência, foram lavados cinco vezes com uma solução de antibióticos (gentamicina

0,05% e estreptomicina 1,0%). Após essa etapa os glomerosporos foram levados a geladeira na solução de antibióticos por 16 horas. Em seguida repetiu-se o processo de desinfestação a partir da cloramina T. Os glomerosporos não foram lavados com água destilada autoclavada após contato com a solução de antibióticos.

Placas com dois compartimentos foram preenchidas com meio Agar-água 1% (pH 7,0) onde os glomerosporos foram inoculados e incubados em câmaras termostáticas com temperatura controlada a 26 °C e na ausência da luz para germinação. O teste de germinação das espécies de FMA foi montado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6x4 (6 espécies de FMAs e 4 períodos de avaliação: 5 , 7, 10 e 15 dias após a inoculação) e seis repetições, sendo a parcela experimental constituída de um compartimento de placa contendo 15 glomerosporos; Consideraram-se germinados os glomerosporos com tubo germinativo de 2 vezes o seu diâmetro. A porcentagem de germinação obtida em relação ao total de esporos presentes no compartimento foi submetida à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

2.3 Desenvolvimento *in vitro* das Espécies de FMA

As espécies de FMA que conseguiram se desenvolver *in vitro* tiveram seu ciclo de vida avaliados. Cinco dias após a germinação dos glomerosporos, estes foram removidos com pedaço de ágar com auxílio de bisturi e colocados em placas com meio MSR e segmentos de raízes de manjerição modificadas através do plasmídeo Ri transferido pela bactéria *A. rhizogenes*. As culturas foram mantidas por 100 dias e avaliadas quanto ao desenvolvimento dos FMAs a cada 10 dias com auxílio de estereoscópio e microscópio invertido.

2.4 Caracterização Morfológica das Espécies de FMAs

Para a caracterização morfológica, glomerosporos extraídos do solo foram montados em lâminas sob resina polivinil álcool glicerol (PVLG) e PVLG+Reagente de Melzer (1:1). As lâminas foram analisadas em microscópico atentando para os principais caracteres morfológicas dos glomerosporos, tais como forma, tipo e número de paredes, presença ou ausência de cicatrizes e hifas de sustentação, presença e forma do bulbo suspensor, número de hifas no glomerosporo, estruturas de germinação (placas germinativas e orbs) e reação ao Melzer. Os dados foram comparados com descrições das espécies disponíveis na internet e nas descrições originais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teores de Glomalina

Os teores de glomalina facilmente extraível (GFE) variaram entre 0,51 e 0,79 mg g⁻¹ (Figura 3). No primeiro ano (2008) verificaram-se maiores teores de GFE, sendo *Kuklospora colombiana* (A87) a espécie com maior produção da proteína e *A. scrobiculata* (A38), com as menores. No segundo ano de amostragem (2009) os teores de GFE diminuíram exceto nos acessos *G. margarita* (A1) e *Gl. formosanum* (A38) que não diferiram entre as duas amostragens. *A. scrobiculata* (A38) apresentou maiores teores de proteína na segunda amostragem. No segundo ano, observou-se que *Gigaspora margarita* (A1) produziu maiores teores de GFE seguido de *Acaulospora morrowiae* e *A. scrobiculata* (A19 e A38, respectivamente) e *Scutellospora heterogama* (A2) apresentou os menores teores.

WRIGHT & UPADHYAYA (1996) observaram que isolados de *Gigaspora rosea* e *Glomus caledonium* produziam 30 a 43% a mais de GFE que *Glomus intraradices*. LOVELOCK et al. (2004) observaram altos teores de GFE produzidos por *Acaulospora morrowiae* (0,036 µg m⁻¹ de hifa) quando comparados com *Gigaspora rosea*, *Glomus etunicatum* e *Glomus intraradices* (0,026; 0,022 e 0,007 µg m⁻¹ de hifa, respectivamente).

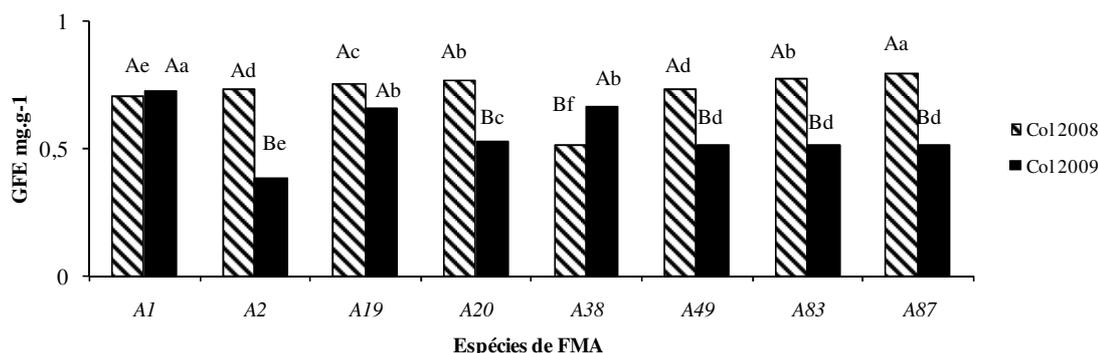


Figura 3 - Teores de Glomalina Facilmente Extraível nas diferentes espécies de FMA da coleção da Embrapa Agrobiologia em duas épocas de coletas dos inoculos.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula demonstram diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott à 5% entre épocas e letras minúsculas diferenças entre as espécies na mesma época de coleta.

Analisando os teores de glomalina total (Figura 4) verifica-se que na segunda coleta (2009) os teores desta proteína foram inferiores em todas as espécies de FMA estudadas. Esse efeito pode ter sido causado por uma maior esporulação dos acessos na segunda coleta, confirmando a teoria de DRIVER et al. (2005) que os maiores teores de glomalina são produzidos nas paredes das hifas.

Na primeira amostragem (2008) verificou-se que *Gigaspora margarita* (A1) foi a espécie que apresentou maior teor de GT e *Glomus formosanum* (A20), o menor. As demais espécies tiveram valores intermediários entre esses dois acessos sendo *Ac. morrowiae* (A19) e *Glomus manihots* (A83) iguais entre si. A38 e A87 não diferiram estatisticamente entre si.

Na segunda amostragem (2009) a *Ac. morrowiae* (A19) produziu maiores teores de GT seguida por *Gigaspora margarita* (A1), enquanto *Glomus formosanum* (A20), *Acaulospora scrobiculata* (A38) e *Glomus manihots* (A83) foram as espécies que produziram menor teor de GT.

Tanto para GFE quanto GT houve diferenças entre os dois acessos de *Gigaspora margarita* (A1 e A49). Sendo A1 sempre superior na produção da proteína exceto nos teores de GFE de 2008. Essa diferença nos teores de glomalina produzida pode estar relacionada com a taxa de esporulação das espécies.

De forma geral, foi observado que as espécies de *Glomus* produziam menores teores de GT (média de 1,09 mg g⁻¹) comparado com os demais gêneros (média de 1,30 mg g⁻¹). Isso pode ser explicado pela diferente estratégia de vida dos indivíduos desse gênero. Os *Glomus* investem mais em colonização radicular e menos em micélio externo que *Gigaspora*, *Acaulospora* e *Scutellospora* (DODD et al., 2000; TRESEDER, 2005).

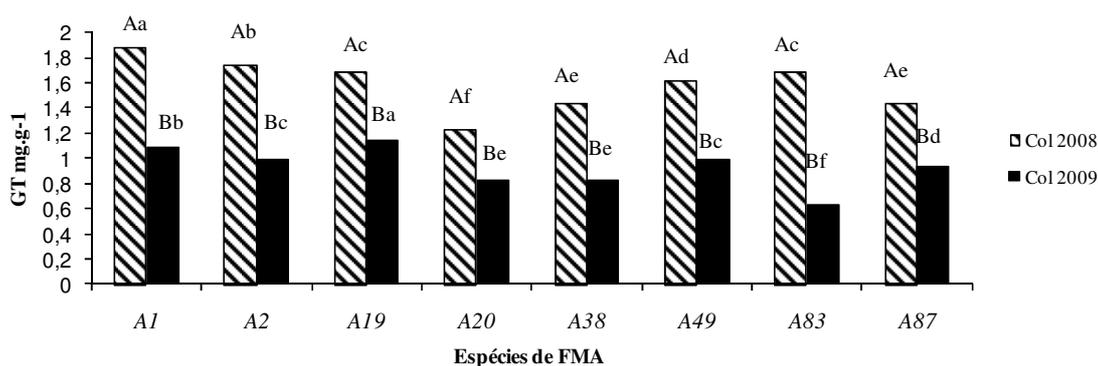


Figura 4 - Teores de Glomalina Total nas diferentes espécies de FMA da coleção da Embrapa Agrobiologia em duas épocas de coletas dos inóculos.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula demonstram diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott à 5% entre épocas e letras minúsculas diferenças entre as espécies na mesma época de coleta.

3.2 Germinação de Glomerosporos

Durante os quinze dias de avaliação da germinação dos glomerosporos pode-se observar que a germinação de *Scutellospora heterogama* e os dois acessos de *Gigaspora margarita*, se iniciava em cinco dias (Figura 5).

A partir do sétimo dia após a inoculação, *S. heterogama* apresentou um aumento na germinação e essa tendência continuou até o 15º dia, onde há uma diminuição na taxa de germinação. Os dois acessos de *Gigaspora margarita* possuem germinação também em níveis ascendentes até o 15º dia.

Observa-se também que *Acaulospora scrobiculata* inicia sua germinação a partir do sétimo dia com tendências, aumentando com o passar do tempo. Já *Glomus manihots* não apresenta incremento nas taxas de germinação após o sétimo dia. *Kuklospora colombiana* possuiu germinação nula, fato que se deve pela inibição da germinação ocasionada pelo processo de desinfestação, pelos glomerosporos estarem em fase de dormência.

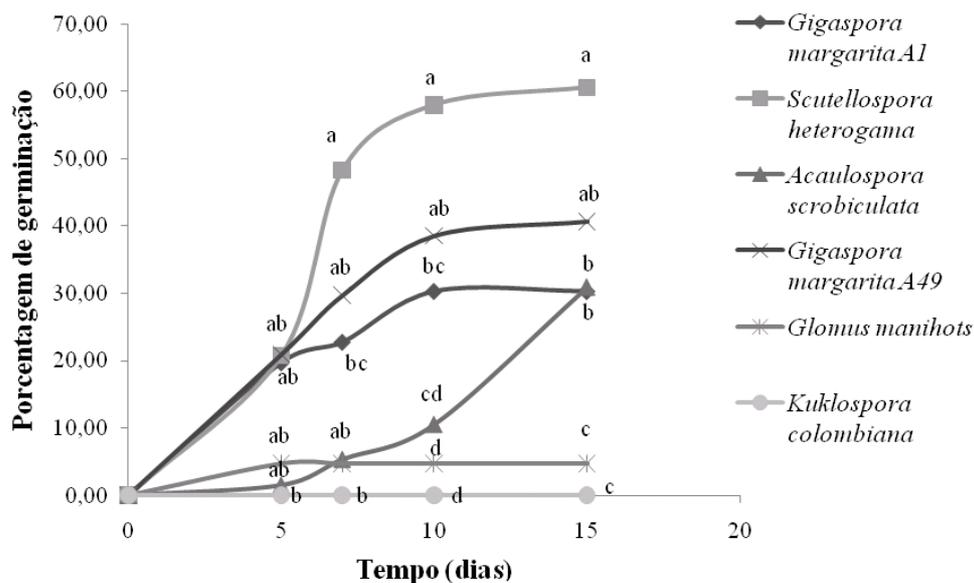


Figura 5 - Taxa de germinação (%) de glomerosporos de fungos micorrízicos arbusculares após desinfestação superficial.

Os níveis de germinação em *Gigaspora* atingem de 80 a 100% (KOSKE, 1981; BÉCARD & PICHÉ, 1989; DIOP et al., 1992; ROMERO & SIQUEIRA, 1996; MAIA & YANO-MELO, 2001). comparados com 60% de *Scutellospora* (SOUZA & DECLERCK, 2003). Esses dados diferem dos obtidos no presente trabalho, mas se deve levar em consideração que as condições de desinfestação dos glomerosporos foram diferentes. Sugere-se que a não remoção da solução de antibiótico antes da inoculação em meio de cultura tenha servido como importante etapa para quebra de dormência nessa espécie de *Scutellospora*. Além disso, a baixa taxa de germinação da espécie do gênero *Glomus* poder estar relacionada a não lavagem dos esporos após a imersão em antibiótico.

Vários fatores podem ter influenciado a germinação tais como: glomerosporos inviáveis ou velhos, dormência das espécies e inibição da germinação pelo processo de desinfestação.

A dormência dos glomerosporos é um fenômeno bastante reportado (TOMMERUP, 1983; SIQUEIRA et al., 1985; CHABOT et al., 1992). Um esporo é considerado dormente quando falha na germinação e crescimento de hifa após ser submetido a condições físicas e químicas que garantam germinação (TOMMERUP, 1983). JUGE et al. (2002) acreditam que a dormência seja conferida por um estágio fisiológico interno, o qual é quebrado por uma ativação crítica, que resulta na germinação do esporo. Diversos trabalhos têm demonstrado que estocar os glomerosporos no frio favoreceria a quebra da dormência (ELIAS & SAFIR, 1987; GEMMA & KOSKE, 1988; CHABOT et al., 1992). Para SIQUEIRA et al. (1985) outros fatores além da temperatura podem favorecer a quebra da dormência.

O pH do meio de cultura é um fator a ser considerado como responsável pela dormência dos glomerosporos. A temperatura na qual os propágulos do fungo são mantidos para germinar também é uma condição que pode favorecer ou não a dormência. A temperatura ótima varia de acordo com o fungo micorrízico em questão. SAFIR (1986) mostrou que *Glomus mosseae* e *Acaulospora leavis* germinam a níveis ótimos entre 20 e 25° C. Espécies de *Gigaspora* possuem temperatura ótima de germinação variando entre 20 e 30° C. BÉCARD et al. (1989), BÉCARD & PICHÉ (1989), BÉCARD et al. (1992) e POULIN et al. (1993) evidenciaram que o CO₂ leva a aumentos nos níveis de germinação dos glomerosporos.

3.3 Caracterização Morfológica das Espécies de FMA

As espécies de FMAs foram identificadas com base nos caracteres morfológicos dos glomerosporos. Essas estruturas (esporos) são formados repetidamente nas hifas extraradiculares e, em algumas espécies, também nas intra-radiculares. Um esporo reúne o sistema de informações genômicos de um fungo em um pacote que resiste às variações ambientais. É responsável por dispersar informações para outras áreas e iniciar a formação de uma nova simbiose (MORTON et al., 1992).

3.3.1 *Gigaspora margarita* W.N. Becker & I.R. Hall

Os glomerosporos apresentaram coloração creme a amarelo-escuro na lupa e amarelada nas lâminas. Formato, geralmente globoso. Os esporos apresentavam um grupo de paredes (apenas o estrutural) composta por três camadas. A primeira camada é permanente, rígida, aderida à segunda, com coloração marron-amarelado. É laminada, apresentando plasticidade quando quebrada. É amarela podendo variar para o amarronzado. Essa camada apresenta reação ao Melzer adquirindo coloração marron-avermelhado a vermelho púrpura. A terceira camada é hialina e aderida à segunda. Nela são encontradas papilas que se encontram concentram próximas aos tubos germinativos (Figura 6).

Essa espécie apresenta hifa com bulbo sendo esta septada e com coloração menos intensa que a parede do esporo. A inserção da hifa à parede do esporo é feita por um 'plug'.



Figura 6 - Glomerosporo de *Gigaspora margarita*: detalhe da hifa bulbosa e das papilas próximas à hifa. Foto:Goto, 2009.

De acordo com a descrição original da espécie, BECKER & HALL (1976) relataram que os esporos possuíam parede com várias laminações (de 4 a 8, podendo chegar até 10 lâminas), as quais aumentam com a idade do esporo. Também foram observadas papilas distribuídas por toda a superfície do esporo, as quais tendiam a coalescer, principalmente nas regiões germinativas, com a maturidade do esporo.

3.3.2 *Scutellospora heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders

Os glomerosporos têm coloração laranja escuro a castanho. Quando jovens, os esporos são claros (creme ou rosados) porém, quando em contato com Melzer ficam quase pretos. Forma subglobosa variando até oblonga.

A parede do esporo é subdividida em três camadas: a primeira é rígida, de coloração amarronzada. A segunda camada é laminada, tem coloração laranja-escuro podendo chegar a castanho; quando em contato com Melzer a coloração dessa camada fica vermelho-escuro. A terceira camada é hialina e flexível (Figura 7).

Essa espécie possui verrugas na segunda camada da parede do esporo e essa é uma das características morfológicas que facilita a identificação da mesma. Segundo KOSKE & WALKER (1985), as diversas verrugas pequenas na superfície do esporo e na parede estrutural diferenciam a *S. heterogama* das demais espécies.

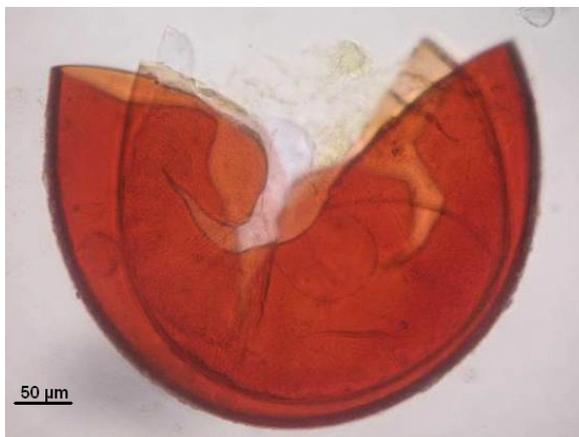


Figura 7 - Glomerosporo de *Scutellospora heterogama*. Foto: Goto, 2009.

O escudo germinativa (placa) é simples, com formato de violino e possui dois compartimentos, dando origem a dois tubos germinativos.

3.3.3 *Acaulospora morrowiae* Spain & N.C. Schenck

Os glomerosporos são globosos a subglobosos. A parede do esporo dividida em dois grupos: o estrutural com formada por três camadas e a germinativa com duas camadas. No grupo estrutural, a camada mais externa da parede do glomerosporo é hialina em água, está aderida à segunda camada e é expansiva em PVLG; a segunda parede tem coloração amarelo-clara a amarelo e é laminada; a terceira camada é quebradiça e hialina. No grupo germinativo, a primeira parede é membranosa e, usualmente, aderente à segunda parede; esta, por sua vez, possui duas camadas sendo a primeira membranosa ('beaded') e reagindo com Melzer adquirindo coloração rosada; a segunda camada da segunda parede do grupo germinativo é hialina adquirindo coloração amarronzada quando em contato com Melzer (Figura 8).

Segundo et al., (1984) essa espécie é muitas vezes confundida com *Acaulospora mellea* mas, se difere da mesma por apresentar coloração mais clara e maior número de camadas nas paredes. Esses autores também afirmaram que a parede estrutural do esporo é composta por três camadas, sendo a primeira evanescente e as demais unitárias, enquanto o componente germinativo era composto por uma unitária e uma membranosa. Porém, MORTON (<http://invam.caf.wvu.edu>) reinterpretou essa característica morfológica dos glomerosporos afirmando que o componente germinativo apresentava duas camadas flexíveis aderentes (unitária segundo SCHENCK et al., 1984) e duas camadas mais internas: a primeira granulosa na superfície ('beaded') e aderida a uma camada interna amorfa (membranosa, em SCHENCK et al., 1984).

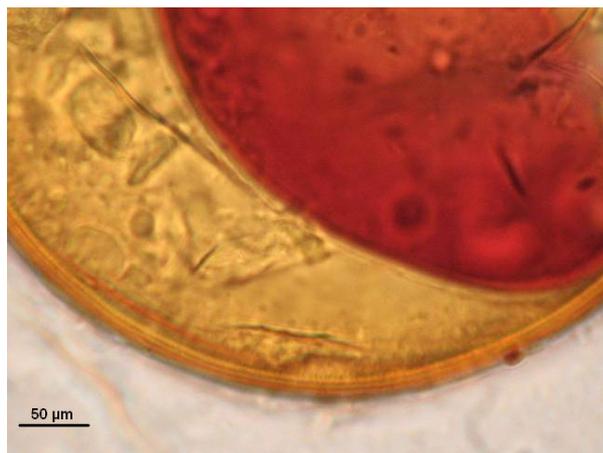


Figura 8 - Glomerosporo de *Acaulospora morrowiae* com reação no Melzer no componente germinativo. Foto: Goto, 2009.

3.3.4 *Acaulospora scrobiculata* Trappe

Os glomerosporos são formados isoladamente no solo. São globosos a ovalados. Possuem coloração hialina quando novos, ficando verde-claro a laranja com a maturidade. A camada externa é ornamentada com depressões. A parede estrutural possui três camadas: (1) hialina e normalmente ausente em glomerosporos maduros; (2) possui depressões ovóides e concâvas, coloração hialina a amarelo esverdeada; (3) aderente mas separável da anterior, flexível e hialina. A parede germinativa possui dois grupos de camadas. O primeiro grupo de camadas possui duas paredes fortemente aderidas, hialinas e sem reação com Melzer. O segundo grupo de paredes também é fortemente aderidos, é do tipo 'beaded' e tem reação com Melzer adquirindo coloração levemente rosa a vermelho amarronzado (Figura 9).

Segundo TRAPPE (1977), a reação ao Melzer no componente germinativo é única para essa espécie dentro do gênero *Acaulospora*. E, essa reação combinada com a ornamentação na camada estrutural podem facilmente levar a distinção da espécie.

GOTO (2009) revisando os caracteres morfológicos dessa espécie verificou uma diferença no número de paredes, observando que o componente estrutural possuía três camadas (uma evanescente e as demais finas e hialinas) e no componente germinativo quatro camadas (duas hialinas e flexíveis, a terceira rugosa ('beaded') e plástica e a quarta hialina e flexível, reagindo com Melzer).

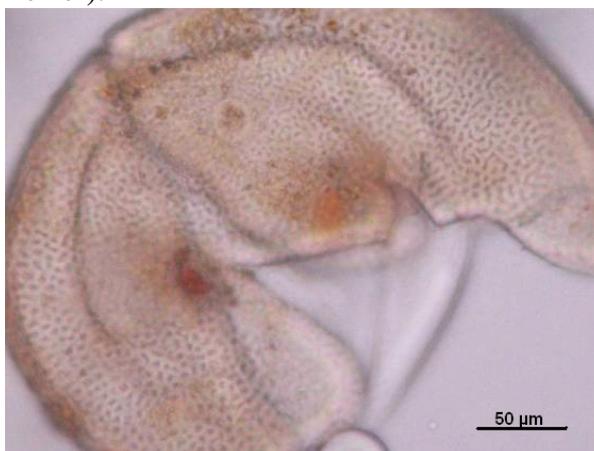


Figura 9 - Ornamentação de *Acaulospora scrobiculata*.Foto: Goto, 2009.

3.3.5 *Glomus manihots* R.H. Howeler, Sieverd. & N.C. Schenck

Glomerosporos com coloração do branco ao amarelo-amarronzado. Forma globosa, subglobosa ou elíptica. Parede estrutural com três camadas. A primeira é mucilaginosa e evanescente, reagindo ao melzer e ficando rósea. A segunda camada é hialina. A terceira camada é laminada (duas lâminas) e conferem coloração ao glomerosporo. A hifa de sustentação é cilíndrica e possui três camadas na parede (Figura 10)

Essa espécie é bastante similar ao *Glomus clarum*, sendo muitas vezes confundida com essa espécie. Contudo, segundo SCHENCK et al. (1984), a parede interna e o componente do esporo são amarelados e a hifa de sustentação é facilmente perdida no solo.



Figura 10 - Glomerosporo de *Glomus manihots*. Fonte: Ignácio, 2011

3.3.6 *Kuklospora colombiana* (Spain & N.C. Schenck) Oehl & Sieverd

Coloração laranja amarronzado, forma globosa a subglobosa. São Desenvolvimento entrofosporóide (no meio da hifa, entre a base do sáculo esporífero e a ponta da hifa; por esse motivo apresentam duas cicatrizes). Possuem dois grupos de parede: estrutural e germinativa.

A parede estrutural é composta por três camadas. A primeira é hialina e tem origem a partir da parede do sáculo esporífero; a segunda é amarelo-amarronzado e a terceira é unitária, provavelmente sem cor (Figura 11).

A parede germinativa é hialina e apresenta duas camadas: a primeira é bastante fina e sempre aderida à segunda, sendo esta última com aspecto granular, caracterizada como camada 'beaded'. Apresenta reação ao Melzer ficando com coloração vermelho-púrpura a vermelho escuro.

O sáculo esporífero possui coloração mais clara que os esporos, sendo perdido com a maturidade dos propágulos. Tem formato subgloboso a oblongo e tem uma parede com uma camada hialina.

GOTO (2009) afirma que o esporo apresenta a parede formada por cinco camadas: a primeira hialina e evanescente; a segunda laminada; a terceira hialina e flexível; a quarta hialina, amorfa e 'beaded' e; a quinta flexível, hialina e com forte reação no Melzer.



Figura 11 - Glomerosporo de *Kuklospora colombiana*. Fonte: Ignácio,2011.

3.3.7 *Glomus proliferum* Dalpé & Declerck

Glomerosporos hialinos, globosos a subglobosos, facilmente quebráveis sob pressão. Possuem uma parede estrutural com 4 camadas. Primeiras e segundas camadas hialina e unitária, respectivamente, fortemente aderidas. Camada 3 laminada e camada 4 membranosa e aderida à anterior (Figura 12).

Hifa de sustentação é cilíndrica, com coloração variando de hialina a amarelo pálido.

Segundo DECLERCK et al. (2000), as características morfológicas da espécie (pequeno tamanho, coloração hialina e as quatro camadas permanentes) são capazes de serem distinguidas facilmente.



Figura 12 - Glomerosporos de *G. proliferum* em PVLG. Foto: Ignácio, 2011.

3.4 – Desenvolvimento *in vitro* de Espécies de FMA

As espécies de fungos micorrízicos que conseguiram se desenvolver em condições *in vitro* com raízes transformadas de manjeriço foram: *Gigaspora margarita*, *Glomus manihots* e *Glomus proliferum*.

Os glomerosporos de *Gigaspora margarita* apresentaram como principal característica a emissão de vários tubos germinativos concentrados na região próxima ao bulbo, na região das papilas (Figura 13).

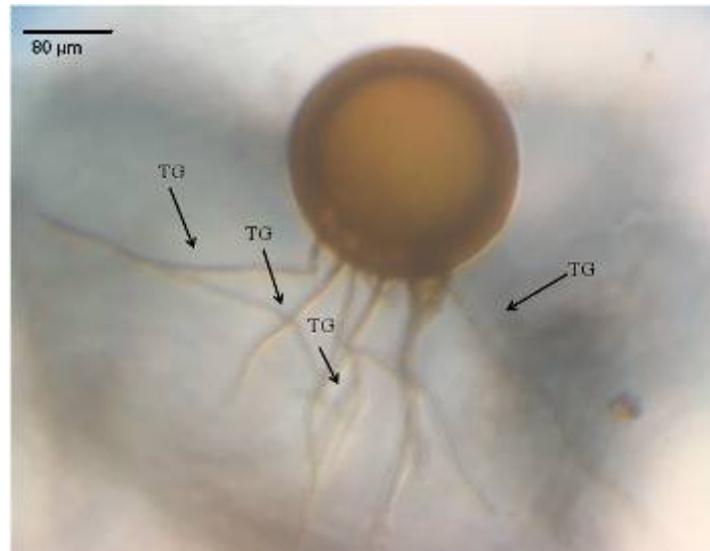


Figura 13 - Tubos germinativos (TG) de *Gigaspora margarita*.

O micélio externo possuía coloração similar a do glomerosporo e padrão de crescimento em espiral, com a presença de algumas células auxiliares (Figura 14). O micélio externo apresentava-se parcialmente septados.

Não foram observados esporulação dessa espécie. GADKAR & ADHOLEYA (2000) trabalhando com essa espécie em raízes de cenoura, verificaram que a esporulação se iniciava após a 10ª semana e sugerem que essa espécie só manifesta essa propriedade (esporulação) um determinado período após o estabelecimento da simbiose.

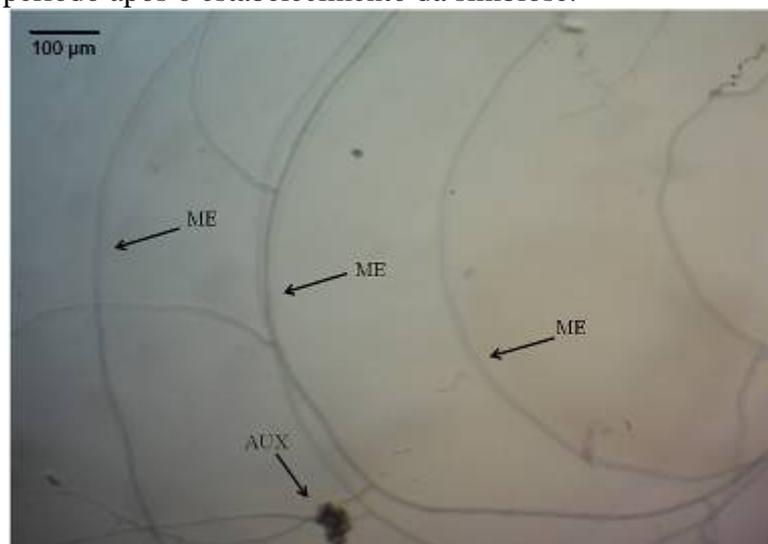


Figura 14 - Micélio externo (ME) de *Gigaspora margarita* e célula auxiliar (AUX).

As células auxiliares foram formadas em poucas ramificações em ambos os lados da hifa. As hifas próximas às células auxiliares apresentavam septos (Figura 15). O formato das células auxiliares variava entre oval a circular. Possuíam coloração amarela-amarronzada e sua superfície apresentava ondulações suaves.

A função biológica das células auxiliares ainda é controversa. Alguns autores relatam que como foram observadas grandes quantidades de lipídeos no interior dessas células, sua função seria armazenamento (JABAJI-HARE, 1988); outros autores relacionam essas células ao processo reprodutivo (PONS & GIANINAZZI-PEARSON, 1985). Para SOUZA & DÉCLERCK (2003) as células auxiliares possuem papel no estoque de carbono que é utilizado como energia para o início da formação de glomerosporos e/ou produção e manutenção do micélio.

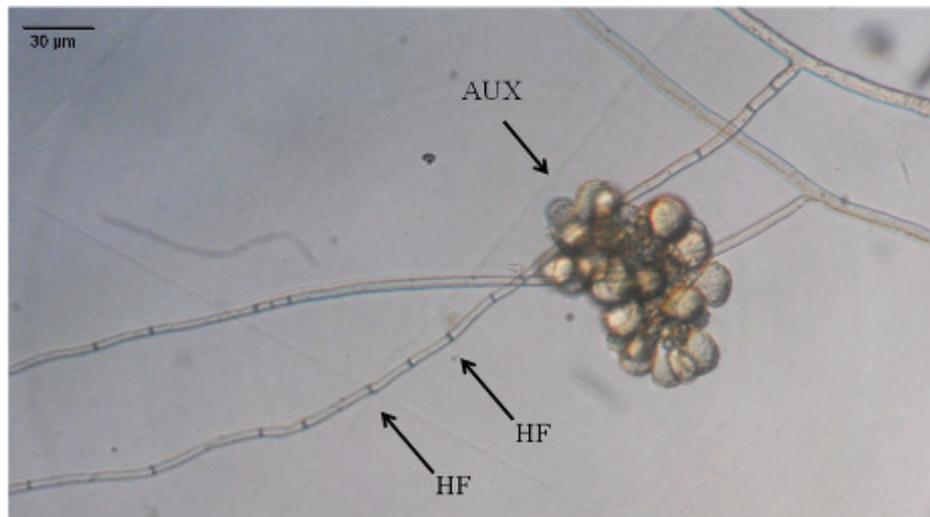


Figura 15 - Célula auxiliar de *Gi margarita* e detalhe dos septos das hifas.

Durante os períodos de avaliação das placas não foram observados glomerosporos jovens. SOUZA & DECLERCK (2003) trabalhando com *Scutellospora reticulata*, verificaram que a formação dos primeiros ‘glomerosporos filhos’ se dava entre 10 a 12 semanas após colonização e que a esporulação maciça se dava entre o 5º e o 8º mês de estabelecimento da cultura. Os mesmo autores sugerem que as espécies que fazem parte das famílias Gigasporaceae, Scutellosporaceae, Dentiscutataceae e Racocetraceae (antigamente inseridas na família Gigasporaceae) apresentam uma longa fase vegetativa antes da esporulação. Essa demora na formação de glomerosporos e investimento no crescimento micelial pode estar relacionado à estratégia de vida dessas espécies, que é do tipo ‘K’ estrategista.

A espécie *Glomus manihots* foi a única que conseguiu completar seu ciclo de vida. O glomerosporo apresentou germinação a partir da hifa de sustentação (Figura 16) e vasto crescimento micelial por todas as direções.

Os novos glomerosporos foram visualizados ainda na fase assimbiótica e, por esse fato, recebem o nome de esporos vegetativos (“spore-like vesicles”) e podem ser considerados glomerosporos na fase inicial de desenvolvimento.

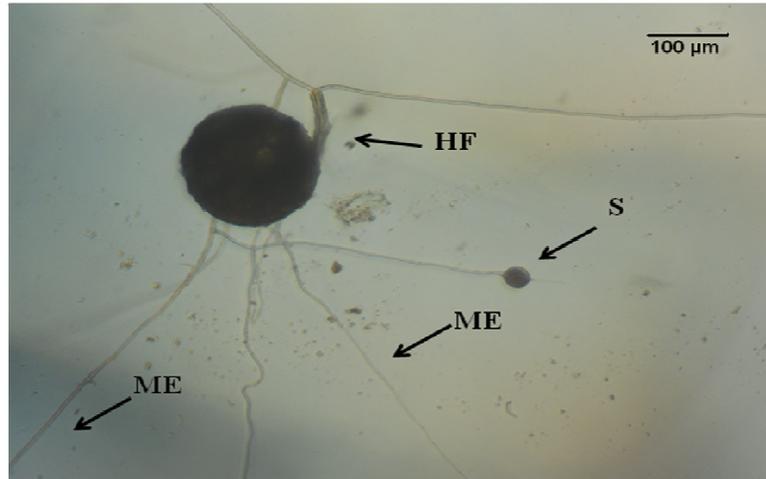


Figura 16 - Desenvolvimento de *Glomus manihots* *in vitro* com crescimento de micélio (ME) e formação de novo glomerosporo (S). (HS = Hifa de sustentação).

Os glomerosporos formaram-se intercaladamente nas hifas esporogênicas (Figura 17) o que difere da forma glomóide de desenvolvimento e assemelha-se à forma descrita por SOUZA & BERBARA (1999).

Conforme sugerido pelos autores para o desenvolvimento do *Glomus clarum*, a Figura 18 ilustra a fase de transição entre o estágio 2 e 3. Esse estágio transitório estaria relacionado ao entumescimento da hifa de sustentação e início da formação de septos na parte apical da hifa (ME). A parede externa do glomerosporo já se encontra formada e as camadas mais internas em processo de formação.

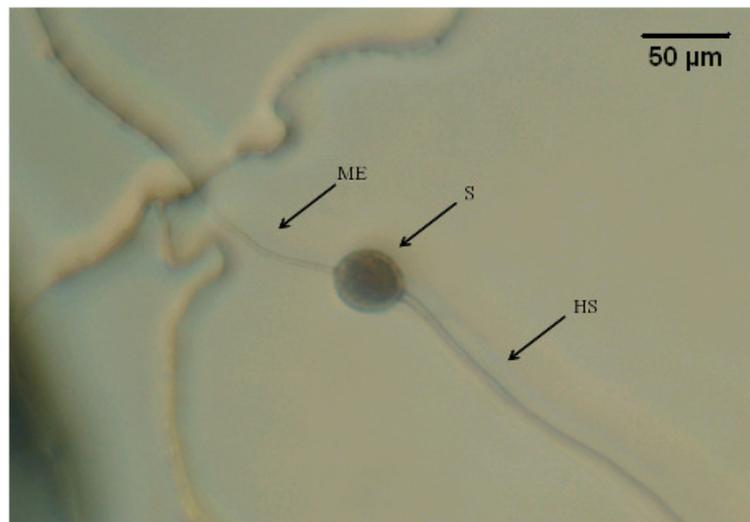


Figura 17 - Detalhe da formação intercalar de novo glomerosporo (S) de *Glomus manihots*. (ME = micélio externo; HS = Hifa de sustentação).

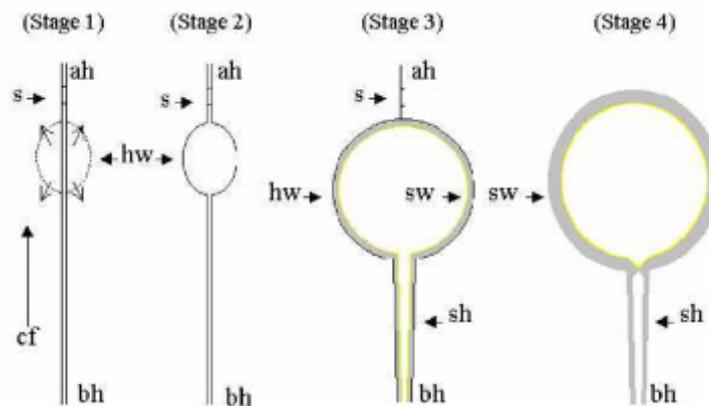


Figura 18 - Representação esquemática da ontogenia de esporos de *Glomus clarum*. Estágio 1. Note a formação de septos (s) na parte apical da hifa (ah) esporogênica. O fluxo citoplasmático (cf) contínuo através da hifa basal (bh) permite que o esporo se desenvolva. A linha pontilhada mostra onde a parede da hifa (hw) irá entumecer. Estágio 2. Observe o entumecimento da hifa esporogênica. Nesta fase somente a parede da hifa está presente. Estágio 3. Nesta fase a parede do esporo (sw) e da hifa de sustentação (sh) são sintetizadas na parte interna a partir da hifa de esporogênica. Estágio 4. Esporo maduro, sem a parede da hifa. (Adaptado de Souza & Berbara, 1998).

A espécie *Glomus proliferum* completou seu ciclo de vida. O micélio externo apresenta crescimento vasto e sempre direcionado à raiz. A formação dos glomerosporos acontece através do entumecimento da ponta da hifa e a espécie é caracterizada por formar esporocarpos a partir de ramificações de uma hifa e não possuem perídeo (Figura 19). Os glomerosporos imaturos apresentam forma de elipse e com o tempo vão atingindo a forma circular. As camadas da parede interna também ficam mais espessas à medida que o esporo atinge a maturidade.

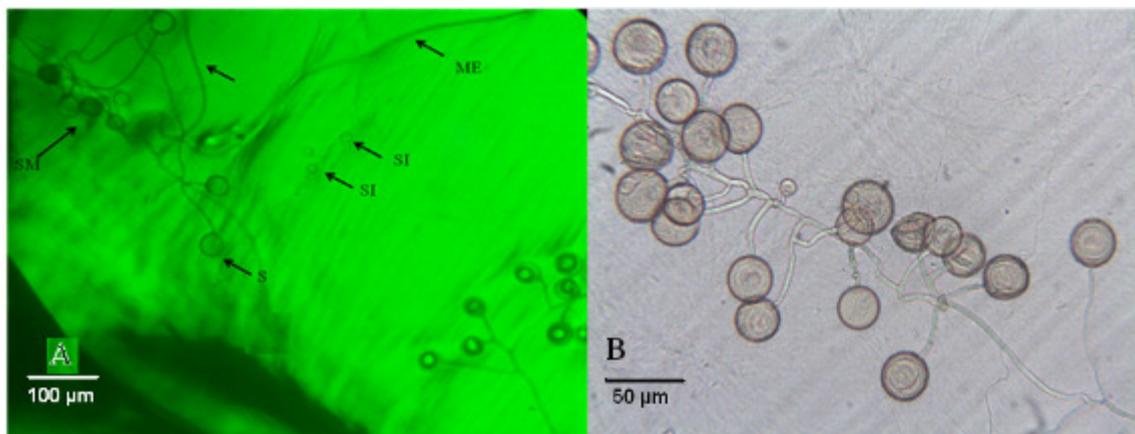


Figura 19 - Glomerosporos de *Glomus proliferum*: A – fotografia em lupa de diferentes estágios de desenvolvimento (SM = glomerosporos maduros; SI = glomerosporos imaturos; ME = micélio externo). B – fotomicrografia de esporocarpo de *Gl. proliferum*.

A capacidade das espécies do gênero *Glomus* formar glomerosporos mais rapidamente que os demais gêneros está relacionado à sua estratégia de vida. Estes diferem das espécies da antiga família *Gigasporaceae* como citado anteriormente (SOUZA & DECLERCK, 2003), sendo ‘r’ estrategistas. Possuem glomerosporos de menor tamanho e complexidade quando comparado aos ‘K’ estrategistas e capacidade de esporulação mais rápida e em maior quantidade.

4. CONCLUSÕES

A quantidade de glomalina produzida pelos diferentes FMAs é distinta, sendo mais eficiente evidenciar essas diferenças na extração da glomalina total.

Há necessidade de mais estudos para caracterizar espécies de FMAs quanto a produção de glomalina, mas há indícios que esta distinção é possível pelo menos até o nível taxonômico de gênero.

Scutellospora heterogama foi a espécie com maiores taxas de germinação de glomerosporos, seguida da *Gigaspora margarita*.

O padrão de desenvolvimento das espécies de FMAs *in vitro* foi semelhante aos estudos anteriores sendo a forma de desenvolvimento do *Glomus manihots* similar à entrofosporóide.

As espécies de *Glomus* possuem ciclo de vida mais curto, com a esporulação ocorrendo logo após a formação da simbiose.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO ROXO (*OCIMUM BASILICUM* L.) ASSOCIADAS A DIFERENTES FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

RESUMO

Raízes modificadas são bastante utilizadas para estudo de metabolismo vegetal e como hospedeiro para o cultivo *in vitro* de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Além de permitir verificar o desenvolvimento dos glomerosporos ainda possibilita o estudo da simbiose. Contudo, pouca atenção é dada aos efeitos provocados pelos fungos nas raízes hospedeiras. Tendo como objetivo verificar o crescimento de raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) inoculadas com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), foram monitorados área e comprimento radicular aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação dos FMAs. Após o processo de desinfestação superficial, glomerosporos foram colocados em placas Petri e, após germinação, foram inoculados em placas com segmentos de raízes de manjeriço roxo. Quatro espécies de FMAs foram utilizadas (*Glomus proliferum*, *Glomus manihots*, *Kuklospora colombiana* e *Gigaspora margarita*), sendo a primeira mantida em cultivo *in vitro* com *Lunularia cruciata* (briófita) e as demais oriundas do banco de germonplasma da Embrapa agrobiologia. Área e comprimento das raízes foram estimadas através de programa de editoração de imagens. Ao fim do experimento foi estimada a porcentagem de colonização micorrízica das raízes e a abundância dos arbúsculos. *Glomus proliferum* foi mais eficiente na colonização das raízes. As diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares não apresentam distinção na eficiência de promover o desenvolvimento das raízes transformadas de *Ocimum basilicum*. *Kuklospora colombiana* foi a espécie mais eficiente na produção de arbúsculos e micélio externo. O crescimento de raízes transformadas de manjeriço em meio SRV é ampliado a partir dos 15 dias após a inoculação de fungos micorrízicos.

Palavras chave: Cultivo Monoxênico. Colonização Micorrízica. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Roots organ cultures (ROC) are used in the studies of plant metabolism and as hosts for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Besides this ROC allow the observation of the development of the glomerospores and also can evaluate development also allows the study of symbiosis. However little is known about the effects caused by fungus on host roots. With the aim of verify the growth of roots transformed purple basil (*Ocimum basilicum* L.) inoculated with different species of mycorrhizal fungi (AMF) were monitored area and root length at 0, 15, 30, 45 and 60 days after inoculation AMF. After the process of surface disinfection, glomerospores were placed in Petri dishes and, after germination were inoculated on plates with segments of the roots of purple basil. Four species of AMF were used: *Glomus proliferum*, *Glomus manihots*, *Kuklospora colombiana* and *Gigaspora margarita*, the first was kept *in vitro* with *Lunularia cruciata* (bryophyte) and the others were provinient from germoplasm bank of Embrapa Agrobiologia. Area and root length were estimated using image editing program. At the end of the experiment was estimated the percentage of mycorrhizal colonization of roots and the abundance of arbuscules. *Glomus proliferum* was more efficient in colonizing the roots. The different species of mycorrhizal fungi have no distinction in the effectiveness of promoting the development of transformed roots of *Ocimum basilicum*. *Kuklospora colombia* was the most efficient in the production of external mycelium and arbuscules. The growth of transformed roots of basil in the SRV medium is extended from 15 days after inoculation with mycorrhizal fungi.

Key words: Monoxenic cultures. Mycorrhizal colonization. *In vitro* cultures

1. INTRODUÇÃO

O cultivo monoxênico de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) envolvendo cultura de raízes foi realizado pela primeira vez por MOSSE (1962) e MOSSE & HEPPEL (1975). Entretanto, estes resultados evidenciaram a necessidade de protocolos mais simples que permitissem a manutenção de coleções de FMAs por longos períodos de tempo (SIQUEIRA, 1989). Culturas monoxênicas com o uso de raízes transformadas (RTs) foram então desenvolvidas no fim da década de 80 (BÉCARD & FORTIN, 1988) com forte uso no Brasil (BERBARA & FONSECA, 1995; BERBARA & FONSECA, 1996, BERBARA et al., 2001). Nestes artigos foi estabelecido sistemas com RTs para sustentar estudos de ontogenia bem como taxonomicos (SOUZA & BERBARA, 1999) e fisiológicos (BERBARA et al., 2006).

Linhas de pesquisa fundamentais no estudo de FMAs no Brasil foram abertas com o uso intensivo de culturas monoxênicas (SOUZA et al., 2008). Pode-se destacar os relacionados à diversidade molecular de FMA e eventos associados à anastomose encontrada em algumas espécies (de LA PROVIDENCIA et al., 2005) bem como efeitos sobre o metabolismo radicular (SOUZA et al., 2002; SOUZA et al., 2006). Estes estudos têm garantido o avanço da pesquisa com estes simbiontes no Brasil e no mundo.

O objetivo desse trabalho foi verificar o crescimento de raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) quando inoculadas com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os inóculos de FMA foram obtidos da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). Três espécies foram selecionadas: *Gigaspora margarita* (A1, CNPAB 001), *Glomus manihots* (A83, CNPAB 041) e *Kuklospora colombiana* (A87, CNPAB 043). Além das espécies da coleção da Embrapa Agrobiologia, uma espécie de FMA já mantida *in vitro* no laboratório de Biologia do solo da UFRRJ, *Glomus proliferum* (MUCL 43204), também foi utilizada. Oriunda do GINCO (Micoteca da Universidade Católica de Louvain, Laboratório de Micologia, Bélgica) é multiplicada e mantida em culturas monoxênicas da briófito *Lunularia cruciata*.

Os glomerosporos foram separados do solo por metodologia de peneiramento úmido (GEDERMANN & NICOLSON, 1963) e centrifugação com sacarose (DANIELS & SKIPPER, 1982). Estes foram separados em placa Petri com auxílio de lupa estereoscópica.

Após a separação dos glomerosporos se procedeu a desinfestação superficial utilizando tween 20, cloramina T e antibióticos conforme metodologia descrita por BÉCARD & PICHÉ (1992), adaptada por LIMA (2008), com as seguintes modificações. Os glomerosporos foram sonicados com 2 gotas de tween 20, depois lavados 2 vezes com cloramina T por 10 minutos e 5 vezes com antibióticos (gentamicina e estreptomicina) por 2 minutos. Foram reservados 16 horas a 4° C em solução de antibióticos. Após esse período, o processo de desinfestação foi repetido a partir da cloramina T. Não houve lavagem dos glomerosporos com água após sua passagem pelos antibióticos.

Os glomerosporos desinfestados foram colocados em placas Petri contendo solução Agar-água (10 g L⁻¹ pH 5,8) acondicionadas em câmaras termostáticas com temperatura controlada a 26 °C e na ausência da luz para aguardar a germinação. O tempo médio de germinação dos glomerosporos foi de dez dias, variando entre as espécies. Somente para o *Glomus proliferum* não se realizou a desinfestação superficial já que esta espécie já cresce em condições axênicas com *Lunularia cruciata*.

As raízes modificadas foram obtidas através da técnica do uso de *Agrobacterium rhizogenes*, um patógeno de sistema radicular, é capaz de transferir parte de seu material genético (T-DNA) para o genoma da planta hospedeira.

Os tecidos vegetais injuriados produzem, principalmente, compostos fenólicos, como a acetoseringona, que são detectados pelo *Agrobacterium*, desencadeando a expressão de uma sequência de genes, agrupados em uma região denominada *vir*, presentes no plasmídeo Ri. Os genes da região *vir* codificam proteínas (endonucleases) que cortam e removem uma das fitas do DNA plasmidial, na região T-DNA (T=transferido), que é flanqueada por sequências de 25 pb (extremidades direita e esquerda). A fita de DNA removida da região T-DNA é transferida para o núcleo da célula vegetal, auxiliada pelas proteínas codificadas pela região *vir*, incluindo uma proteína de direcionamento nuclear, que se liga à extremidade 5' da fita simples a ser transferida e garante seu endereçamento para o núcleo da célula hospedeira. Após a retirada da fita simples a região T-DNA é completada, pelas DNA polimerases da bactéria restabelecendo a dupla hélice do plasmídeo (NICOMEDES JUNIOR, 2003).

Uma vez integrado ao genoma do vegetal hospedeiro o T-DNA é transcrito e produz enzimas responsáveis pela síntese de hormônios e opinas (SAITO et al., 1992). As opinas são aminoácidos modificados utilizados pelo *Agrobacterium* como fonte de energia, enquanto que os hormônios produzidos provocam um desbalanço no metabolismo das células vegetais, que passam agora a se propagar desordenadamente, induzindo a formação de galhas das quais crescem raízes (daí o plasmídeo receber a sigla Ri, indutor de raízes). Essas raízes podem ser cultivadas por longos períodos em meio adequado, sem adição de promotores de crescimento.

As raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) foram multiplicadas em erlenmeyers contendo meio MM líquido por um período de 30 dias antes da montagem do experimento, este procedimento proporcionou a padronização das raízes.

Foram repicados dois segmentos de raiz de manjeriço, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento, em cada placa de Petri contendo meio MSR (BÉCARD & FORTIN, 1988) com pH ajustado para 5,8. Uma semana após a repicagem das raízes foi realizada a inoculação dos FMAs nas placas. Três glomerosporos pré-germinados foram colocados sob cada segmento de raiz para assegurar que os mesmos colonizariam as raízes. As placas foram mantidas em BOD sob temperatura controlada (25° C) e sem luminosidade.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 (espécies de FMA) X 6 (épocas de coleta) e 4 repetições (placa Petri). A parcela experimental foi constituída de uma placa de Petri contendo 2 segmentos de raízes inoculadas com 6 esporos.

As placas foram monitoradas aos 7,15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação dos fungos micorrízicos através de fotos digitais de onde foram estimados o crescimento de raízes (cm), área de raízes (cm²), através do software SIARCS (citação), utilizando a metodologia de LIMA et al. (2006) de prévia editoração de imagens com o software photoshop.

Na última época de avaliação (60 dias após a inoculação) as raízes foram coletadas e a taxa de colonização micorrízica estimada pela metodologia de GIOVANNETTI & MOSSE (1980) e os arbúsculos foram quantificados conforme TROUVELOT (1972).

Os resultados foram submetidos à análise de variância com o software SAEG (citação) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes de manjeriço roxo apresentaram desenvolvimento semelhante a raízes de cenoura e trevo descritos por SOUZA (1998). Verificou-se que o segmento repicado inicia a emissão de raízes secundárias entre 3 e 5 dias após a repicagem. Esse tempo varia de acordo com o estado fisiológico da raiz e quanto mais jovem o segmento transplantado, mais rápida é a brotação. A raiz transplantada inicia um processo de escurecimento, entumescimento de gemas laterais e emissão de raízes novas que possuem coloração esbranquiçada e tendem a ficar amareladas com o passar dos dias. Várias ramificações podem surgir das raízes primárias repicadas assim como das secundárias. Foram observados muitos pêlos absorventes nas raízes.

Os resultados de área ocupada pelas raízes estimada através de análise de imagens são apresentados na Figura 20. Observa-se que durante os primeiros dias pós inoculação (7 e 15 dias) o crescimento das raízes é bastante lento e similar em todas as espécies de fungos micorrízicos. Somente a partir de 30 dias após a inoculação, percebe-se o grande incremento de área radicular e com tendência a ser influenciada pelas espécies de FMAs inoculadas. Entretanto não foram verificadas diferenças estatísticas entre as raízes inoculadas com as diferentes espécies de fungos micorrízicos. Trabalhou-se com poucas repetições de forma que não foram suficientes para superar a variabilidade dos dados e permitir a diferenciação dos FMAs. A tendência dos dados sugere que *Glomus proliferum* poderia ser mais eficiente que *Glomus manihots* em promover aumento da área ocupada pelas raízes de manjeriço.

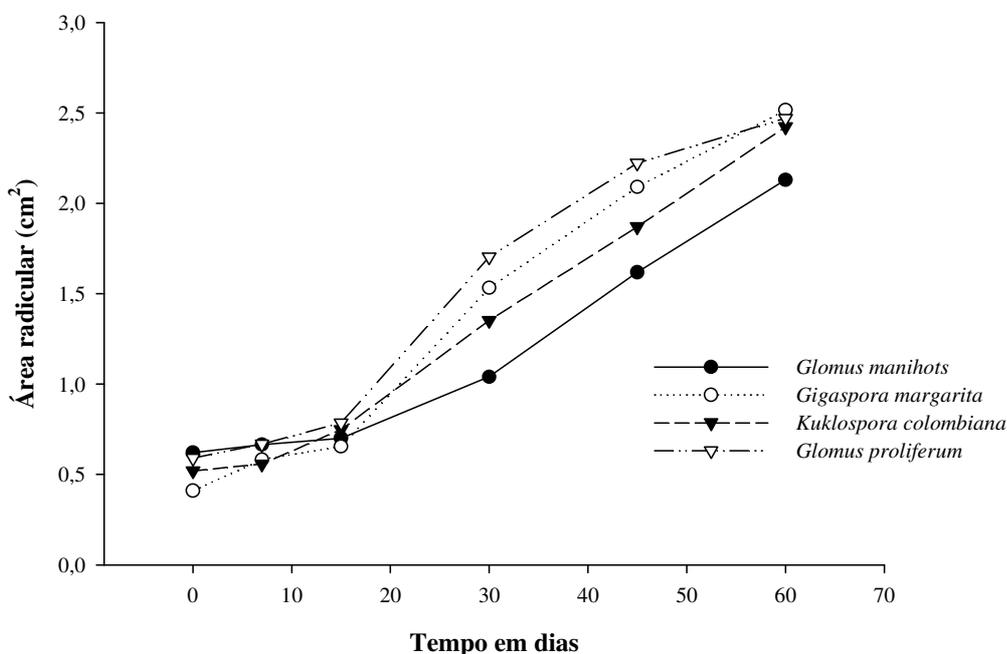


Figura 20 - Área ocupada por raízes de manjeriço roxo em placas Petri inoculadas com quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes épocas após a inoculação.

LIMA (2008), ao estudar o desenvolvimento de raízes de manjeriço quando o meio foi enriquecido por ácidos húmicos observou que o tratamento com 20 mg C L⁻¹ favorece o aumento da área radicular a partir dos 45 dias após a repicagem e sugere que o aumento do período amostral pode conferir diferenças significativas para o incremento de área radicular.

O comprimento das raízes (cm) mostrou resultados similares à área (Figura 21). Os FMAs não apresentaram diferenças estatísticas entre si segundo teste de Tukey à 5% de probabilidade. A partir do 15º dia após a repicagem um aumento acentuado do comprimento das raízes foi observado sendo que *Glomus manihots* esboça menor tendência de estimular o crescimento radicular.

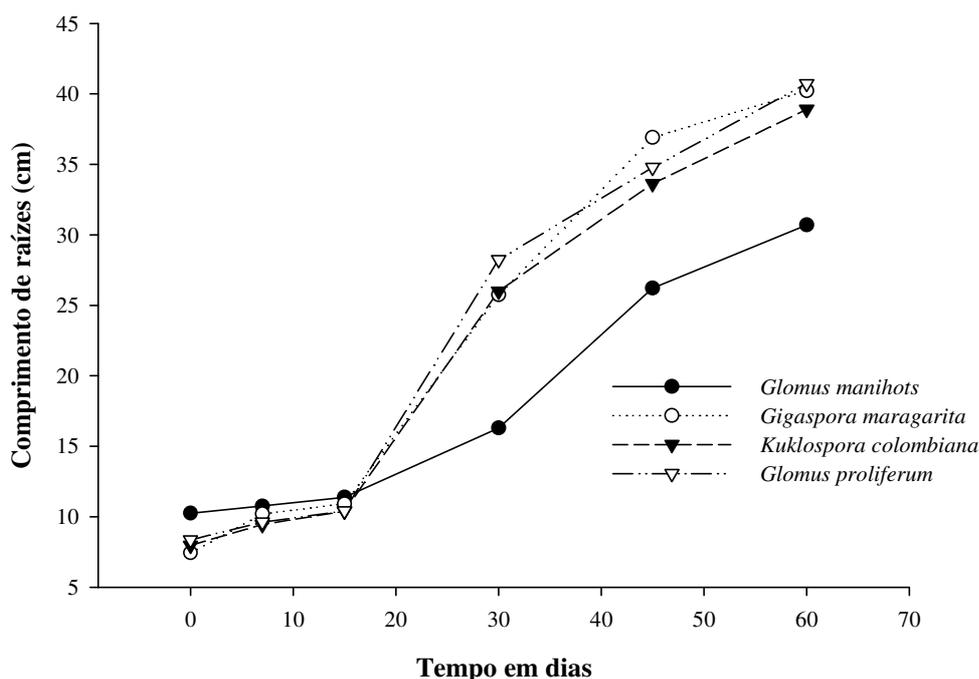


Figura 21 - Comprimento (cm) de raízes transformadas de manjeriço roxo inoculadas com quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes épocas após a inoculação.

Os presentes resultados corroboram com os trabalhos realizados anteriormente utilizando raízes transformadas (RTs) e FMAs onde não se verificaram a influência dos fungos micorrízicos no crescimento radicular, mas sim sob o metabolismo. LIMA (2008) utilizou *Glomus clarum* associado com doses de ácido húmico e doses de nitrato e avaliou a atividade das bombas de prótons e o metabolismo do nitrogênio. SOUZA (1998), também trabalhando com RTs avaliou o metabolismo do nitrogênio em raízes de cenoura e trevo inoculadas com *Glomus clarum*.

Demais trabalhos da literatura apenas utilizam as RTs como hospedeiro para que os FMAs possam completar seu ciclo de vida, pouco importando com os efeitos causados ao hospedeiro.

A taxa de colonização micorrízica das raízes e a abundância de arbúsculos no fragmentos radiculares não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos fúngicos (Tabela 4). A porcentagem de colonização variou entre 29 e 36 %. Não se sabe ao certo como é regulada a intensidade da colonização radicular. Sabe-se que é uma relação complexa entre

hospedeir, fungo e disponibilidade de nutrientes, entre outros fatores (GRYNDLER et al., 2009).

A abundância de arbúsculos variou entre 8% e 17% (Tabela 4). *Kuklospora colombiana* foi a espécie que apresentou maior abundância de arbúsculos nas RTs, seguida do *Gl. proliferum*, *Gi. margarita* e *Gl. manihots*. As células do córtex radicular colonizadas são invadidas por ramificações terminais das hifas internas, os arbúsculos, produzindo a interface por onde ocorrem as trocas da associação mutualística (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Geralmente, a colonização micorrízica é correlacionada positivamente com a abundância dos arbúsculos (RHEINHEIMER & KAMINSKI, 1995). Contudo no presente estudo a abundância de arbúsculos pareceu não estar relacionada com a porcentagem de colonização radicular já que espécies com maiores valores de taxa de colonização apresentaram abundância de arbúsculos intermediárias.

Foram quantificados apenas os arbúsculos por serem chaves para o funcionamento da simbiose micorrízica já que são os principais sítios de troca de metabólitos. Sua formação depende da completa interação genética e funcional entre as combinações fungo-planta (HARRISON, 1999). A formação de arbúsculos dentro das células do hospedeiro está associada a mudanças morfológicas e fisiológicas em ambos os parceiros (PASZKOWSKI, 2006).

Tabela 4 - Colonização micorrízica das raízes, abundância de arbúsculos e comprimento de micélio (cm.cm^{-2}) de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares em raízes transformadas de manjeriço roxo.

	Colonização (%)	Arbúsculos (%)	Comprimento de micélio (cm.cm^{-2})
<i>Glomus manihots</i>	29,5 ^{ns*}	7,80 ^{ns}	44,5 ^{ns}
<i>Gigaspora margarita</i>	33,3	11,4	20
<i>Kuklospora colombiana</i>	31,65	19,18	45
<i>Glomus proliferum</i>	36,16	17,27	28,5

*Teste de Tukey à 5% de probabilidade

Após avaliações das RTs inoculadas com FMAs, verificou-se que o comprimento dos micélios não apresentou diferenças estatísticas entre si. *Kuklospora colombiana* e *Glomus manihots* possuíram maiores comprimentos de micélio. *Gigaspora margarita* foi a espécie com menor dimensão de micélio.

O desenvolvimento micelial de FMAs constitui um fator importante para a determinação da capacidade desses fungos aumentarem seu crescimento vegetativo (MELLONI & CARDOSO, 1999) e na exploração do ambiente em busca de nutrientes para os vegetais. Quanto maior o comprimento do micélio, maior a área de exploração pelos FMAs e maior a capacidade de absorver nutrientes.

4. CONCLUSÕES

Glomus proliferum foi mais eficiente na colonização das raízes.

As diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares não apresentaram distinção na eficiência de promover o desenvolvimento das raízes transformadas de *Ocimum basilicum*.

Kuklospora colombiana foi a espécie mais eficiente na produção de arbúsculos e micélio externo.

O crescimento de raízes transformadas de manjeriço em meio SRV foi ampliado a partir dos 15 dias após a inoculação de fungos micorrízicos.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DA BRIÓFITA *LUNULARIA CRUCIATA* SOB O EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS E ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são capazes de formar associação com uma vasta quantidade de vegetais, dentre eles as briófitas, vegetais sem vasos condutores. Além do hospedeiro, fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes interfere na forma e eficiência da simbiose. Este trabalho teve o objetivo de verificar a influência da adição de ácidos húmicos associados ou não com fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de *Lunularia cruciata in vitro*. Foram conduzidos dois experimentos associando diferentes doses de ácido húmico e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). No primeiro ensaio foram testados três doses de ácidos húmicos (0, 40 e 80 mg C.L⁻¹) e três espécies de FMAs (*Scutellospora heterogama*, *Glomus proliferum* e *Gigaspora margarita*) além de um tratamento sem inoculação de FMA, com quatro repetições cada. No segundo ensaio quatro doses de ácidos húmicos (0, 20, 40 e 80 mg C.L⁻¹) foram acrescidas ao meio para crescimento de *Lunularia cruciata* associadas ou não com *Gl. proliferum* também com quatro repetições. Os glomerosporos foram desinfestados superficialmente, germinados em meio agar-água e colocados em placas Petri com pequenas gemas da briófitas. Foi realizada a análise do crescimento do vegetal (área e comprimento) em oito épocas (0, 7, 14, 21, 28, 43, 52, 60 dias após a inoculação dos FMAs). Além do crescimento da briófitas, para o ensaio dois foram contabilizados o número de glomerosporos produzidos durante quatro avaliações (25, 43, 60 e 70 dias após inoculação). Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey à 5% de probabilidade. O uso de ácidos húmicos no meio de culturas em dose de 20 e 80 mg C.L⁻¹ incrementou o crescimento da briófitas *L. cruciata* e sua associação com fungos micorrízicos arbusculares. A dose de 40 mg C.L⁻¹ favoreceu o crescimento de *L. cruciata* somente quando associada a fungos micorrízicos arbusculares; A dose de 80 mg C.L⁻¹ foi a que proporcionou maior crescimento da briófitas. A associação *L. cruciata* e FMAs foi caracterizada como mutualista já que ambos apresentaram benefícios em crescimento e esporulação. A espécie *Glomus proliferum* apresentou maior esporulação que as demais espécies de FMAs testadas, sendo favorecida pelos ácidos húmicos. As doses de 20 e 80 mg C.L⁻¹ de ácido húmico ao meio SRV promoveram a esporulação de *Gl. proliferum*. *Gigaspora margarita* e *Gl. proliferum* promoveram maior crescimento de *Lunularia cruciata*.

Palavras chave: Esporulação. Crescimento. Micorriza

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi (AMF) are able to form an association with a large quantity of plants, including the bryophytes, plants without vessels. Besides the host, environmental factors such as nutrient availability influence the form and efficiency of the symbiosis. This study aimed to assess the effect of addition of humic acids associated or not with arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Lunularia cruciata* *in vitro*. Two experiments were conducted involving different doses of humic acid and species of mycorrhizal fungi (AMF). In the first trial were tested three doses of humic acid (0, 40 and 80 mg CL⁻¹) and three species of AMF (*Scutellospora heterogama*, *Glomus proliferum* and *Gigaspora margarita*) and a treatment without AMF inoculation with four replications. In the second trial four doses of humic acid (0, 20, 40 and 80 mg CL⁻¹) were added to the medium for growth of the *L. cruciata* or not with *Gl. proliferum* also with four replications. The glomerospores were surface desinfected, germinated in water agar in Petri dishes and placed with the bryophyte small gems. Plant growth (area and length) was analyzed in eight different times (0, 7, 14, 21, 28, 43, 52, 60 days after inoculation with AMF). Besides the growth of bryophyte, in the second assay were counted the density of glomerospores produced during the four evaluations (25, 43, 60 and 70 days after inoculation). The results were submitted to ANOVA and Tukey test at 5% probability. The use of humic acids in the culture medium in a dose of 20 mg and 80 CL⁻¹ enhanced the growth of bryophyte *L. cruciata* and its association with mycorrhizal fungi. The dose of 40 mg C.L⁻¹ favored the growth of *L. cruciata* only when associated with mycorrhizal fungi. The dose of 80 mg C.L⁻¹ was found to be the largest growth in bryophyte. The association *L. cruciata* and AMF was characterized as mutualistic because both had advantages in growth and *Glomus proliferum* sporulation. *Gl. proliferum* showed greater sporulation than the other AMF species tested, being favored by humic acid. The doses of 20 mg and 80 CL⁻¹ of humic acid to the medium promoted the sporulation of SRV *Gl. proliferum*. *Gigaspora margarita* and *Gl. proliferum* increased growth of *L. cruciata*.

Key Words: Sporulation. Growth. Mycorrhiza.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do filo Glomeromycota estabelecem simbiose com vegetais superiores e inferiores das mais diversas famílias e têm sido apontados como organismos chave para a manutenção da diversidade florística e produtividade nos ecossistemas terrestres (SMITH & READ, 1997). Esses fungos são simbiotróficos obrigatórios, necessitando do estabelecimento da simbiose com vegetais compatíveis para que possam completar seu ciclo de vida. Assim, para sua multiplicação *in vitro* é necessário o cultivo conjunto de tecidos vegetais aptos a serem colonizados pelos FMAs e metabolicamente ativos.

Em vegetais avasculares pouco ainda é conhecido sobre sua associação com FMAs. Alguns estudos demonstram a capacidade de briófitas se associarem com fungos (READ et al., 2000). O desenvolvimento de relações micorrízicas arbusculares neste grupo de plantas confirma, conforme discutido por FONSECA et al. (2008), o caráter ancestral desta simbiose. Funcionalmente, entretanto, ainda é motivo de debate a sua condição mutualística, pois apesar de morfologicamente apresentar todas as estruturas presentes em raízes de plantas, a relação mutualística FMA – Briófitas não está determinada.

As briófitas, do tipo hepática, possuem a característica de estabelecer associação com fungos que formam micorrizas. Contudo, levando em consideração que seus rizóides e talos não são raízes, não se pode denominar essa simbiose de micorriza (READ et al., 2000). Entretanto, se considerarmos a definição de micorriza de TRAPPE (1996): “órgãos de dupla absorção formados quando fungos simbióticos colonizam tecidos vegetais sadios da maioria das plantas terrestres”, podemos denominar a associação entre fungos do filo Glomeromycota e hepáticas como micorrízica.

Culturas de briófitas *in vitro* são desenvolvidas com plantas coletadas diretamente do solo com diferentes níveis de esterilização (FONSECA et al., 2006). Alternativamente, pode-se cultivá-las de maneira monoxênica, a partir de germinação de esporos (gametófitos). Trabalhos recentes têm demonstrado que sistema de briófitas e FMAs *in vitro* apresentam resultados de maneira tão prática e eficiente quanto os obtidos com raízes transformadas para a finalidade de produção de inóculos (FONSECA & BERBARA, 2008).

Pouco é conhecido sobre a influência dos ácidos húmicos na produção de FMAs *in vitro* e seus benefícios para culturas de briófitas. Para NARDI et al. (2002), as substâncias húmicas podem afetar as plantas de várias maneiras. Eles possuem uma atividade biológica comparada a hormônios reguladores de crescimento (O'DONNELL, 1973; NARDI et al., 1994) e os efeitos podem depender da ativação por exudação radicular (NARDI et al., 2002). Para FMAs, GRYNDLER et al. (2005) observaram que a adição de ácido húmico estimula a colonização radicular e a produção de micélio extraradicular de *Glomus claroideum*.

O objetivo desse capítulo foi verificar a influência da adição de diferentes concentrações de ácidos húmicos associados ou não com espécies de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de *Lunularia cruciata in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e Purificação dos Ácidos Húmicos

Os ácidos húmicos (AHs) foram obtidos de um vermicomposto de esterco bovino com 70 dias de maturação. O processo de extração seguiu metodologia da sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) (SWIFT,1996) com adaptações (BENITES et al., 2003).

O ácido húmico foi extraído com NaOH 0,1 mol L⁻¹, na razão vermicomposto:extrator de 1:10 (v/v) permanecendo em repouso por 16 horas, sob atmosfera inerte de N₂. A separação do ácido húmico foi feita por precipitação através da diminuição do pH da solução até 1,0 com HCl 6 mol L⁻¹. Novamente, o AH foi solubilizado e precipitado por mais duas vezes, alterando-se o pH e lavando-o com água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 mL de uma solução aquosa diluída contendo HF 0,25 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹ agitando a amostra por 8 horas. Após essa etapa, o ácido húmico foi separado do resíduo por decantação e sifonação, sendo o excesso de íons retirado através de diálise com água deionizada. O extrato contendo o AH alcalino solúvel foi seco por liofilização e realizada sua caracterização química e físico-química.

2.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos

A acidez total foi determinada pela titulação com solução concentrada de Ba(OH)₂ em atmosfera de N₂, seguida de titulação com HCl (0,1 M). Os grupos carboxílicos foram determinados por agitação durante 24 horas com solução de AHs saturada com Ca(CH₃COO)₂. O CH₃COOH liberado foi titulado com NaOH a 0,1 M (SCHNITZER,1965). Os grupos fenólicos foram obtidos por diferença.

A razão E₄/E₆ (índice de humificação) foi determinada pela dissolução de 1 mg de AH em 5mL de NaHCO₃ (0,05 mol.L⁻¹) e ajustada para pH 8,3 com NaOH. A absorbância foi medida em comprimentos de onda de 465 nm e 665 nm (RayLihght espectrofotômetro UV-2100), a relação entre o valor de absorbância correspondente a E₄/E₆. A composição elementar dos AHs (C, H, N, S) foi determinada (LECO CHNS-932 analisador elementar) e oxigênio determinado por diferença. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) dos AHs foram obtidos na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas com 1 mg de AHs em 100 mg de KBr (TAN,1995).

2.3 Extração e Desinfestação Superficial dos Glomerosporos

Os inóculos de FMA foram obtidos da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). Duas espécies foram selecionadas: *Gigaspora margarita* (A1, CNPAB 001) e *Scutellospora heterogama* (A2, CNPAB 002). Além das espécies da coleção da Embrapa Agrobiologia, uma espécie de FMA já estudada no laboratório de Biologia do solo da UFRRJ, *Glomus proliferum* (MUCL 43204), também foi utilizada. Oriunda do GINCO (Micoteca da Universidade Católica de Louvain, Laboratório de Micologia, Bélgica) é multiplicada e mantida em culturas monoxênicas da briófito *Lunularia cruciata*.

Os glomerosporos, com excessão dos de *Glomus proliferum*, foram extraídos segundo a metodologia de peneiramento úmido (GEDERMANN & NICOLSON, 1963) e centrifugação com sacarose (DANIELS & SKIPPER,1982). Estes foram separados em placa Petri com auxilio de lupa estereoscópica.

Após a separação dos glomerosporos se procedeu a sua desinfestação superficial utilizando tween 20, cloramina T e antibióticos (gentamicina e estreptomicina) conforme metodologia descrita por BÉCARD & PICHÉ (1992), adaptada por LIMA (2008), com algumas modificações: Os glomerosporos foram sonicados com 2 gotas de tween 20, depois lavados 2 vezes com cloramina T por 10 minutos e 5 vezes com antibióticos por 2 minutos. Foram reservados 16 horas a 4° C. Após esse período, o processo de desinfestação foi repetido a partir da cloramina T. Não houve lavagem dos glomerosporos com água após sua passagem pelos antibióticos.

Os glomerosporos desinfestados foram colocados em placas Petri contendo solução Agar-água (10 g L⁻¹ pH 5,8) acondicionadas em câmaras termostáticas com temperatura controlada a 26 °C e na ausência da luz para aguardar a germinação

O tempo médio de germinação dos glomerosporos foi de dez dias, variando entre as espécies. Somente para o *Glomus proliferum* não se realizou esse procedimento já que esta espécie cresce em meio monoxênico (inoculada em *Lunularia cruciata*).

2.4 Preparo do Meio de Cultura e Instalação dos Experimentos

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *Lunularia cruciata* é o SRV (FONSECA et al., 2006) com pH ajustado para 5,80. O meio foi acrescido com diferentes concentrações de ácidos húmicos (caracterizado anteriormente). Foram instalados dois experimentos combinando doses de AH, espécies de FMA e épocas de amostragem. As briófitas foram repicadas para os meios de cultura e armazenadas em câmara de crescimento para verificar contaminação. As placas não contaminadas foram inoculadas com fungos micorrízicos ou não e avaliadas periodicamente.

2.4.1 Experimento I - Influência de doses de ácido húmico e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no crescimento *in vitro* de *Lunularia cruciata*

Esse experimento consistiu na modificação do meio de cultura SRV com três diferentes doses de ácido húmico (0, 40 e 80 mg C.L⁻¹), inoculação de três espécies de FMAs (*Glomus proliferum*, *Scutellospora heterogama* e *Gigaspora margarita*) e o controle (sem inoculação de FMA). Para inoculação dos FMAs, glomerosporos de *S. heterogama* (3), *Gi. margarita* (3) e *Gl. proliferum* (15) foram colocados em cada placa o mais próximo possível dos rizóides do vegetal.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (doses de AH) X 4 (3 espécies de FMA e controle sem FMA) com quatro repetições cada.

Efetuarão-se as avaliações aos 0, 7, 14, 21, 28, 43, 52 e 60 dias após a inoculação dos FMAs. Foram tomadas fotos de cada unidade amostral (placa de Petri) para avaliação do crescimento das briófitas. Essa avaliação consistia na determinação da área de cobertura (cm²) e comprimento (cm) da hepática, através de editoração de imagens em Photoshop e tomada das medidas no software SIARCS, conforme proposto por LIMA et al. 2006.

Os valores obtidos foram submetidos a testes de homogeneidade e normalidade e então submetidas a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

2.4.2 Experimento II - Influência de diferentes doses de ácido húmico (AH) e inoculação de *Glomus proliferum* no crescimento *in vitro* de *Lunularia cruciata*

Adicionaram-se quatro diferentes doses de ácido húmico (0, 20, 40 e 80 mg C.L¹) ao meio de cultura SRV para briófitas com e sem inoculação de *Glomus proliferum*. Cerca de 15 glomerosporos de *Gl. proliferum* foram colocados em cada placa Petri (unidade experimental) o mais próximo possível dos rizóides.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (doses de AH) X 2 (inoculação ou não de *Gl. proliferum*) X 8 (épocas amostrais que consistiam em dias após a inoculação dos fungos micorrízicos) com quatro repetições cada.

Efetuarão-se as avaliações aos 0, 7, 14, 21, 28, 43, 52 e 60 dias após a inoculação dos FMAs. Foram tomadas fotos de cada unidade amostral (placa de Petri) para avaliação do crescimento das briófitas. Essa avaliação consistia na determinação da área de cobertura (cm²) e comprimento (cm) da hepática, através de editoração de imagens em Photoshop e tomada das medidas no software SIARCS, conforme proposto por LIMA et al. 2006.

A esporulação dos tratamentos inoculados com *Glomus proliferum* foram acompanhadas aos 25, 43, 60 e 70 dias. Os glomerosporos foram contabilizados através de lupas estereoscópica e microscópio invertido.

Os valores obtidos foram submetidos a testes de homogeneidade e normalidade e então submetidas a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos Ácidos Húmicos

A Tabela 5 mostra a composição elementar dos ácidos húmicos obtidos e algumas de suas propriedades químicas. Os teores dos elementos químicos, assim como o conteúdo de grupos ácidos (carboxílico e fenólico) foram consistentes com os relatados na literatura (RITCHIE et al., 2003). Os baixos valores da relação H/C indicam alto grau de condensação da estrutura aromática presente nos substratos alifáticos. A relação O/C foi ligeiramente mais elevada do que outras já reportadas (CANELLAS & FAÇANHA, 2004). A relação atômica C/N obtida foi de 18,4 o que a caracteriza como sendo de um composto orgânico já estabilizado.

Uma das propriedades mais estáveis dos ácidos húmicos é a sua composição elementar (RICE & MACCARTHY, 1991) pois permite sugerir o grau de evolução desta fração da matéria orgânica. Aceita-se que com o aumento do grau de evolução das substâncias húmicas ocorra aumento no teor de carbono (C) e nitrogênio (N) nestas substâncias (KONONOVA, 1982).

Desta forma, relações atômicas C/N, H/C e O/C são utilizados com frequência para identificar a procedência das substâncias húmicas e acompanhar suas mudanças estruturais nos diferentes ambientes (STEELINK, 1985). De maneira geral, compostos com relação C/N entre 10 e 15 são considerados relativamente estáveis (TAN, 2003; BERNA et al., 1996), o que significa que a decomposição da matéria orgânica está em equilíbrio entre a síntese e a acumulação de novos materiais.

Os valores da relação E_4/E_6 , os quais reafirmam o elevado grau de condensação estrutural indicado pela baixa relação H/C. Isso pode indicar a presença de quinonas ou estruturas similares a quinonas (CALDERÍN et al., 2007)

Tabela 5 - Composição elementar, relação entre elementos, razão E_4/E_6 e acidez por grupos funcionais e total dos AHs.

Teores					Relação			Acidez			Razão
C	H	O	N	S	H/C	O/C	C/N	Carboxílica	Fenólica	Total	E_4/E_6
-----% (m:m)-----								---- mol.kg ⁻¹ (C) ----			
56,7	4,84	34,6	3,07	0,72	0,08	0,61	18,4	9,24	2,03	11,27	4,22

Na Figura 22 é mostrado o espectro de transmitância do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) dos ácidos húmicos que mostra algumas semelhanças com outros espectros de AH extraídos de solo e vermicompostos de outros materiais (AMIR et al., 2010; DROUSSI et al., 2009; CALDERÍN et al., 2007).

No espectro há uma banda de absorção larga e intensa com mínima transmitância em 3399,9 centímetros⁻¹ correspondente ao estiramento dos grupos OH (carboxílicos, fenólicos e alcoólicos) associado a pontes de hidrogênio inter e intramoleculares, contribuindo também para este estiramento o grupo NH das amidas. Os estiramentos em 2921,6 centímetros⁻¹ e 2850,3 centímetros⁻¹ podem estar associados às bandas simétricas e assimétricas do alongamento dos sistemas alifáticos (CH).

A banda com mínima em $1720,2\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=O de aldeídos ou cetonas. Além disso a banda em $1633,4\text{ cm}^{-1}$ pertence ao estiramento C=O, mas de quinonas e amidas. Em $1506,16\text{ cm}^{-1}$ e $1456,02\text{ cm}^{-1}$ são faixas de estacionamento características de estiramentos C=C e C=N de estruturas aromáticas e deformação de amidas e N. Em $1421,3\text{ cm}^{-1}$ é a zona de deformação do CH₂ adjacente à carbonila, deformação e estiramento COOH de fenóis. As bandas de $1220,7\text{ cm}^{-1}$ e $1124,7\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento dos grupos CO e OH, deformação de ácidos carboxílicos e estiramento do CO de fenóis e ésteres e as bandas em $1067,6\text{ cm}^{-1}$ e $1024,0\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento dos grupos dos éster e de restos de polissacarídeos.

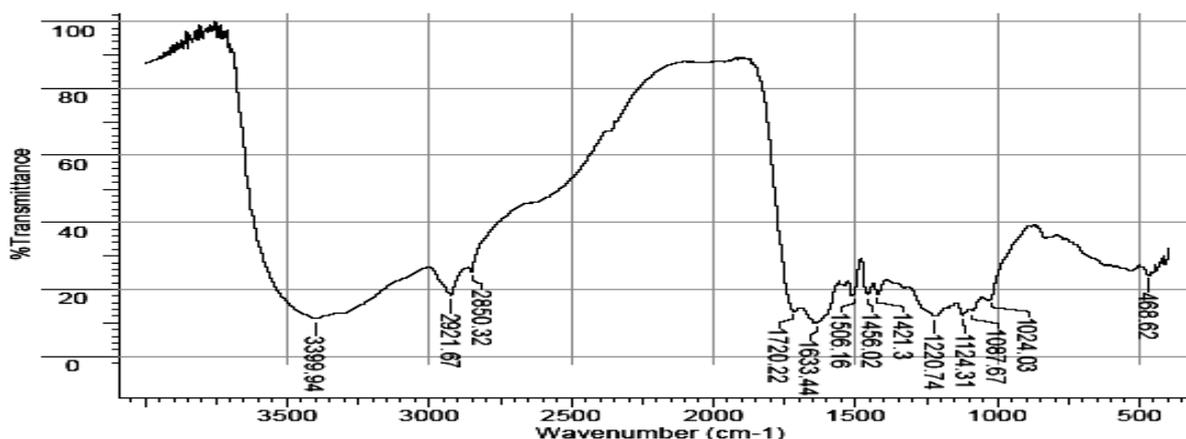


Figura 22 - Espectro de transmitância de Infravermelho com transformada de Fourier do ácido húmico por número de ondas (frequência).

3.2 Influência de Doses de Ácido Húmico e Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) no Crescimento *in vitro* de *Lunularia cruciata*

As substâncias húmicas são capazes de estimular o crescimento vegetal (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a,b; QUAGGIOTTI et al., 2004; LIMA, 2004; NARDI et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; MASCIANDARO et al., 1999), por ser fonte renovável de matéria orgânica, possibilitando as plantas se estabelecerem em ambientes de baixa fertilidade. Contudo, raros são os relatos envolvendo substâncias húmicas e fungos micorrízicos arbusculares.

Avaliando o crescimento da briófitas *L. cruciata* em relação à área de cobertura da placa foram observados efeitos significativos das doses de AH e dos tratamentos de inoculação de FMA. No controle sem inoculação de FMA, verificou-se que a dose AH de 40 mg C.L^{-1} apresentava menor área de cobertura do vegetal e a dose de 80 mg C.L^{-1} proporcionou área de cobertura superior ao controle absoluto (não inoculado e sem ácidos húmicos) (Figura 23).

Nos tratamentos onde se inoculou *Scutellospora heterogama* não foram observados efeitos das doses de AH na área de cobertura das briófitas, apenas uma pequena tendência de que na dose de 80 mg C.L^{-1} a área desses vegetais seja maior. O mesmo comportamento foi observado para os tratamentos inoculados com *Glomus proliferum*. Para o tratamento com inoculação de *Gigaspora* o meio sem AH promoveu menor cobertura que o meio enriquecido com AH.

Observando a influência da inoculação dos FMAs dentro de cada dose de AH, verifica-se que não houveram diferenças significativas na dose de 0 mg C.L^{-1} entre o tratamento sem inoculação de fungos e os com fungos micorrízicos. Entretanto, todos os tratamentos

inoculados apresentaram tendência de magnitude de valores de área de briófitas superiores ao tratamento sem FMA. (Figura 23).

Já na dose de 40 mg C.L⁻¹, o tratamento sem FMAs apresentou menor área de cobertura sendo inferior a das briófitas inoculadas. Quando inoculou-se *Gi margarita* o incremento de área foi superior (3,52 cm²) aos demais (*S. heterogama* e *Gl. proliferum*) que não diferiram estatisticamente entre si.

Já para a dose de 80 mg C.L⁻¹ os tratamentos sem inoculação de FMA e inoculados com *S. heterogama* e *Gl. proliferum* não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Tal como na dose de 40 mg C.L⁻¹ *Gigaspora margarita* foi o fungo que favoreceu o crescimento de área de cobertura das briófitas quando na maior dose de ácido húmico.

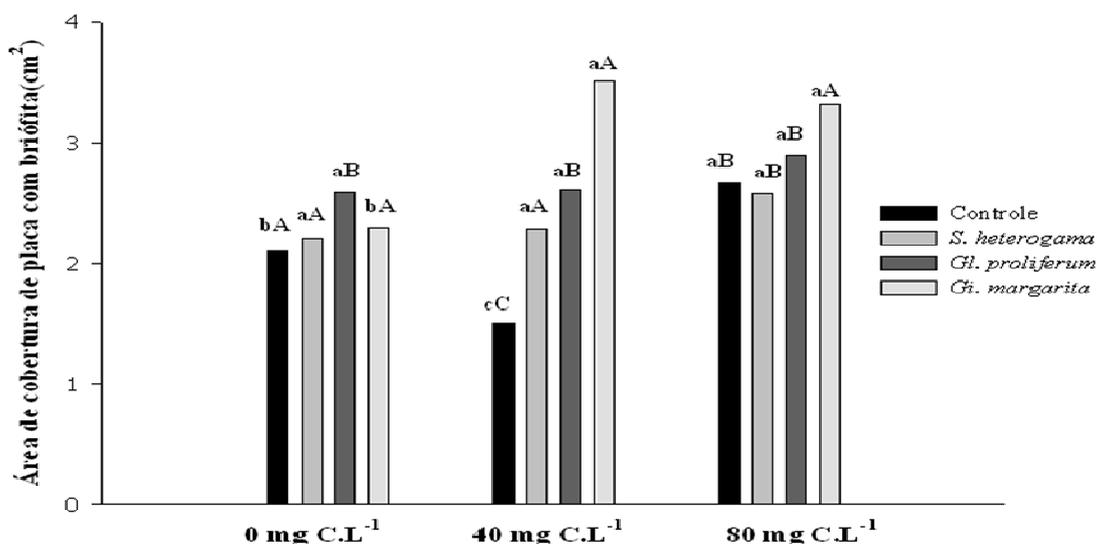


Figura 23 - Área de cobertura da placa com a briófitas *Lunularia cruciata* cultivada *in vitro* em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

*Barras encimadas de letras minúsculas demonstram diferenças significativas entre as doses de ácido húmico para o mesmo tratamento de inoculação de FMA ou controle e barras encimadas de letras maiúsculas diferem entre a mesma dose de AH entre os diferentes tratamentos com FMAs, segundo teste de tukey à 5% de probabilidade.

Para o comprimento das briófitas, observou-se que sem AH no meio (0 mg C.L⁻¹) não houve efeito no tamanho das hepáticas independente de inoculação com FMA (Figura 24).

A dose de 40 mg C.L⁻¹ influenciou de forma negativa o crescimento da hepática no tratamento sem fungo e a dose de 80 mg C.L⁻¹ o favoreceu. Para as briófitas inoculadas com *S. heterogama*, *Gl proliferum* e *Gi margarita* não houve diferença estatística significativa no comprimento em função das doses de AH.

Analisando a inoculação dos FMAs dentro das doses de AH, não foi observada diferença significativa na dose 0 mg C.L⁻¹. Para a dose de 40 mg C.L⁻¹ o tratamento sem inoculação de fungos micorrízicos apresenta os menores tamanhos da hepática, porém não diferindo de *S. heterogama*. *Gi margarita* e *Gl proliferum* promoveram o crescimento das briófitas nessa dose de AH superior ao da testemunha não inoculada (Figura 25).

Entretanto, quando se observa a dose de 80 mg C.L⁻¹ é possível verificar que o tratamento com *Sc heterogama* apresentou menores valores de comprimento de briófitas que as hepáticas inoculadas com *Gi margarita*.

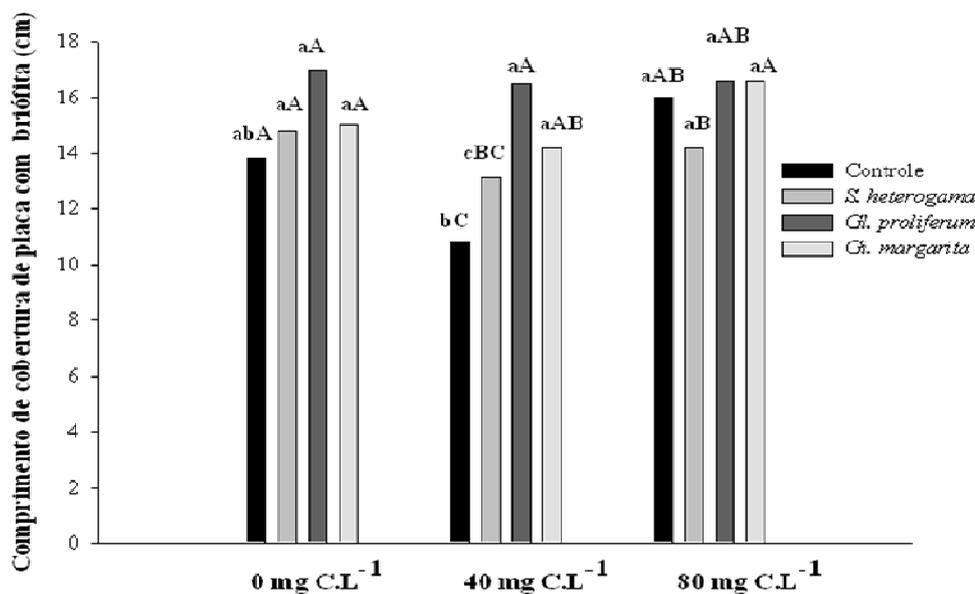


Figura 24 - Comprimento (cm) de cobertura da placa com a briófitas *Lunularia cruciata* cultivada *in vitro* em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

*Barras encimadas de letras minúsculas demonstram diferenças significativas entre as doses de ácido húmico para o mesmo tratamento de inoculação de FMA ou controle e barras encimadas de letras maiúsculas diferem entre a mesma dose de AH entre os diferentes tratamentos com FMAs, segundo teste de tukey à 5% de probabilidade.

Foram encontradas poucas diferenças significativas entre as doses de ácido húmico adicionado ao meio. De modo geral quanto maior a dose de AH, maior a área e comprimento das briófitas. E a dose de 40 mg C.L⁻¹ tende a ser inferior ao do tratamento sem ácido húmico (Tabela 6)

Em relação a inoculação de FMAs, houve efeito positivo no crescimento de briófitas. *Gigaspora margarita* foi a espécie que conferiu maiores vantagens às briófitas em relação ao crescimento, seguida de *Glomus proliferum* e *Scutellospora heterogama*, a qual, estatisticamente, não apresentou diferenças em relação ao tratamento sem inoculação.

Durante a condução do experimento as placas foram observadas em lupa estereoscópica e microscópio invertido para o acompanhamento do crescimento dos fungos e, pode-se afirmar que *S. heterogama* produziu grande quantidade de micélio, que crescia para todas as direções nas placas sem enovelar e algumas células auxiliares. Já a espécie *Gi. margarita* também teve bastante crescimento micelial, células auxiliares com superfície sem projeções, diferenciando-se de *S. heterogama* (Figura 25). Provavelmente ocorreu uma modificação no padrão das células auxiliares de *Gi. margarita* devido ao meio ou ao hospedeiro, já que estas possuem projeções por toda camada externa das células. O mesmo padrão de desenvolvimento das células auxiliares pra *Gi. margarita* foi observado por Souza & Berbara (1998).

Além disso, ao 70 dias após a inoculação percebeu-se o início de esporulação para de *Gi margarita*, com algumas estruturas similares a esporos (Figura 26). *Glomus proliferum* teve esporulação observada a partir dos 25 dias após a inoculação e até os 70 dias ainda haviam glomerosporos sendo produzidos (dados apresentados no próximo item). O crescimento micelial também ocorreu de forma intensa e distribuído por toda a placa.

Tabela 6 - Efeito das diferentes doses de ácidos húmicos (0,0; 40,0 e 80,0 mg C.L⁻¹) e das espécies de FMAs no crescimento de *Lunularia cruciata* (área e comprimento).

Doses de AH (mg C.L ⁻¹)	Área (cm ²)	Comprimento (cm)
0	2,30 b	15,16 ab
40	2,48 b	14,57 b
80	2,86 a	16,14 a
Espécie de FMA		
Controle (sem FMA)	2,09 c	13,47 b
<i>Sc heterogama</i>	2,36 bc	14,07 b
<i>Glomus proliferum</i>	2,70 ab	16,74 a
<i>Gigaspora margarita</i>	3,04 a	16,88 a

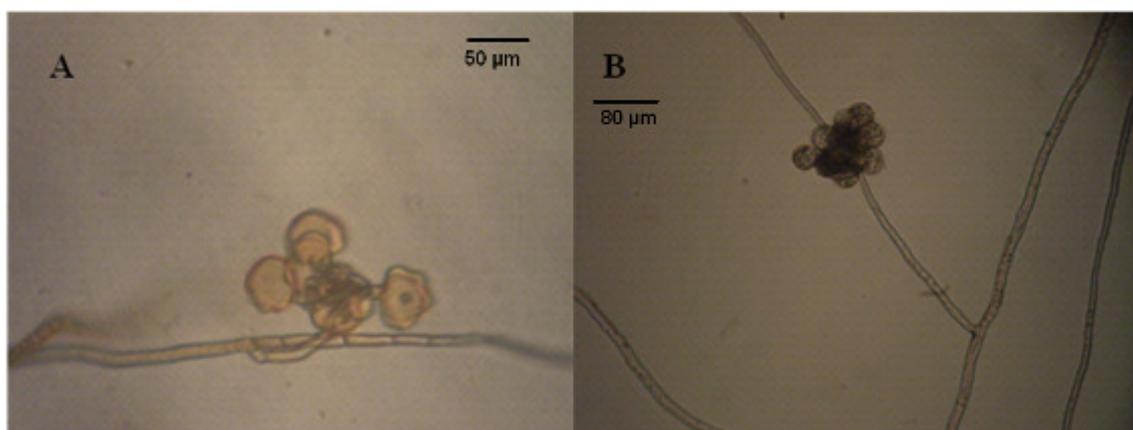


Figura 25 - Células auxiliares de *Scutellospora heterogama* (A) e *Gigaspora margarita* (B).

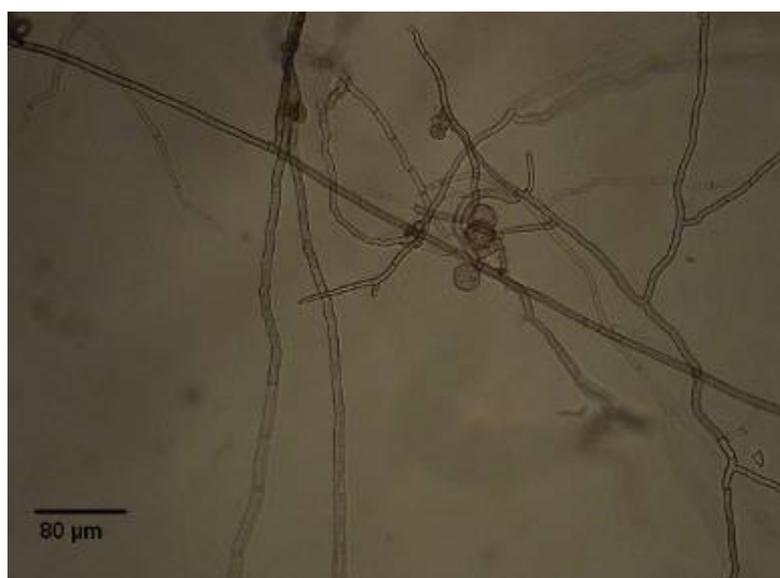


Figura 26 - Micélio externo de *Gigaspora margarita* e células suspensorias.

3.3 Influência de Diferentes Doses de Ácido Húmico (AH) e Inoculação de *Glomus proliferum* no Crescimento *in vitro* de *Lunularia cruciata*.

Analisando o crescimento das briófitas em meio com e sem *Gl. proliferum*, verificaram-se diferenças estatísticas entre estes tratamentos de inoculação (Tabela 7). Tanto a área de cobertura quanto o comprimento dos vegetais foram superiores quando havia associação com o fungo micorrízico. Esses resultados demonstram que a associação micorrízica para a *L. cruciata* tem caráter simbiótico e não parasítico/oportunístico como proposto anteriormente por FONSECA & BERBARA (2008).

Tabela 7 - Crescimento de *Lunularia cruciata* (área de cobertura e comprimento) inoculada ou não com *Glomus proliferum*.

	Área (cm ²)	Comprimento (cm)
Controle	2,05 b	16,38 b
<i>Glomus proliferum</i>	2,64 a	26,38 a

Estudos anteriores de FONSECA & BERBARA (2008) e FONSECA et al. (2009) comprovaram que existe estabelecimento de associação micorrízica entre *Lunularia cruciata* e *Glomus proliferum* e observaram a morfologia da simbiose (tipo *paris*) e a esporulação da espécie de FMA. Contudo, nenhum estudo ainda foi realizado verificando a influência de ácidos húmicos no crescimento das briófitas e na simbiose micorrízica.

Analisando a influência das doses de AH no crescimento das briófitas para a área, apenas foram observados diferenças significativas aos 52 e 60 dias. A dose de 80 mg C.L⁻¹ possibilitou às hepáticas maiores valores de área, seguidas pelo tratamento controle e pela dose de 20 mg C.L⁻¹. O tratamento com dose de 40 mg C.L⁻¹ conferiu vegetais com menores áreas (Figura 27).

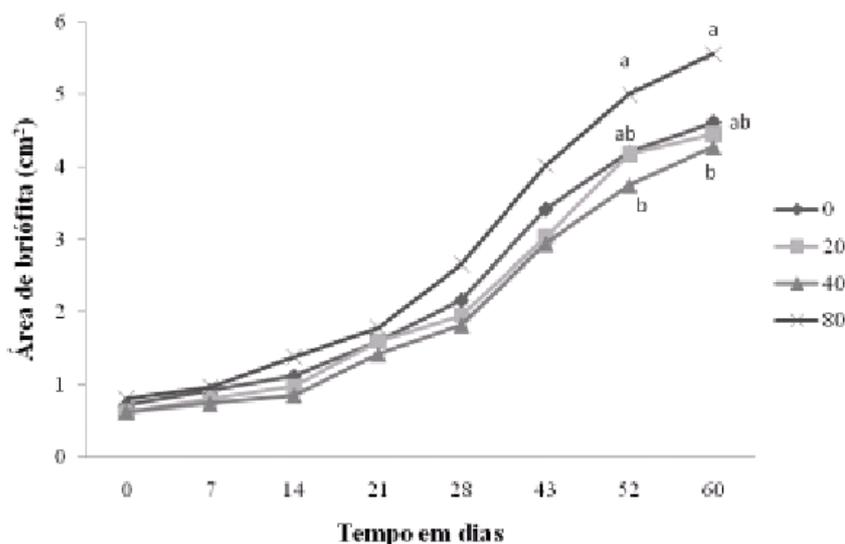


Figura 27 - Área de cobertura da placa com a briófitas *Lunularia cruciata* cultivada *in vitro* em meio contendo doses de ácidos húmicos e inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares aos 0, 7, 14, 21, 28, 43, 52 e 60 dias após a repicagem.

*Letras diferentes demonstram diferença estatística entre as diferentes doses na mesma época de avaliação, segundo o teste de Tukey à 5% de probabilidade.

O incremento de área de briófitas proporcionado pela maior dose de ácido húmico provavelmente está relacionado à maior disponibilidade de C no meio de cultura o qual é convertido em massa vegetal. Já o desfavorecimento no crescimento das briófitas na dose de 40 mg C.L⁻¹ pode estar relacionado com a acidificação do pH na área de influência dos rizóides e influências na absorção dos nutrientes.

LIMA (2008), ao trabalhar com raízes de trevo e manjeriço modificadas e doses de AH, observou que doses de 20 e 160 mg C L⁻¹ favoreceram o crescimento das raízes e doses de 40 e 80 mg C L⁻¹ levaram a um redução do tamanho das mesmas. Através do monitoramento do pH rizosférico, o autor verificou uma alcalinização da rizosfera e associou esse fato a uma resposta adaptativa das raízes ao meio de cultivo com alta concentração de ácido húmico e que esta alcalinização do pH na rizosfera provocou redução na absorção de íons da solução acarretando em menor desenvolvimento radicular.

Além do crescimento da briófito foi avaliado a esporulação de *Glomus proliferum*. Foi verificado que as doses de ácido húmico influenciaram na esporulação da espécie estudada, sendo a dose de 80 mg C.L⁻¹ a que proporcionou maiores quantidades de glomerosporos(Figura 28). Na dose 20 mg C.L⁻¹ o número de propágulos foi superior aos da dose 40 mg C.L⁻¹ e o tratamento controle.

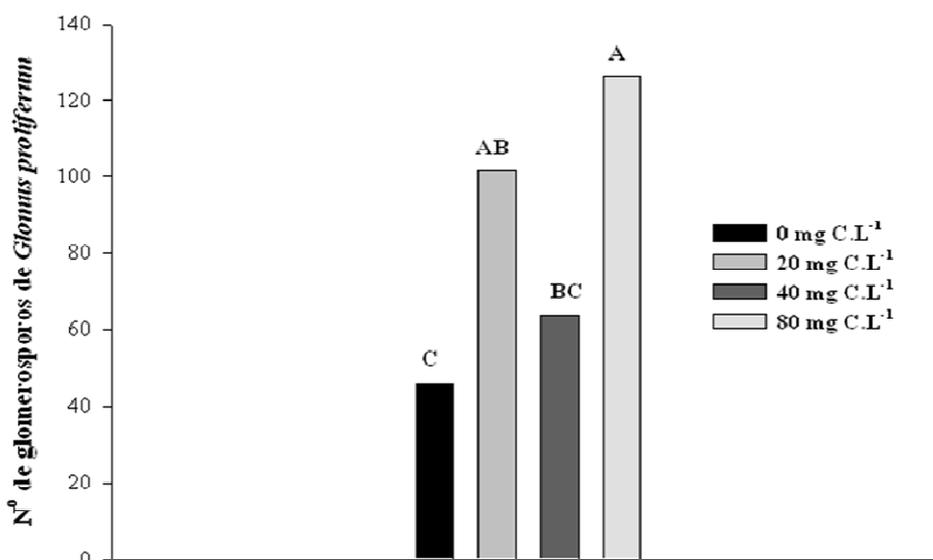


Figura 28 - Número de glomerosporos de *Glomus proliferum* produzidos *in vitro* em cultura de *L. cruciata* em meio com diferentes de ácido húmico.

Analisando o efeito das doses nas épocas amostrais, pode-se observar que apenas aos 70 dias as doses começaram a influenciar a produção de glomerosporos, sendo a dose 80 de mg C.L⁻¹ a que possibilita maior esporulação. Nesta época as doses 20 e 40 mg C.L⁻¹ ainda não apresentam diferenças estatísticas para a produção de glomerosporos (Tabela 8).

Durante as épocas de avaliação, verifica-se que a quantidade de glomerosporos foi crescente mesmo que as análises estatísticas não tenham indicado efeito significativo.

O desenvolvimento dos glomerosporos apresentou diferença, principalmente entre as doses de 20 e 80 mg C.L⁻¹. Na dose de 20 mg C.L⁻¹ o crescimento micelial ocorreu em todas as direções e os glomerosporos mais dispersos. Quando em placas com meio enriquecido com 80 mg C.L⁻¹, os glomerosporos se desenvolveram nas placas com agrupados. Características similares foram observadas por DECLERCK et al. (2001) quando descreveram a espécie e observaram a forma da esporulação e o crescimento do micélio. A maior diferença observada

foi a produção dos glomerosporos, os quais para trabalhos anteriores superaram 1000 propágulos (DECLERCK et al., 2001; FONSECA et al., 2009).

Tabela 8 - Esporulação de *Glomus proliferum* em meio com diferentes doses de ácidos húmicos (0, 20, 40 e 80 mg C.L⁻¹)

Doses AH (mg C.L ⁻¹)	Tempo (dias)			
	25	43	60	70
0	14,75 aA	42 aA	57,75 aA	69,75bA
20	38,25 aB	59,25 aAB	121,50 aAB	189 abA
40	38 aA	47,25 aA	60,75 aA	108,75 abA
80	66,25aB	97,75 aAB	142,75 aAB	199,25 aA

*Letras minúsculas diferentes demonstram diferenças significativas entre as diferentes doses durante o mesmo dia de avaliação e letras maiúsculas segundo demonstram diferenças entre a mesma dose nos diferentes dias de avaliação segundo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

O uso de ácidos húmicos no meio de culturas em dose de 20 e 80 mg C.L⁻¹ incrementou o crescimento da briófito *Lunularia cruciata* e sua associação com fungos micorrízicos arbusculares.

A dose de 40 mg C.L⁻¹ favoreceu o crescimento de *Lunularia cruciata* somente quando associada a fungos micorrízicos arbusculares;

A dose de 80 mg C.L⁻¹ foi a que proporcionou maior crescimento da briófito.

A associação *Lunularia cruciata* e FMAs foi caracterizada como mutualista já que ambos apresentaram benefícios em crescimento e esporulação.

A espécie *Glomus proliferum* apresentou maior esporulação que as demais espécies de FMAs testadas, sendo favorecida pelos ácidos húmicos.

As doses de 20 e 80 mg C.L⁻¹ de ácido húmico ao meio SRV promoveram a esporulação de *Gl. proliferum*.

Gigaspora margarita e *Glomus proliferum* promoveram maior crescimento de *Lunularia cruciata*.

CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização de fungos micorrízicos arbusculares utilizando os teores de glomalina pode ser uma importante ferramenta na identificação de espécies. Contudo, se faz necessário aumentar os estudos em relação à caracterização dessa proteína já que apenas os teores da mesma no solo não são capaz de fazê-lo.

O crescimento de raízes modificadas de manjeriçãõ roxo e da briófita *Lunularia cruciata* são afetados pela inoculação dos FMAs assim como pelas espécies escolhidas.

Lunularia cruciata associada com ácido húmico na dose de 80 mg C.L⁻¹ foi a que teve maior resposta de crescimento. O mesmo aconteceu quando associadas com *Gigaspora margarita* e *Glomus proliferum*.

A associação de fungos micorrízicos arbusculares e briófita apresentou caráter mutualista e não parasítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIR, S.; JOURAIPHY, A.; MEDDICH, A.; GHAROUS, M.; WINTERTON, P.; HAFIDI, M., Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials*, v.177: 524–529. 2010.
- AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J. M. Saprotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). *Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, p. 391-407. 1991.
- BÉCARD, G. & FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, Oxford, v. 108, p. 211-218, 1988.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J. & VARMA, A.K (eds). *Methods in microbiology: Techniques for study of mycorrhiza*. Vol. 24. Londres- UK: Academic Press. P 89-108. 1989.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. *Methods in Microbiology*, London, v. 24, p. 89-108. 1992.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol*, v. 55:2320–2325. 1988.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.*, v. 112:77–83. 1989.
- BÉCARD, G., PICHÉ, Y., FORTIN, A.J. Some aspects on the biotrophy of VAM fungi. *Agric Ecosyst Environ.*, 29:29–33. 1989.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D. D.; PFEFFER, P. E. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 58, n. 3, p. 821-825, 1992.
- BECKER, W.N. & HALL, I.R. *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon*, 4: 155-160. 1976.
- BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. Comunicado Técnico 16, EMBRAPA Solos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 7pp. 2003.
- BERBARA, R. L. L. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. Tese, University of Dundee. 215 pp. 1995.
- BERBARA, R. L. L., DE SOUZA, F. A., FONSECA, H. M. A. C. & SOUZA, S. R. Transgenic root systems in arbuscular mycorrhizal fungi studies. *Agronomia*, v. 35, 58-65, 2001.
- BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras, p. 39-65, 1996.

- BERBARA, R. L. L.; MORRIS, B. M.; FONSECA, H. M. A. C.; REID, M.; GOW, N. A. R.; DAFT, M. J.. Electrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. *New Phytologist*, Oxford, v. 129, p. 433-438. 1995
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. v. VIII, p. 53-88. In: FERNANDES, M S. (ed) *Nutrição Mineral de Plantas*. SBCS. 1 ed. Viçosa, 432p. 2006.
- BETHENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R.G. *Mycorrhizal in sustainable agriculture*. American Societ of Agronomy, Madison - USA, 1992.
- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., eds. *VA Mycorrhizal*. Boca Raton, CRC Press, p.5-33. 1984.
- CALDERÍN, A.G.; GURIDI, I.F.; GARCÍA, N.E. Material de origen natural que retiene cationes de metales pesados, *Rev. Iberoam. Polim.*, v. 8:204-213. 2007.
- CANELLAS, L. P.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; BRAZ-FILHO, R. Aumento da resolução de espectros de RMN ^{13}C com uso de $\text{KCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, p. 131-132, 2001.
- CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Chemical nature of soil humified fractions and their activity, *Pesq. Agropec. Bras. Brasília*, v. 39: 233-240.2004.
- CANTO-CANCHÉ, B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Chemical from roots, hairy roots, and their application. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.464: 235-275. 1999.
- CARLETON, T.J. & READ, D.J. Ectomycorrhizas and nutrient transfer in conifer-feather moss ecosystems. *Can. J. Bot.* 69: 778-785. 1991.
- CHABOT,S.; BÉCARD, G. & PICHÉ,Y. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia*, v. 84: 315-321. 1992.
- CRANDALL-STOTLER, B. Musci, hepatics and anthocerotes – an essay on analogues. In *New Manual of Bryology*, vol. 2, ed. R.M. Schuster,. Nichinan:Hattori Botanical Laboratory. pp. 1093–129, 1984.
- CRANDALL-STOTLER, B.; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: GOFFINET, B & SHAW, A.J. (Ed) *Bryophyte Biologt.* 2.ed. Cambridge. 565 p. 2008.
- CROMACK, K. & CALDWELL, B.A. The role of fungi in litter decomposition and nutrient cycling. In: CARROLL, G.C. & WICKLOW, D.T., Editors, 1992. *The Fungal Community — its Organization and Role in the Ecosystem*, Marcel Dekker, New York, pp. 653–668. 1992.
- DALPÉ, Y. & DECLERCK, S. Development of *Acaulospora rehmi* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia* 94:850–855. 2002.
- DANIELS, B.A SKIPPER, H.D. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: SCHENK, N.C. (Ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul: The American Phytopathological Society, p.29-35, 1982.
- DE LA PROVIDENCIA, I.E., DE SOUZA, F.A., FERNÁNDEZ, F., DELMAS, N.S., DECLERCK, S. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* 165: 261–271. 2005.
- DECLERCK, S.; SÉGUIN, S.; DALPÉ, Y. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germplasm collections. In: FORTIN, J.; DECLERCK, S.; STRULLU, D. G. (Eds.) *In Vitro Culture of Mycorrhizas*, p. 17-30. 2006.

- DECLERCK,S.; CRANENBROCK, S.; DALPÉ,Y.; SÉGUIN,S.; GRANDMOUGIN-FERJANI,A.; FONTAINE, J. & SANCHOLLE,M. *Glomus proliferum* sp nov.: a description based in morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* 92: 1178-1187. 2000.
- DECLERCK,S; SÉGUIN,S. & DALPÉ,Y. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germoplasm collections. In: DECLERCK,S.; STRULLU, D.-G. & FORTIN, J.A.(eds). *In Vitro Culture of Mycorrhizas. Soil Biology*, vol.04. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005.
- DIOP,T.A.; BÉCARD,G. & PICHÉ, Y. Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrots, *Symbiosis* 12: 249-259. 1992.
- DODD, J.C., BODDINGTON C.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALEZ-CHAVEZ, C. & MANSUR, I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form function and detection. *SSSAJ: Volume 71: Número 4* p. 1265. 2000
- DRIVER, J.D.; HOLBEN, W.E & RILLIG.M.C. . Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, v. 37:101–106. 2005.
- DUPRÉ DE BOULOIS H, VOETS L, DELVAUX B, JAKOBSEN I, DECLERCK S. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environ Microbiol*, v. 8:1926–1934. 2006.
- ELIAS,K. & SAFIR,G. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Appl. Envirom Microbiol.*, v. 53: 1928-1933. 1987.
- FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRISPEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 37, p. 1301-1310, 2002.
- FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The introduction and expression of transgenes in plants. *Sci. Hort.*, v. 55, p. 5-36, 1993.
- FLORES, H. E. Plant roots as chemical factories. *Chem. Ind.*, v. 10: 374-377, 1992.
- FLORES, H. E. & CURTIS, W. R. Approaches to understanding and manipulating the byosynthetic potential of plant roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, v. 665, p. 188-209, 1992.
- FLORES, H. & FILNER P. Metabolic relationships of putriscine GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. In: NEUMANN, K.; BARZ, W.; REINHARD, E. (Eds.). *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Berlin: Springer-Verlag. p. 174-185, 1985.
- FONSECA H.M.A.C, BERBARA R.L.L & PEREIRA M.L. *Lunularia cruciata* a potential *in vitro* host for *Glomus proliferum* and *G. intraradices*. *Mycorrhiza*, v. 16: 503-8. 2006.
- FONSECA, H. M. A. C. Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plants with associated nitrogen fixing bacteria. Tese Ph.D, University of Dundee, 1994, 187 pp.
- FONSECA, H.M.A.C & BERBARA, R.L.L. Does *Lunularia cruciata* form symbiotic relationships with either *Glomus proliferum* or *G. intraradices*? *Mycological Research*, v. 112: 1063-1068. 2008
- FONSECA,H.M.A.C.; FERREIRA,J.I.L; BERBARA, R.L.L. & ZATORRE,N.P. Dominance of paris-type morphology on mycothallus of *Lunularia cruciata* colonized by *Glomus proliferum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40:96-101. 2009.

- FORTIN, J.A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST. ARNAUD, M.; COUGHLAN, A.P. & PICHE, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot.*, v. 80:1–20. 2002
- GADKAR, V. & ADHOLEYA, A. Intraradical sporulation of AM *Gigaspora margarita* in long-term axenic cultivation in Ri T-DNA carrot root. *Mycol. Res.*, v. 104 (6): 716-721. 2000.
- GEMMA, J. & KOSKE, R. Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculums potential of a dune soil. *Mycologia*, v. 80: 211-216. 1988.
- GERDEMANN, J. W. & TRAPPE, J. M. The Endogonaceae of the Pacific Northwest. *Micologie Memoir*, v. 5: 1 – 76. 1974.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, Inglaterra*, v.46, p.234-244, 1963.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques of measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, v. 84, p. 484-500, 1980.
- GOFFINET, B & SHAW, A.J. (Ed) *Bryophyte Biologt.* 2.ed. Cambridge. 2008.
- GOTO, B.T. & MAIA, L. C. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. *Mycotaxon*, v. 96, 129-132. 2006.
- GOTO, B.T. *Taxonomia de Glomeromycota: revisão morfológica, chaves dicotômicas e descrição de novos táxons.* Tese de Doutorado – UFPE. 2009. 357 p.
- GRYNDLER, M.; HRŠELOVÁ, H.; SUDOVÁ, R.; GRYNDLEROVÁ, H.; ŘEZÁČOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG23 is stimulated by humic substances. *Mycorrhiza*, v. 15:483–488. 2005.
- GRYNDLER, M.; HRŠELOVÁ, H.; CAJTHAML, T.; HAVRÁNKOV, M.; REZÁČOVÁ, V.; GRYNDLEROVÁ, H. & LARSEN, J. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza*, v. 19: 255-266. 2009.
- GUILLOIN, S.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J.; PATI, P. K.; RIDEAU, M.; GANTET, P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 341-346. 2006.
- GUMINSKI, S. Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Science, Washington*, v. 9, p. 1250-1255, 1968.
- HEINRICH, J.; HENTSCHEL, J.; WILSON, R.; FELDBERG, K. & SCHNEIDER, H. Evolution of leafy liverworts (Jungermanniidae, Marchantiophyta): estimating divergence times from chloroplast DNA sequences using penalized likelihood with integrated fossil evidence. *Taxon*, v. 56: 31–44. 2007.
- HEPPER, C. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88:641-647. 1981.
- HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; ; CANNON, F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LUCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.;

CASTLEBUR, L.A.; CROUS,P.W.; DAI, Y-C.; GAMS,W.; GEISER,D.M.; GRIFFITH,G.W.; GUEIDAN,C.; HAWKSWORTH,D.L.; HESTMARK,G.; HOSAKA,K.; HUMBER, R.A.; HYDE,K. D.; IRONSIDE, J.E.; KOLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K-H.; LICHTWARD, R. T.; LONGCORE, J.; MIA DLIKOWSKA, J.; MILLER,A.; MONCALVO, J-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, F.; OBERWINKLER,F.; PARMASTO, E.; REEB,V.; ROGERS, J.D.; ROUX,C. RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.S.; SCHUSSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER,C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA , K.; YAO, Y-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5): 509-547. 2007.

JABAJI-HARE, S. Lipid and fatty-acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia*, v. 80: 622-629. 1988.

JAMES, T.Y; KAUFF, F.; SCHOCH,C.L.; MATHENY, P.B.; HOFSTETTER, V.; COX, C.J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER,E.; MIADLIKOWSKA,J.; LUMBSCH,T.; RAUHUT,A.; REEB,V.; ARBOLD, A.E.; AMTOFT,A.; STAJICH,J.A.; HOSAKA, K.; SUNG, G-H.; JOHNSON, D.; O'ROURKE, B.; CROCKETT, M.; BINDER, M.; CURTIS, J.M.; SLOT, J.E.; WANG, Z.; WILSON, A.W.; SCHUSSLER, A.; LONGCORE, J.E.; O'DONNELL, K.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; PORTER, D.; LETCHER, P.M.; POWELL, M.J.; TAYLOR, J.W.; WHITE, M.M.; GRIFFITH, G,W.; DAVIES, D. R.; HUMBER, R.A.; MORTON, J.B.; SUGIYAMA, J.; ROSSMAN, A.Y.; ROGERS, J.D.; PFISTER, D.H.; HEWITT, D.; HANSEN, K.; HAMBLETON, S.; SHOEMARKER,R.A.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOLMEYER,B.; SPOTTS,R.A.; SERDANI, M.; CROUS,P.W.; HUGHES,K.W.; MATSUURA,K.; LANGER,E.; LANGER,G.; UNTEREINER,W.A.; LUCKING,R.; BUDEL,B.; GEISER,D.M.; APTROOT,A.; DIEDERICH,P.;SCHMITT,I.; SCHULTZ,M.; YAHR.; R.; HIBBETT, D.S.; LUTZONI, F.; MCLAUGHLIN, D.J.; SPATAFORA,J.W.; & VILGALYS,R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, v. 443: 818 – 822. 2006.

JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: Novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado à ciência do solo. In: XII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo; I Reunião Brasileira de Biologia do Solo; IV Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia Do Solo; 1996, Águas de Lindóia, SP. Resumos... Águas de Lindóia, SP: USP/SLCS/SBCS, 1996. 5 p. CD ROM.

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

KANDULA, J.; STEWART, A.; & RIDGWAY, H.J. Monoxenic culture of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora calospora* and Ri-TDNA transformed carrot roots. *New Zealand Plant Protection*, v. 59:97-102. 2006.

KAONONGBUA, W.; MORTON, J.B. & BEVER, J.D. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia*, v. 102(6), 2010, pp. 1497-1509. 2010.

KARANDASHOV, V.; KUZOVKINA, I.; HAWKINS, H. J.; GEORGE, E. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza*, v. 10, p. 23-28. 2000.

KOSKE, R.E. & WALKER,C. Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls. *Mycologia*, v. 77:702-720. 1985.

- KOSKE, R.E. Multiple germinations by spores of *Gigaspora gigantea*. Transactions of the British Mycological Society, v. 73: 328-339. 1981.
- LIGRONE, R.; CARAFA, A.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V.; BONFANTE, P. & DUCKETT, J.G. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. American Journal of Botany., v. 94, p.1756–1777. 2007.
- LIMA, W. L. Fungos micorrízicos arbusculares: bioquímica e morfologia da interação com ácidos húmicos e sua multiplicação em aeroponia. Seropédica, 2004. 99f, Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2004.
- LIMA, W. L. Metabolismo do nitrogênio e atividades de bombas de prótons em raízes transgênicas com ácido húmico e simbiose micorrízica arbuscular. Seropédica, 2008. 173f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2008
- LIMA, W. L.; OLIVEIRA, J. R.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; RAPOSO, T. P.; ALVES, G. C.; SILVA, E. M. R.; BERBARA, R. L. L. Editoração de imagens para avaliação do crescimento de plantas ou microrganismos com o programa SIARCS®. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2006. 32 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,14). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/bot014.pdf>.
- LOVELOCK, C.E., S.F. WRIGHT, AND K.A. NICHOLS. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: An example from a tropical rain forest soil. Soil Biol. Biochem., v. 36, p.1009–1012. 2004.
- MAIA, L.C.; YANO-MELO, A.M. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. Brazilian Journal of Microbiology, v. 32: 281-285. 2001.
- MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.; GARCIA, C. Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. Biores Technol, v. 59, p. 199-206. 1999.
- MELLONI, R. & CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. R. Bras. Ci. Solo, v. 23:59-67, 1999.
- MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed). Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, 2.ed. rev. atual. e ampl. p. 01-04. 2008.
- MILLER, R.M. & JASTROW, J.D. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. In: BETHLENFALVAY, G.J. & LINDERMAN, R.G., eds. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, American Society of Agronomy, p.29-44, 1992.
- MOREIRA, F.M.S & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2.ed. atual. e ampl. LAVRAS: Editora UFLA, 2006.
- MORTON J.B. & MSISKA, Z. Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. Mycorrhiza, v. 20: 483-496. 2010.
- MORTON, J. B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon, v. 32: 267-324. 1988.
- MORTON, J.B. & REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia, v. 93: 181-195. 2001.

- MORTON, J.B.; FRANKE, M.; CLOUD, G. The nature of fungal species in Glomales (Zigomicetes). In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J. (eds). Mycorrhizas in ecosystems. p.65-73. 1992.
- MOSSE, B. Growth of endogone mycorrhiza in agar medium. Rothamsted Experimental Station Report for 1971, p.93. 1972.
- MOSSE, B. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. Rothamsted Experimental Station Report for 1961, p. 80. 1962.
- MOSSE, B.; HEPPER, C. M. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ culture. *Physiol. Plant Pathol.*, v. 5, p. 215-223. 1975.
- MUGNIER, J. & MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA grown axenically. *Phytopathology*, v. 77 pp. 1045–1050. 1987.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. & VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. and Biochem.*, v. 34: 1527–1536. 2002.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. Biological activity of humic substances. In: PICCOLO, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, p. 361-406. 1994.
- NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 39, p. 3138–3146. 2007.
- NEBEL, M.; KREIER, H.P.; PREUSSING, M.; WEISS, M.; KOTTKE, I. Symbiotic fungal associations of liverworts are the possible ancestors of mycorrhizae. In: AGERER, R.; PIEPENBRING, M.; BLANZ, P. (eds). *Frontiers in Basidiomycete Mycology*. IHW-Verlag, Munchen, Germany, pp. 339–360. 2004.
- NUNES, M. de S. Fungos micorrízicos arbusculares em porta enxertos de citrus. Dissertação Mestrado, Cruz das Almas: Bahia, 79p. 2004. Disponível em: <http://www.ufba.br/tesesimples//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=42>. Acesso em: 20 abril. 2010.
- OEHL, F.; DE SOUZA, F.A. & E. SIEVERDING. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza forming Glomeromycetes. *Mycotaxon*, v.106: 311-360. 2008.
- OEHL, F.; SYKOROVA, Z.; REDECKER, D.; WIEMKEN, A & SIEVERDING, E. *Acaulospora alpina*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species characteristic for high mountainous and alpine regions of the Swiss Alps. *Mycologia*, v. 98: 286 – 294. 2006.
- PALENZUELA, J.; FERROL, N.; BOLLER, T.; AZCON-AQUILAR, C.; OEHL, F. *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub-land in the Natural Park of Sierra de Baza (Granada, Spain). *Mycologia*, v. 99: 296-305. 2008
- PASZKOWSKI, U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, v. 172, p. 35–46, 2006.
- PHILLIPS, J.M. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. Rothamsted Experimental Station Report for 1970, p. 88. 1971.
- PONS, F. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Observations on extrametrical vesicles of *Gigaspora margarita* *in vitro*. *Trans Br Mycol Soc.*, v. 84: 168-170. 1985.
- POULIN, M.J.; BEL-RHLID, R.; PICHE, Y. & CHENEVERT, R. Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular

- mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment. *J. Chem. Ecol.*, v. 10:2317–2327. 1993.
- PURIN, S.; RILLIG, M. C. Immuno-cytolocalization of glomalin in the mycelium of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, p. 1000–1003. 2008.
- PURIN, S.; RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* 51, 123-130. 2007.
- PURIN, S. & KLAUBER FILHO, O. Glomalina: nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrízicos arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N. & TSAI, S.M. *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. p.503-524. Lavras, 2010.
- PURIN, S. Fungos micorrízicos arbusculares: atividade, diversidade e aspectos funcionais em sistemas de produção de maçã. Dissertação de Mestrado. Lages, UDESC, 2005. 147p.
- QIU, Y.L.; LI, L.; WANG, B. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, v. 103: 15511–16. 2006.
- RABATIN, S.C. The occurrence of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus tenuis* with moss. *Mycologia*, 72: 191-195. 1980.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 5 ed. 2003. 906 p.
- READ, D.J. Development and function of mycorrhizal hyphae in soil. In: SYLVIA, D.M.; HUNG, L.L.; GRAHAM, J.H. (Eds.). *Mycorrhizae in the next decade: practical applications and research priorities*. Gainesville, Fla: [s.n.]. *Proceedings of 7th North American Conference on Mycorrhizae.*, p.178-180. 1989.
- READ, D.J.; DUCKETT, J.G.; FRANCIS, R.; LIGRONE, R.; RUSSELL, A. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London.*, v. 355, pp. 815–831. 2000.
- READ, DJ. The mycorrhizal mycelium. In: ALLEN, M.F. (ed). *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, New York. pp 102-133, 1992.
- REDECKER, D.; KODNER, R. & GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, v. 289, 1920-1921. 2000.
- RENZAGLIA, K.S.A. Comparative developmental investigation of the gametophyte generation in the Metzgeriales (Hepatophyta). *Bryophitum Bibliotheca*, v. 24: 1–253. 2007.
- RENZAGLIA, K.S.; SCHUETTE, S.; DUFF, R.J.; LIGRONE, R.; SHAW, A.J.; MISHLER, B.D.; DUCKETT, J.G. Bryophyte phylogeny: Advancing the molecular and morphological frontiers. *The Bryologist*, v. 110, p.179-213. 2007.
- RHEINHEIMER, D. dos S. & KAMINSKI, J. Intensidade de colonização do córtex radicular e sua relação com a absorção de fósforo pelo capim-pensacola. *Cienc. Rural* [online]. 1995, vol.25, n.2, pp. 223-228. ISSN 0103-8478. doi: 10.1590/S0103-84781995000200008.
- RICE, J.A.; MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*, v. 17, p. 635-648. 1991.
- RILLIG, M.C. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency. *Pedobiologia*, v. 49, p. 395–399. 2005.
- RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, v. 28, n. 4, p. 355-363. 2004

- RILLIG, M.C.; CALDWELL, B.A.; WOSTEN, H.A.B.; SOLLINS, P. Role of protein in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochem*, v. 85, p. 25–44. 2007
- RILLIG, M.C.; MAESTRE, F.T.; LAMIT, L.J. Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 35, p. 1257-1260. 2003.
- RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; ALLEN, M.F.; FIELD, C.B. Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, v. 400, p. 628. 1999.
- RILLIG, M. C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, v. 233, p. 167–177. 2001.
- RITCHIE, J.D.; PERDUE, E.M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter, *Geochimie Cosmochim. Acta.*, v. 67 : 85-96. 2003
- RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R.; ZANDONADI, D.B.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto I: efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p. 649-656, 2006.
- RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R.; ZANDONADI, D.B.; ALMEIDA, D.L.; GUERRA, J.G.M.; SANTOS, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto II: efeito da fonte de vermicomposto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p. 657-664, 2006.
- ROMERO, A.G.F.; SIQUEIRA, J.O. Activity of flavonoids on spored of the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 31: 517-522. 1996.
- SAFIR, G.R. VA Mycorrhizae: an ecophysiological approach. In: SAFIR, G.R. (ed). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–3. 1986.
- SAITO, K.; YAMAZAKI, M.; MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium* mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, v. 55, p. 149-62, 1992.
- SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, 1999. 544 p.
- SCHENCK, N.C.; SPAIN, J.I.L.; SIEVERDING, E. & HOWELER, R.H. Several new and unreported VA mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Colombia. *Mycologia*, v. 76: 685-699. 1984.
- SCHNITZER, M.; GUPTA, V.C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 27, 1965.
- SCHUSSLER, A.; SCHWARZOTT, D. & WALKER, C. A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, v. 105: 1413–1421. 2001.
- SCHUSSLER, A. & WALKER, C. The Glomeromycota : A species list with new families and new genera. 16 December 2010. Gloucester, England. Disponível em: www.lrz.de/~schuessler/.../species.../funneliformis_claroideoglomus_rhizophagus_redeckera.pdf. Acesso em: 15/01/2011. 2010.
- SCHUSSLER, A. *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like with hornworts *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza*, v. 10, 15-21. 2000.
- SILVA, D.K.; FREITAS, N.O.; CUENCA, G.; MAIA, L.C. & OEHL, F. *Scutellospora pernambucana*, a new fungal species in the Glomeromycetes with a diagnostic germinal orb. *Mycotaxon* 106: 361-370. 2008.

- SIMONEAU, P.; LOUISY-LOUIS, N.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Appl. Environmental Microbiology*, v. 60. p. 1810-1813, 1994.
- SIQUEIRA, J. O. Cultura axênica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares: ainda um desafio. *Biocientífica*, Brasília, v. 24, n. 2, p. 5-9, 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBELL, D.H. Spores germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, v. 31:965-972, 1985.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego. 1997. 605 p.
- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, Palo Alto, v. 39, p. 221-244, 1988.
- SONNTAG, C. The role of nonliving organic matter in soils. In: ANDERSON, D. W.; ZEPP, R. G.; (Ed.) *The role of nonliving organic matter in the Earth's carbon cycle*. Berlin: J. Wiley, p. 81-92. 1995.
- SOUZA, E.S.; STARK, E.M.L.M.; BERBARA, R.L.L.; MAGALHÃES, J.R.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Growth, and accumulation of nitrogen and soluble sugars in growth, and accumulation of nitrogen and soluble sugars in carrot and clover hairy roots in two culture media with and without arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, India, v. 12, n. 1, p. 29-33. 2006.
- SOUZA, E.S.; STARK, E.M.L. M.; SOUZA, S.R.; FONSECA, H.M.C.; BERBARA, R.L.L. Protease activity and development in *Daucus carota* and *Trifolium repens* hairy roots in culture media containing different nitrogen source and levels. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v.8(2):251-259. 2002.
- SOUZA, F. A. & BERBARA, R. L. L. Desenvolvimento de esporos de *Glomus clarum* (Nicolson and Schenck) e raízes Ri T DNA transformadas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 26.; Rio de Janeiro: SBCS, 1997, 5p. Seção Temática 3. 1 CD-Rom. 1997.
- SOUZA, F.A. & BERBARA, R.L.L. Estudo da ontogenia da colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares (MA) em raízes transgênicas de *Trifolium repens* L. e *Daucus carota* L. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Nov. 1998. 20 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 62).
- SOUZA, F.A. & DECLERCK, S. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*, v. 95(6), 1004-1012. 2003.
- SOUZA, E.S. Efeito dos diferentes meios de cultura sobre o metabolismo de raízes transgênicas (Ri T-DNA) de cenoura (*Daucus carota* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) como ou sem micorriza. (Tese de doutorado: Ciência do Solo). UFRRJ, Seropédica, RJ. 1998. 155p.
- SOUZA, F.A. de. & BERBARA, R.L.L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia*, v. 91 (2) p. 343-350. 1999.
- SOUZA, F.A.; DECLERCK, S.; SMIT, E.; & KOWALCHUK, G.A. Morphological, ontogenic and molecular characterizations of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). *Micol. Res.*, v. 109 (6): 697 – 706. 2005.
- SPAIN, J.L. & MIRANDA, J.C. *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Gigasporaceae (Glomales) from the cerrado region of Brazil. *Mycotaxon*, v. 55: 129-136. 1996.

- STEELINK, C. Implications of elemental characteristics of humic substances. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHOW, R.L.; MACCARTHY, P. (Ed.). Humics substances in soil, sediment and water. New York: J. Wiley. p.457-476. 1985
- STEVENSON, F.J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: John Wiley, 1994. 402 p.
- STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. Cycles of soil, carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur , micronutrients. New York: John Wiley & Sons, p.5-45.1999.
- STRULLU, D.G.; ROMAND, C. & PLENCHETTE, C. Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology., v.7, 292-297. 1991.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Eds.) Methods of soil analysis: chemical methods. Vol. 3. Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, Madison. (SSSA. Book Series, 5). p. 1011-1020. 1996.
- SYLVIA, D.M.; JARSTFER, A. G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular Mycorrhizal fungi. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (Ed.) Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Netherlands: Kluwer, p. 231-238. 1994.
- TAN, K. H. Humic matter in soil and the environment: principles and controversies. New York basel, New York: Marcel Dekker, INC., 386p. 2003.
- THAXTER, R. A revision of Endogonaceae. Proceedings of the American Academy of Art and Sciences, v. 57: 291 – 351. 1922.
- TOMMERUP, I.C.; KIDBY, D.K. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. Applied and Environmental Microbiology, v. 39, p. 1111-1119. 1980.
- TOMMERUP, I. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Trans Br Mycol Soc., v. 81:37-45. 1983.
- TRAPPE, J.M. What is a mycorrhiza? In: AZCON-AGUILAR, C.; BARREA, J.M. (eds) Mycorrhiza in integrated systems—from genes to plant development. Proceedings of the 4th European Symposium on Mycorrhizae, EC Report EUR 16728, Luxembourg, pp 3–6. 1996.
- TRAPPE, J.M. Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora* and *Acaulospora scrobiculata*. Mycotaxon, v. 6: 359-366. 1977.
- TRESEDER, K.K. Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO₂. p. 713–731. In: DIGHTON, J.; WHITE, J.F. & OUDEMANS, F. (ed.) The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2005.
- TRESEDER, K.K. & TURNER, K.M. Glomalin in Ecosystems. SSSAJ: Volume 71: Number 4 August 2007. 2007.
- TROUVELOT, A.; KOUGH, J.L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. (Ed) Physiological and genetical aspects of mycorrhiza. INRA, Paris. p. 101-109. 1986.

- VOETS, L.; DUPRÉ DE BOULOIS, H.; RENARD, L.; STRULLU, D.G. & DECLERCK, S. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 248:111–118. 2005.
- VOETS, L.; GOUBAU, I.; OLSSON, P.A; MERCKX, R. & DECLERCK, S. Absence of carbon transfer between *Medicago truncatula* plants linked by a mycorrhizal network, demonstrated in an experimental microcosm. *FEMS Microbiol Ecol.*, v, 65:350–360. 2008.
- VOETS, L.; PROVIDENCIA, E.; FERNANDEZ, K.; IJDO, M.; CRANENBROUCK, S.; & DECLERCK, S. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza*, v. 19: 327-356. 2009.
- WALKER, C. & SANDERS, F.E. Taxonomic concept in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon*, v. 27: 169 – 182. 1986.
- WALKER, C. *Ambispora* and Ambisporaceae resurrected. *Mycological Research*, v. 112: 297 - 298. 2008.
- WANG, B. & QIU, Y.L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, v. 16:299-363. 2006.
- WELLMAN, C.H.; OSTERLOFF, P. & MOHLUDDIN, U. Fragments of the earliest land plants. *Nature*,v. 425:282–5. 2003.
- WRIGHT, S.F. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, v. 226, p. 171–177. 2000.
- WRIGHT, S.F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J.B.; UPADHYAYA, A. Timecourse study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil*, v. 181, p. 193-203. 1996.
- WRIGHT, S.F.; STARR, J.L.; PALTINEANU, I.C. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal*, v. 63, p. 1825-1829. 1999.
- WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, v. 8, p. 283–285. 1999.
- WRIGHT, S.F. & A. UPADHYAYA. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, v. 198:97–107. 1998.
- WRIGHT, S.F.; MORTON, J.B. & SWOROBUK, J.E. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-like immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microb.*, v. 53:2222-2225,1987.
- WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. & BUYER, J.S. Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary eletrophoresis. *Soil Biol. Biochem.*, v. 30: 1853-1857, 1988.
- ZAMBOLIN, L.; REIS, M. A.; COSTA, L. M. Substratos para a multiplicação de inóculo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 17, p. 28-31, 1992.
- ZAMBRYSKI, P.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium Ti* and *Ri* plasmids in plants. *Cell*, v. 56:193-201, 1989.
- ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, v. 225, p. 1583-1595, 2007.

ANEXOS

ANEXO A - Meio de cultura MSR (Strullu-Romand) – Raízes

	(mM)		(mM)
N(NH ₄ ⁺)	180	N(NO ₃ ⁻)	3800
K	1650	P	30
Mg	3000	Ca	1520
Cl	870	S	3013
Fe	20	Na	20
Zn	1	Mn	11
Mo	0,22	B	30
Panhotenato Ca	1,88	Cu	0,96
Piridoxina	4,38	Biotina	0,004
Cianocabalamina	0,29	Thiamina	2,96
Sacarose (g/L)	10	Ácido Nicotínico	8,10
Gel gro (g/L)	3	pH (antes de autoclavar)	5,5

* Strullu & Romand (1986) modificado por Declerck et al. (1998).

ANEXO B - Meio de cultura SRV – Briófitas

Macronutrientes (Concentrada 10X)

MgSO ₄ .7H ₂ O	7,39 g
KCl	0,65 g
KH ₂ PO ₄	0,041 g
KNO ₃	0,76 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	3,59 g

Micronutrientes (10.000X)

MnSO ₄ . H ₂ O	18,566g	
H ₃ B ₃	18,6 g	
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,024 g	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,9 g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,35 g	
CoSO ₄ .7H ₂ O	2,38 g ou	CoCl ₂ .6H ₂ O 2,022 g

NaFeEDTA 0,8 g (Concentrado 100X)

Vitaminas (Concentrado 1000X)

Biotina (H)	0,0009g
Pantotenato de Ca (B5)	0,9 g
Thiamina-HCl (B1)	1,0 g
Cyanocobalamina (B12)	0,4 g
Pyrodoxina – HCl (B6)	0,9 g
Ácido Nicotínico (B)	1,0 g

Sacarose 10 g pH 5,5-5,8

Gel Gro 3,8 g

Para cada litro de meio usar 100 mL.L⁻¹ da solução Stock de macronutrientes, 0,1 mL.L⁻¹ da solução Stock de micronutrientes, 10 mL.L⁻¹ da solução Stock de NaFeEDTA e 0,1 mL.L⁻¹ da solução Stock de vitaminas.

Colocar sacarose, aferir pH e adicionar Gel Gro.

Após essa etapa levar para a autoclave por 20 minutos a 1 atm.

ANEXO C - Desinfestação superficial dos esporos de FMAs: Metodologia modificada de BÉCARD & PICHÉ (1992) & LIMA, 2008.

1. Materiais necessários:

- Seringas plástica com capacidade de 10 mL;
- Agulhas
- 2 beckers com capacidade de 50 mL (onde serão colocadas as soluções de cloramina T e o outro com antibióticos para encher as seringas plásticas);
- 1 becker de 200 mL (utilizado para descartar as soluções dentro da capela);
- Agitador de tubos (tipo vortex);
- Bico Bünsen;
- Tubos “vacum tanner” com capacidade de 15 mL (1 para cada espécie de FMA);
- Tampas de borracha estéreis para os tubos “vacum tanner” (4 tampas para cada tubo)
- Pinça anatômica (18 cm);
- capela de fluxo laminar com lâmpada de UV (ultravioleta)
 - . limpar o interior da capela com algodão e álcool e em seguida deixar a lâmpada ultravioleta ligada por 30 minutos.

Todas as vidrarias e materiais devem ser esterilizados em autoclave a 121° C por 20 minutos antes de serem utilizados no processo de desinfestação.

2. Preparo das soluções:

Solução 1. TWEEN 20 (0,05% v/v)

- pipetar 500µL do reagente “Tween 20 (PA)” em um balão volumétrico com capacidade de 100mL e completar o volume com água destilada.

Obs: a solução deve ser armazenada em geladeira (4°C) após o seu preparo.

Solução 2. CLORAMINA T (2% p/v)

- pesar 2g do reagente CLORAMINA T e transferir para um balão volumétrico com capacidade de 100mL e completar o volume com água destilada.

Obs: a solução deve ser armazenada em geladeira (4°C) após o seu preparo.

Solução 3. ANTIBIÓTICOS (Estreptomicina + Gentamicina)

- pesar 50mg de estreptomicina e 25mg de gentamicina e transferir para balão volumétrico de 250mL e completar o volume com água destilada.

Obs: a solução deve ser armazenada em geladeira (4°C) após o preparo (período máximo de 30 dias).

3. Procedimentos:

- A) Extrair e selecionar os esporos visualmente viáveis;
- B) Transfira os esporos selecionados para os tubos “vacum tanner” devidamente identificados (um para cada espécie);
- C) Retire a água (que transportou os esporos) dos tubos com auxílio de agulha;
- D) Adicionar ± 10 mL da solução 1 (Tween 20) em cada tubo;

- E) Tampar com rolhas de borrachas (apropriadas, não estéreis);
- F) Agitar os tubos (vortex ou manualmente) por 1 minuto;
- G) Retirar a solução com agulha, recolhendo a solução nos becker de 200 mL;
- H) Adicionar ± 10 mL da solução 2 (Cloramina T) em cada tubo;
- D) Tampar com novas rolhas de borrachas (apropriadas, não estéreis);
- J) Agitar os tubos (vortex ou manualmente) por 5 minutos;
- K) Retirar a solução com as pipetas Paster de extremidades afinadas, recolhendo a solução nos becker de 200 mL;
Repetir etapas H até K por 5 vezes;
- L) Adicionar ± 10 mL da solução 3 (Gentamicina + Estreptomicina) em cada tubo;
- M) Tampar com novas rolhas de borrachas (apropriadas, estéreis);
- N) Agitar os tubos (vortex ou manualmente) por 10 minutos;
- O) Retirar a solução com agulha, recolhendo a solução nos becker de 200 mL;
Repetir etapas L até O por 3 vezes. Após essa etapa armazenar os tubos tampados em geladeira por 16 horas ou deixar pernoitar. Após esse período, repetir as etapas de cloramina T e antibióticos.
- P) Adicionar aproximadamente 10 mL de água destilada estéril em cada tubo;
- Q) Tampar com novas rolhas de borrachas (apropriadas, estéreis);
- R) Agitar os tubos (vortex ou manualmente) por 10 minutos;
- S) Retirar a água com agulha, recolhendo-a nos becker de 200 mL;
Repetir a etapa de lavagem 2 vezes.
- T) Transferir os esporos, com auxílio de pipetas, para as placas contendo meio agar-água aproximadamente 100 esporos por placa e que estejam bem distribuídos (evitar agrupamento dos esporos);

Obs: este procedimento é realizado dentro da capela logo após o procedimento de desinfestação superficial dos esporos, devendo-se ter o cuidado de limpar novamente a capela com álcool e deixar a lâmpada de UV ligada por 30 minutos, juntamente com as placas Petri (contendo o meio agar-água).

- U) Armazenar as placas em local apropriado (câmara termostática) para oferecer condições adequadas para a germinação dos esporos.

Obs: o ideal seria a 25 °C de temperatura constante e no escuro.

À medida que os esporos vão germinando eles podem ser repicados para placas Petri contendo raízes transformadas sub-cultivadas. Quantificar os esporos germinados para cálculo da taxa de germinação (até 30 dias).

As placas serão então incubadas à 25 °C, no escuro, e avaliadas diariamente quanto à produção de novos esporos e células auxiliares (dependendo da espécie).

ANEXO D - Editoração de imagens e cálculo de área e comprimento através do SIARCS

Essa metodologia foi proposta por LIMA et al., (2006) e consiste na captura de imagens utilizando câmeras digitais e uso do software “Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo” 3.0 (SIARCS 3.0) (JORGE & CRESTANA, 1996).

Resumidamente, com uma câmera digital são capturadas imagens das placas Petri com raízes ou briófitas, no formato JPEG, com mesma altura e zoom. Na base do aparato utilizado para tomar as fotos, existe um gabarito marcando 1 cm que é a escala a ser usada no programa.

Para ser possível a editoração das imagens no SIARCS foi necessária uma modificação para um formato aceito pelo software conforme metodologia descrita por OLIVEIRA et al., (2003). As imagens foram processadas usando o programa Adobe Photoshop 2010. A escala original da foto foi mantida, para isso foi recortada e anexada após a preparação da imagem. Foi necessário separar a parte da briófita/raízes do resto da foto. Tornava-se necessário então a seleção da área da briófita/raízes separando o limite externo do restante da imagem. Para isto utilizou-se a ferramenta *borracha*.

Depois de feito o contorno, a parte contornada juntamente com a parte central da briófita foram selecionadas. Para isso foi utilizada a ferramenta *Varinha Mágica*. Para a utilização posterior do programa Siarcs a imagem deveria estar na cor preta para aferição de sua área.

A seguir então foi feito o preenchimento da imagem em cor preta, com o comando "*Menu: editar/preencher/conteúdo/usar cor do primeiro plano/preto*". Esse evento foi repetido 2 a 3x para garantir um melhor preenchimento da imagem. Para o preenchimento do restante da imagem, (segundo plano-fundo) foi utilizada cor branca. O comando utilizado foi: "*Menu: editar/preencher/conteúdo/usar cor do segundo plano/branco*". O resultado foi a imagem da briófita/raízes em preto, sob fundo branco, o que demarcou apenas o conteúdo a ser analisado pelo Siarcs. Em seguida foi adicionada a escala original previamente cortada à imagem já processada. Logo após a imagem foi salva no formato bmp 32bits.

Após o preparo das imagens, estas foram analisadas no programa SIARCS tendo mensuradas sua área e comprimento.