

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**ESTUDOS PRELIMINARES COM MICORRIZAS EM
ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA (BERT.) O. KTZE.**

Roberta Boscaini Zandavalli

Trabalho realizado como um dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas – Ênfase Botânica – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Rebello Dillenburg

Porto Alegre, fevereiro de 1999

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos professores do Laboratório de Fisiologia Vegetal, especialmente à Prof.^a Dr.^a Lúcia Rebello Dillenburg, pela paciência em ensinar, pela orientação e pela amizade.

Aos colegas do laboratório, pelas conversas e ajuda quando precisei.

À colega Tânia Sales da Silveira, pelo auxílio no assunto em questão.

À Rosilaine Carrenho, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela identificação dos esporos de micorrizas.

À FAPERGS, pela bolsa de iniciação científica.

Ao Prof. Paulo Vítor, da Faculdade de Agronomia, pela atenção

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal pelo empréstimo de equipamentos.

Aos meus pais, Claudio e Irene, pelo grande apoio e incentivo.

Ao Marcelo, pela ajuda nos momentos difíceis.

RESUMO

Micorrizas arbusculares associam-se comumente a raízes de plantas herbáceas, árvores tropicais e subtropicais. Associações com raízes do pinheiro brasileiro já foram constatadas. No entanto, os benefícios para a nutrição e crescimento da *Araucaria angustifolia*, e as espécies de fungos que tipicamente se associam a esta espécie são pouco conhecidos. Também, as técnicas comumente utilizadas para análise de infecção micorrízica não foram ainda ajustadas para a espécie em questão. Este trabalho tem por objetivos: identificar as espécies de fungos micorrízicos que comumente se associam à *A. angustifolia*, adaptar técnicas de clareamento e coloração de raízes da espécie, visando análise da presença de micorrizas e contribuir para o conhecimento dos efeitos dessa associação sobre o crescimento de plântulas. Para tanto, foram feitas coletas de solo na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, com posterior separação (peneiramento úmido) e identificação dos esporos presentes. Foram identificados um total de 9 espécies de fungos endomicorrízicos, destacando-se o gênero *Glomus* e as espécies *G. geosporum* e *G. macrocarpum*. A partir de raízes coletadas na natureza, foram testadas diferentes técnicas de clareamento e coloração, sendo que a mais apropriada foi a clareamento com KOH 10% em autoclave durante 20 min, imersão em H₂O₂ alcalino por 20 min, imersão em HCl 1% por 10 min e coloração com Tripán Blue. Para estudar os efeitos da associação, foram conduzidos dois experimentos preliminares comparando o crescimento de plantas cultivadas em um substrato contendo solo de mata nativa com *A. angustifolia* e plantas cultivadas no mesmo substrato, porém autoclavado para eliminar a presença de esporos viáveis. Ao final dos mesmos, as raízes dos dois grupos de plantas foram clareadas e coradas, não se verificando nenhuma infecção micorrízica nos dois grupos. Para isto, Ao longo do experimento, foram feitas medidas periódicas de altura e finais de massa seca. A partir destas pesagens, foram calculados parâmetros de alocação de biomassa, como razão raiz/parte aérea e razão raiz lateral/principal. Os dois experimentos mostraram que o único efeito consistente da inoculação foi o fato de que raízes crescidas em terra infectada alocaram mais biomassa para as raízes laterais em detrimento da raiz principal. A priorização de raízes laterais possivelmente resultou de algum tipo de sinalização por parte do fungo, com a finalidade de aumentar a superfície radical para colonização. Novos experimentos serão realizados aumentando a concentração de esporos no solo a fim de maximizar os resultados obtidos.

INTRODUÇÃO

Conhecida como pinheiro Brasileiro ou pinheiro-do-Paraná, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze pertence à família Araucariaceae. Sua distribuição no Brasil limita-se principalmente à parte leste e central do planalto meridional, abrangendo os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo ainda, como manchas esparsas, no sul do estado de São Paulo, na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais e no Rio de Janeiro. Entre as latitudes 25° 30' e 27° sul, o pinheiro passa para a Província Argentina de Misiones (Koscinski, 1934; Oliveira, 1948; Hueck, 1953; Backes, 1988; Reitz, 1988). O clima onde se encontra a espécie é geralmente subtropical de altitude, onde a precipitação média anual é relativamente elevada (acima de 1300 mm), e a temperatura média anual está entre 10°C e 20°C (Ferreira, 1990). A altitude de ocorrência do pinheiro é maior quanto menor for a latitude (Hueck, 1953). No Rio Grande do Sul, a *A. angustifolia* ocorre em altitudes médias entre 600 e 800 m e, em alguns lugares, chega a 1000 m. A distribuição da espécie em questão neste estado se dá principalmente no planalto, sendo encontrada nas bordas abruptas dos seus vales, em sua margem meridional, e, geralmente, nos cursos dos rios. A espécie não forma florestas densas, mas mosaicos de floresta e campo, formando os chamados “capões” em todo o planalto (Rambo, 1951). Backes (1988), após analisar numerosos dados de clima, chegou à conclusão de que a área de ocorrência atual representa um refúgio da *A. angustifolia*, a qual está confinada a locais onde o clima é desfavorável às espécies tropicais, pois a capacidade competitiva da conífera em questão é menor do que a das espécies latifoliadas. Segundo o mesmo autor, a dispersão da espécie é desfavorecida pelo elevado peso das sementes. Se as sementes de *A. angustifolia* não forem transportadas e, caírem no interior da mata latifoliada, as plântulas não sobreviverão neste ambiente. Portanto, a distribuição atual do pinheiro Brasileiro não está em função direta dos condicionamentos ambientais, mas é determinada, em parte, pelos sistemas de latifoliadas com as quais compete. A espécie destaca-se por sua importância, tanto pela quantidade como pela qualidade da madeira produzida, assim como pelo valor nutritivo da semente e sua extraordinária beleza paisagística. Devido a essa importância, muitas destas árvores foram cortadas para extração de madeira, diminuindo muito sua área de ocupação. As matas com o pinheiro Brasileiro, no início do Século XX, ocupavam no Brasil, 200.000 km². Hoje, extensas formações de floresta são quase inexistentes, restando apenas 3% da

vegetação original. Em 1947, por exemplo, a exportação total de madeiras brasileiras foi de 629.000 toneladas; destas, 476.400 toneladas eram de pinheiro (Aubreville, 1949).

Dentre os fatores que afetam o crescimento e estabelecimento de espécies arbóreas, destacam-se as propriedades físicas do solo, regime luminoso e hídrico, competição, nutrição, e presença de micorrizas. As micorrizas (*mico* = fungo; *riza* = raiz) são associações mutualísticas de fungos com raízes das plantas, auxiliando no estabelecimento, fase importante para sobrevivência das plântulas. Nesta fase um auxílio na obtenção de nutrientes é vital para a competição radical em busca de nutrientes. O micélio extra-radical aumenta o volume de solo explorado pela planta para absorção de nutrientes. A extensão deste micélio dependerá da espécie de fungo, situado geralmente em torno de 12 a 15 cm³ por cm de raiz e podendo chegar a um extremo de 200cm³ por cm de raiz, sendo o micélio o principal meio de obtenção e translocação de nutrientes e água para planta (Sieverding, 1991). Portanto, uma associação micorrízica significa uma maior produtividade em biomassa vegetativa (Janos, 1980), sementes e frutos (Stanley *et al.*, 1993). A importância desta simbiose poderia ser explicada simplesmente pela sua abundância e distribuição (Allen, 1991), pois a maioria das plantas terrestres estão associadas às micorrizas: briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Portanto, é mais fácil listar as famílias ou gêneros que não formam micorrizas (Harley & Smith, 1983). Segundo estes autores, famílias que possuem pouca ou nenhuma dependência das micorrizas são as Cyperaceae (cosmopolitas), Juncaceae (ambientes encharcados), Urticaceae (ruderais), Chenopodiaceae (ruderais, xerofíticas e halofíticas), Caryophyllaceae (ruderais) e Cruciferae (cosmopolitas ou ruderais). Um gênero que é pouco suscetível à micorrização é *Lupinus*, da família Fabaceae.

Existem sete tipos de micorrizas: endomicorrizas (micorrizas arbusculares), ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutóides, monotropóides, ericóides e orquidóides. Cada associação possui características próprias e plantas “hospedeiras” específicas. As endo- e ectomicorrizas são mais estudadas por serem mais abundantes e por se associarem à maioria das plantas arbóreas, herbáceas e arbustivas. As ectomicorrizas são comuns em espécies arbóreas temperadas, como, por exemplo, àquelas dos gêneros *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Castanea*, *Bauhinia* e *Betula*, entre outras. Por outro lado, as endomicorrizas são comuns em plantas tropicais, como, por exemplo, as dos gêneros *Araucaria*, *Podocarpus*, *Agathis*, *Fraxinus*, *Lolium*, *Allium*, *Trifolium*, *Medicago*, entre outras (Harley & Smith, 1983). A diferença morfológica entre estes dois tipos de fungo é que, no caso de

ectomicorrizas, o fungo forma um micélio denso no exterior da raiz, semelhante a uma manta e um micélio no interior do córtex radical, que nunca penetra a parede celular das células. Já nas endomicorrizas, o micélio extra-radical não é tão denso, e o micélio intraradical penetra na parede das células do córtex da raiz. Não só o micélio penetra nas células, mas também estruturas chamadas de vesículas e arbúsculos. As vesículas possuem lipídios para reserva do fungo, e os arbúsculos estão envolvidos na troca de nutrientes. Os fungos do tipo endomicorrízicos, os quais se associam à espécie em questão, pertencem à divisão Zygomycotina, ordem Glomales, família Endogonaceae, que possui seis gêneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Sclerocystis*, *Scutellospora*, *Entrophospora* (Morton & Benny, 1990). Esta simbiose é obrigatória para o fungo, mas facultativa para a maioria das plantas, e a dependência da micorriza é uma propriedade intrínseca de cada espécie de planta, podendo esta ser obrigatória ou facultativa, dependendo da sua habilidade de crescer com ou sem fungo a diferentes níveis de fertilidade do solo (Harley and Smith, 1983; Brundrett, 1991; Sieverding, 1991 & Isaac, 1992).

O benefício da infecção micorrízica dependerá das condições do local: se o solo for muito fértil, não haverá necessidade da planta em associar-se com o fungo e, assim, economizará a energia que serviria para sustentá-lo (West *et al.*, 1993). Portanto, a fertilização com N ou P reduz a colonização micorrízica e a frequência dos fungos (Alexander & Fairley, 1983; Sylvia & Neal, 1990). A taxa de infecção decresce conforme aumenta o nível de P na solução do solo e, por consequência, à medida que melhora o estado nutricional da planta. Esse decréscimo na micorrização se torna maior, quanto menor for a dependência da planta à micorrização. O alto desenvolvimento de fungos no solo e, por consequência, a alta infecção, estão correlacionados com a alta exudação radical de aminoácidos e açúcares, usados como fontes de carbono para o fungo no seu desenvolvimento inicial. Essa exudação parece ser mediada pela permeabilidade da membrana celular, a qual é regulada pelo nível de fósforo celular; desta forma, a planta regula a primeira fase de infecção (Koske & Gemma, 1992). Então, haverá uma maior quantidade de vesículas, arbúsculos e micélio na raiz da planta hospedeira sob situação de estresse nutricional (Cooke *et al.*, 1992; Manjunath & Habte, 1992).

Solos tropicais possuem pH ácido, e por isso, apresentam deficiência em fósforo (P), nitrogênio (N) e potássio (K), pois, nestes solos ácidos, estes elementos têm menor mobilidade, ao contrário do alumínio (Al) (Marschner, 1986). Segundo o mesmo autor, o aumento no crescimento por MA (micorrizas arbusculares) ocorre pelo fornecimento de

nutrientes minerais de pouca mobilidade na solução do solo, predominantemente o fósforo. A micorriza vai absorver o nutriente além da zona de depleção da raiz, através do micélio que se prolonga no exterior da raiz. Muitos estudos comprovam que micorrizas aumentam a absorção de nutrientes minerais. No caso do fósforo, esses estudos foram feitos com espécies e ambientes (ou substratos) diferentes. Todos os experimentos que tiveram boa colonização e conteúdo apropriado de nutrientes para a formação de micorrizas resultaram no aumento do conteúdo de P absorvido pela planta (Koide & Li, 1990; Ikram *et al.*, 1992; Mullen & Schmidt, 1993; Guissou *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Moyersoem *et al.*, 1998). Eason *et al.* (1991) compararam a transferência de P de uma raiz morta, colonizada por MA, para outras duas espécies de plantas diferentes, uma MA (micorrizica arbuscular) e outra ECM (ectomicorrizica). Os autores constataram uma maior eficiência de transferência entre plantas de mesmo tipo de micorriza que a doadora (MA). O aumento de absorção de P ocasionado pela associação resulta para a planta em um aumento na biomassa (Kormanik *et al.*, 1981, 1982; Daft, 1983; Holden *et al.*, 1983; Khasa, 1991) e fecundidade (Stanley *et al.*, 1993; Carey *et al.*, 1992) em plantas dependentes de micorrizas. Em menor quantidade, foram feitos estudos sobre a absorção de N pelas plantas micorrizadas, onde foi observado um aumento no conteúdo de N e no acúmulo de biomassa nas plantas com micorrizas (Bledsoe & Zasoski, 1983; Reeves, 1992; Pereira *et al.*, 1996; Faure *et al.*, 1998). O maior benefício das micorrizas está no melhor estado nutricional da planta pois o fungo auxilia também na resistência à patógenos e drogas. Com um melhor status nutricional a planta apresenta um maior nível de fixação do CO₂ atmosférico e, portanto, um aumento na fotossíntese, pois há um aumento na quantidade de proteínas envolvidas neste processo (De La Rosa *et al.*, 1998; Klironomos *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1998), e desenvolve uma maior área foliar (Wright *et al.*, 1998) tendo, como resultado, um aumento no crescimento.

Quando esses fungos penetram nas raízes da planta “hospedeira”, modificam a morfologia da raiz, quanto ao número e tamanho das ramificações. Em *Platanus acerifolia*, por exemplo, infectado com *Glomus fasciculatum*, Tisserant *et al.* (1996) obtiveram um aumento no número de raízes de 2^a, 3^a e 4^a ordem, resultando num importante aumento na ramificação da raiz comparada às raízes não infectadas. Em *Allium porrum* (Berta *et al.*, 1992), a micorriza arbuscular induziu modificações na morfologia da raiz, tornando as raízes infectadas mais densas, as ramificações de raízes mais curtas, e com maior diâmetro, comparadas com as plantas controle. Os autores colocam que essa diminuição no tamanho

das raízes sendo a uma inibição na atividade meristemática, provocada, provavelmente, por hormônios, tais como citocininas e giberelinas, liberados pelo fungo, pois o fungo, em si, geralmente não é encontrado próximo ao ápice das raízes. Milanez & Monteiro (1950) também observaram raízes curtas em *A. angustifolia*, semelhantes a nódulos, e deduziram ser devido à colonização micorrízica. Segundo eles, os pseudo-nódulos se originavam de um crescimento exagerado do córtex das raízes de 2ª e/ou 3ª ordem. Vários autores até 1969 ainda acreditavam tratarem-se de nódulos. Bevege (1971) fez um estudo detalhado sobre micorrizas em *Araucaria cunninghamii*. Segundo ele, algumas gimnospermas, como *Agathis australis*, *Podocarpus lawrencei* e *A. cunninghamii*, formam essas raízes curtas independentemente de um estímulo externo, pois foram detectadas raízes curtas em plantas sem micorrizas. O autor concluiu que a morfologia das raízes é devido à interação do genótipo com os fatores edáficos, o qual pode interferir indiretamente no crescimento e absorção de nutrientes. Da mesma forma, Sousa *et al.* (1998) encontraram os chamados pseudo-nódulos em plantas não micorrizadas de *A. angustifolia*, confirmando as observações de Bevege (1971).

A morfologia da raiz está relacionada ao grau de dependência da associação micorrízica, que será maior ou menor em diferentes espécies de plantas e fungos (Pope *et al.*, 1982). Manjunath & Habte (1990) compararam 4 espécies de *Leucaena* e 4 espécies de *Sesbania*, para relacionar a morfologia radical com a dependência de micorrizas. *Leucaena* apresentou-se com maior grau de dependência à micorriza. Hentrick *et al.* (1990) fizeram estudo semelhante com gramíneas de verão e de inverno; no caso, as gramíneas de inverno possuíam as características de menor dependência à micorrização. Em ambos os estudos comprovou-se a hipótese de que existem características morfológicas no sistema radical que explicam diferentes dependências à micorriza: maior massa e densidade radical, menor diâmetro radical, maior comprimento radical, maior porcentagem de pêlos, e, portanto, maior superfície de contato e maior absorção de fósforo (P) são características associadas às espécies de menor dependência (Hentrick *et al.*, 1990; Manjunath & Habte, 1990). Brundret *et al.* (1989) descreveram características do sistema radical de 20 árvores, concluindo que estas podem ser usadas para identificação das árvores até gênero, e que espécies de mesmo gênero usualmente têm o mesmo tipo de micorriza, sendo esta relação consistente dentro da família.

Koide & Elliott (1989) e Johnson *et al.* (1997) questionam o fato da micorriza ser sempre uma associação mutualística. Segundo os autores, isto dependerá da relação entre

custo e benefício, considerada em termos de C e P para a planta, respectivamente. Como o fungo é simbiote obrigatório, o benefício para ele é grande enquanto o custo é mínimo. No caso de uma planta que se desenvolve em más condições luminosas, por exemplo, (ocasionando uma limitação na produção de fotossintatos), o custo de sustentar o fungo pode exceder o benefício, pois não adiantará uma melhora na obtenção de nutrientes, que por consequência aumentaria a capacidade fotossintética, se a planta não consegue fixar C por falta de energia luminosa. Neste caso, a micorriza se tornaria parasita, e esse tipo de associação pode ocorrer quando fatores físicos, químicos ou bióticos causam no sistema micorrízico um aumento excessivo no custo em relação ao benefício. Francis & Read (1995) inocularam MA em plantas com diferentes graus de dependência à micorriza. Os autores constataram que plantas com dependência da micorriza (*Plantago lanceolata*, Plantaginaceae) obtiveram um aumento no crescimento, enquanto outras, de famílias que não são dependentes de micorrizas, (e. g. *Arabis hirsuta*, Cruciferae; *Arenaria serpyllifolia*, Caryophyllaceae e *Chenopodium album*, Chenopodiaceae) tiveram seu crescimento drasticamente reduzido, por serem sensíveis a uma grande quantidade de micélio do fungo, não suportando a inativação de meristemas laterais. Portanto, o tipo de envolvimento entre parceiros dependerá da espécie de planta e do fungo. Os autores concluem que o mutualismo ou antagonismo possivelmente têm papel importante na distribuição individual das plantas, influenciando na estrutura natural das comunidades. Um outro importante aspecto ecológico no estudo das micorrizas refere-se à sazonalidade das mesmas, refletida na variação, ao longo do ano, na identidade, número e atividade dos esporos de fungos disponíveis à micorrização. Estabelece-se, então, uma sucessão temporal e espacial de espécies de fungos (Fleming, 1983; Truffem & Bononi, *et al.*, 1985; Truffem, 1990; Sanders, 1992; Klironomos *et al.*, 1993; Mason *et al.*, 1993; Brown & Bledsoe, 1996; Merryweather & Fitter, 1998).

Os estudos envolvendo micorrizas em *A. angustifolia* são ainda muito limitados e inconclusivos, ao contrário do estudo detalhado já feito com *A. cumminhamii* (Bevege, 1971). Embora a associação da espécie com endomicorrizas já tenha sido reconhecida desde a metade deste século (Milanez e Monteiro, 1950), não existe, até hoje, uma definição quanto ao grau de dependência da espécie em relação a esta associação. Na rizosfera da *A. angustifolia*, já foram encontrados esporos de 13 diferentes espécies de endomicorrizas, segundo um levantamento feito em plantas do Jardim Botânico de São Paulo (Bononi, *et al.*, 1989). Em experimentos com a mesma espécie, feitos por Muchovej

et al (1992), foram inoculadas ectomicorrizas das espécies *Rhizopogon nigrescens* e *Pisolithus tinctorius* e endomicorrizas das espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Glomus mosseae*, individualmente e em combinações. Houve colonização só por endomicorrizas, mas a colonização foi baixa, e não houve diferença nas características avaliadas, o que, segundo o autor, deveu-se ao curto tempo do experimento e à restrição do recipiente para crescimento da raiz.

O trabalho aqui apresentado enquadra-se dentro de um projeto mais amplo, que visa a caracterizar a importância das micorrizas para o sucesso no estabelecimento e crescimento do pinheiro Brasileiro, assim como determinar os mecanismos fisiológicos envolvidos nesta interação. Como contribuição a este projeto, este trabalho teve por objetivos caracterizar os fungos que estão tipicamente associados com a *A. angustifolia* na região do Planalto sul riograndense e testar as respostas de plântulas da espécie à inoculação com micorrizas. A fim de atender o primeiro objetivo, foram feitas coletas de esporos na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, onde a espécie tem ampla distribuição. Visando a abordar o segundo objetivo, foram feitos estudos preliminares, testando algumas técnicas de inoculação de plântulas. A fim de se verificar a presença ou não de colonização, foi também necessário adaptar as técnicas já existentes de clareamento e coloração de raízes à espécie em questão.

Universidade Federal de Rio Grande
Departamento de Biologia
BIBLIOTECA

MATERIAL E MÉTODOS

Técnicas testadas para observação de colonização micorrízica em *A. angustifolia*:

As raízes utilizadas para teste eram provenientes de plântulas coletadas na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. As raízes coletadas foram fixadas em FAA [90% de álcool (50%), 5% de ácido acético e 5% de formaldeído(35%)] por 3 dias e depois conservadas em álcool 70%. A partir da revisão bibliográfica, fez-se um levantamento de diferentes técnicas de clareamento e coloração de raízes, visando a posterior observação da colonização micorrízica. Serão a seguir descritas, de forma reduzida, as técnicas utilizadas por 5 grupos de autores, para diferentes espécies. A técnica mais apropriada para raízes de *A. angustifolia* resultou de uma combinação e/ou adaptação destas e será descrita com maiores detalhes na seção de *Resultados* deste trabalho. As fotomicrografias ópticas que ilustram a técnica e os esporos obtidos foram feitas em um microscópio DIALUX 20 EB da Leitz.

Bevege (1968): *Araucaria cunninghamii*

>Autoclavagem das raízes em KOH 1N por 10min ou mergulhadas na mesma solução por alguns dias, e posterior lavagem com água.

>Imersão das raízes em hipoclorito de sódio acidificado com gotas de ácido hidrocloreto 5N por 3 a 10min e posterior lavagem com água.

>Autoclavagem em lactofenol alcoólico e Cotton Blue para coloração das raízes.

Phillips and Hayman (1970): *Allium cepa*. Esses autores modificaram a técnica de Bevege (1968). A técnica por eles adotada é a mais utilizada e citada nos trabalhos que os sucederam.

>Imersão em KOH 10% à 90°C por 1h e posterior lavagem com água.

>Imersão em H₂O₂ alcalina (10 vol.) por 10min a 1h e posterior lavagem com água.

Segundo os autores, a imersão em hipoclorito de sódio resulta em raízes pouco coradas.

>Acidificação com HCl diluído, neutralizando o KOH, e acidificando o meio para maior eficiência do corante.

>Coloração das raízes com trypan blue 0,05% em lactofenol, por 5min, a 90°.

Schenck (1982):

>Autoclavagem das raízes em KOH 10% por 10 min ou a 90°C por 1h, e posterior lavagem com água.

>Imersão em KOH alcalina (94,5 ml H₂O + 5 ml H₂O₂ 0,5 ml NH₄) por 10-20 min, e posterior lavagem com água.

>Imersão em HCl a 1% por 3 a 4 min.

>Coloração com fucsina ácida (0,1g).

Koske and Gemma (1989): usando raízes de diversas espécies, pertencentes a várias famílias, incluindo representantes de angiospermas (mono- e dicotiledôneas), pteridófitas, e briófitas.

>Autoclavagem das raízes em KOH 2,5% por 3min, ou a 90°C por 10 a 30min. Segundo os autores, KOH a 10% danifica o córtex.

>Imersão em H₂O₂ alcalina 3% por 10 a 45min.

>Imersão em HCl 1%.

>Coloração com trypan blue 0,05 % em uma solução de 500ml glicerol, 450ml H₂O, 50ml 1% HCl por 3min em autoclave ou à 90°C por 15 a 60 min.

Sieverding (1991):

>Imersão em KOH 10% em banho-maria a 90°C por 30 a 60 min e posterior lavagem com água.

>Imersão das raízes em H₂O₂ alcalina 10% por 10 a 20 min e posterior lavagem com água.

>Imersão das raízes em HCl por 15 min.

>Coloração das raízes com trypan blue 0,5%.

Técnica para separação e identificação de esporos:

A coleta dos esporos foi igualmente feita em diferentes matas reflorestadas com *A. angustifolia*, na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, em Junho de 1998. Amostras de solo coletadas em 5 locais diferentes, entre as profundidades de 0 e 15 cm,

foram reunidas em uma amostra composta, para posterior separação e identificação dos esporos. O peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) foi a técnica utilizada para separação dos esporos. Para tanto, uma amostra de 50ml de solo foi colocada num conjunto de 3 peneiras, com malhas progressivamente menores, onde a peneira de malha maior ficou em cima. As malhas das peneiras foram de 710, 106, 53 μm^{-1}). O detrito das peneiras de maior porosidade foi descartado, ficando-se apenas com o solo acumulado na peneira de malha mais fina. Depois de bem lavado, o solo foi centrifugado por 5 min (1200 rpm, centrífuga Excelsa II, modelo 202 MP), desprezando-se, então, o sobrenadante. No lugar do sobrenadante, foi colocada uma solução de sacarose 50%. A amostra foi então centrifugada novamente por 1 min. A seguir, separou-se o sobrenadante, por peneiragem e lavou-se o material retido abundantemente com água. Os esporos foram separados da amostra utilizando-se pipeta Pasteur (Colozzi-Filho & Balota, 1994). O esporo separado foi fixado em lâmina no PVLG (16,6g de álcool polivinil + 100ml de H_2O + 100ml de ácido láctico + 10ml de glicerina) ou MELZER (0,5 g de iodo + 1,5 g de potássio iodado + 20 ml de cloral hidratado + 20 ml de água destilada), para melhor observação das paredes do esporo. Com uma leve pressão sobre a lamínula, quebraram-se os esporos para contagem e caracterização das paredes, caracteres utilizados na identificação taxonômica. Lâminas montadas com esporos foram mandadas para especialistas do Instituto de Botânica de São Paulo.

Experimentos preliminares para verificação dos efeitos da inoculação micorrízica sobre o crescimento de *A. angustifolia*:

Foram realizados 2 experimentos preliminares, semelhantes, visando a análise das respostas de plântulas do pinheiro Brasileiro à colonização micorrízica.

Local e condições de cultivo: os dois experimentos foram conduzidos em bancada junto à janela nas dependências do Laboratório de Fisiologia Vegetal. As plantas recebiam insolação direta pela parte da manhã e luz difusa pela parte da tarde. O cultivo foi feito em garrafas plásticas de 500 ml, com altura de 15 cm. O substrato utilizado será descrito no próximo item. Os experimentos tiveram duração de 3 meses, e, durante este período, as plantas foram mantidas com adequado suprimento hídrico, irrigando-se os vasos uma vez por semana.

Substrato de cultivo e inoculação micorrízica: foram estabelecidos, em cada experimento, dois tratamentos: 1. Controle: neste grupo de plantas, o substrato utilizado foi

totalmente autoclavado, visando a esterilização do mesmo; 2. Substrato infectivo: neste grupo, o substrato de cultivo continha uma camada infectante não autoclavada, com disponibilidade de estruturas micorrízicas para infecção das raízes (Fig. 1). Nos dois tratamentos, o substrato utilizado foi composto por uma mistura de areia de textura média lavada e terra preta comercial (1:1; v: v). Para o preparo da camada infectante, foram feitas coletas de solo em mata reflorestada com *Araucaria*, localizada na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, nos dias 5 de maio (experimento 1) e 2 de setembro (experimento 2) de 1997. As amostras coletadas consistiam de solo e raízes retirados da rizosfera de plântulas do pinheiro brasileiro. A escolha da rizosfera como ponto de coleta do solo visou a provável inclusão de propágulos de micorrizas (esporos e hifas) na amostra. Para cada experimento, estabeleceu-se uma amostra composta a partir de 5 pontos de coleta distintos, compreendendo cada uma delas solo e raízes presentes na camada de 0 a 15 cm. As coletas foram feitas com pá de corte e pá de mão, antecedidas da retirada da vegetação rasteira e/ou da serrapilheira. Em laboratório, foram separadas as raízes do solo. A terra foi colocada para secagem na sombra e depois armazenado sob refrigeração (4 – 6°C) com baixa umidade para manter a viabilidade dos esporos (Colozzi-Filho & Balota, 1994). Essa terra coletada na floresta compôs a camada infectiva do substrato de cultivo e consistiu de uma camada de 50 ml, colocada a uma profundidade de 3,5 cm da superfície (Fig. 1). Para as plantas controle, esta camada foi previamente autoclavada. A autoclavagem da terra coletada e do restante do substrato de cultivo foi feita em 3 períodos de 1 hora cada, espaçados entre si por 24 horas. A análise do substrato utilizado e da terra de mata nativa, efetuada pelo Departamento de solos da Faculdade de Agronomia encontra-se na tabela 1.

Plantio: as sementes foram coletadas no mesmo local de coleta da terra. Após terem sido desinfestadas com hipoclorito de sódio 3% por 15 min, foram escarificadas e colocadas para germinar em placas de Petry com papel filtro úmido. Após 5 dias, já com a radícula emergida, foram transplantadas para as garrafas contendo o substrato de cultivo já descrito. Foram cultivadas 5 plantas por tratamento nos dois experimentos.

Avaliações: o crescimento em altura das plântulas foi acompanhado semanalmente. As avaliações de massa seca foram feitas ao final de cada experimento. Devido à necessidade de se fixarem as raízes laterais para posterior observação da colonização micorrízica, foi medida a massa seca apenas da parte aérea e raiz principal no experimento 1. No experimento 2, foi medida a massa fresca das raízes laterais de todas as plântulas antes da fixação do material, sendo a massa seca das mesmas estimada a partir do conteúdo

de água das raízes laterais de uma planta por tratamento. Este conteúdo de água foi avaliado através da seguinte equação: (massa fresca – massa seca)/massa fresca. Considerou-se, para fins de estimativa, que todas as raízes apresentavam o mesmo conteúdo de água nos tecidos. Esta pressuposição baseou-se no fato de que todas as plântulas foram submetidas ao mesmo regime de irrigação. A secagem da matéria vegetal foi feita em estufa a 80° C por um período de 5 dias.

Análise estatística: a significância estatística da diferença entre médias dos 2 tratamentos foi feita através do teste *t* de Student, utilizando-se um nível de significância de 5%. A análise foi feita no programa gráfico Sigmaplot, versão 3.0.

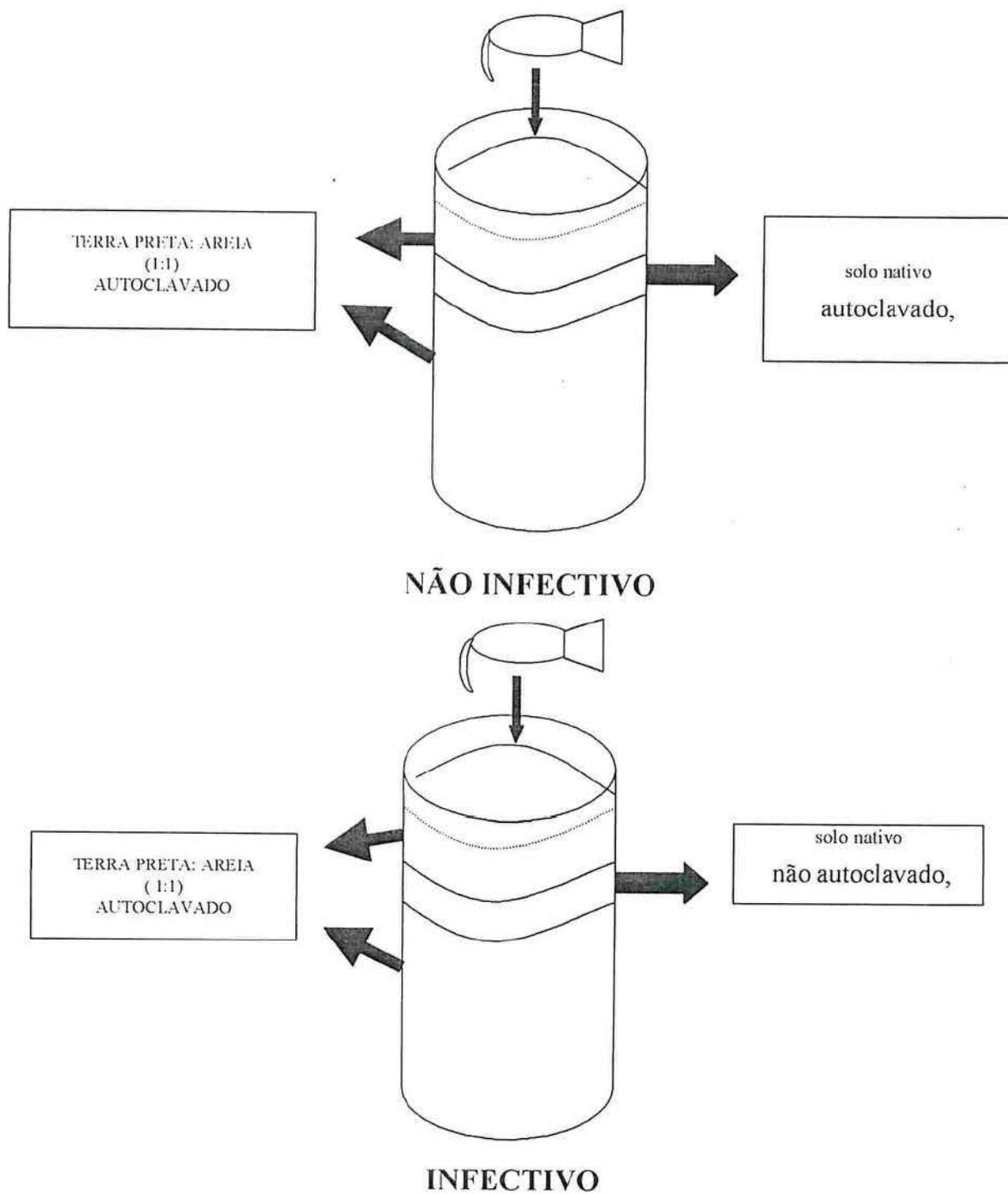


Figura 1 - Desenho esquemático da montagem dos experimentos preliminares.

Tabela 1 - Análise química do substrato de cultivo e camada infectiva utilizados no cultivo de plântulas de *Araucaria angustifolia*

	Argila (%)	pH H ₂ O	P (ppm)	K (ppm)	M.O. (%)	Al _{troc} cmol _c L ⁻¹
Substrato de cultivo ¹	7	7,7	39	75	3,2	0
Camada infectiva ²	22	4,2	4,1	82	5,9	5,6

	Ca _{troc} cmol _c L ⁻¹	Mg _{troc} cmol _c L ⁻¹	Al + H cmol _c L ⁻¹	CTC cmol _c L ⁻¹	% Saturação da CTC	
					Bases	Al
Substrato de cultivo	9,5	0,6	0,8	11,1	93	0
Camada infectiva	2,8	0,5	21,7	25,5	14	21,9

¹ Terra preta comercial + areia (1:1; v:v)

² Solo de mata com *A. angustifolia* da FLONA, São Francisco de Paula, RS

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Técnica para clareamento e coloração de raízes de *Araucaria angustifolia* :

A técnica mais apropriada para raízes de *A. angustifolia* caracterizou-se pelas seguintes etapas:

- > Autoclavagem das raízes em KOH 10% por 20 min.
- > Imersão em H₂O₂ alcalino por 20 min, após resfriamento das amostras, e posterior lavagem com água.
- > Imersão em HCl 1% por 10 min para acidificar o meio.
- > Coloração com Clorazol Black E ou Trypan Blue por 20 min na concentração de 0,05%.

As figuras 2, 3, 4 e 5 ilustram os resultados obtidos pela aplicação desta técnica em raízes de *A. angustifolia*. Essa técnica mostrou-se adequada para raízes jovens. Para raízes mais velhas e lignificadas, estas devem ficar em imersão em KOH a temperatura ambiente, por 24 h ou mais, dependendo da idade da raiz. Esta necessidade de tempos maiores é típico do gênero *Podocarpus* e da família e Araucariaceae, devido à alta deposição de taninos, mesmo em raízes finas (Bevege, 1971). Em *A. cunninghamii*, polifenóis são depositados na endoderme, epiderme e na superfície da raiz, obscurecendo todos os detalhes da infecção cortical por micorrizas. A etapa de imersão em KOH permite a remoção do protoplasma celular, núcleo e polifenóis, para posterior coloração e observação das estruturas micorrízicas (Bevege, 1971).

Foram testadas diferentes concentrações de KOH (2, 5, 10, 12%), mostrando que concentrações maiores do que 10% desestruturam as raízes. Koske & Gemma, (1989) recomendam concentração de KOH a 2%; no entanto, esta concentração não foi eficiente para clarear as raízes de *A. angustifolia*. Também foram testados diferentes tempos de imersão: 15 a 60 min em banho-maria e de 10 a 30 min em autoclave. O banho-maria durante a imersão em KOH, proposto por Phillips and Hayman (1970), foi excluído, pois com o tempo utilizado as raízes desintegravam-se; diminuindo-se o tempo, as raízes não clareavam o suficiente, então foi adotado a autoclavagem proposta por Bevege por 20 min. O hipoclorito de sódio e o peróxido de Hidrogênio são utilizados para reforçar o clareamento das raízes. A imersão de raízes em H₂O₂ após a imersão em KOH, proposta

por Phillips & Hayman (1970), em substituição ao NaClO, também adequou-se a raízes de *A. angustifolia*. O uso deste último resultou em pouca coloração das raízes pelo corante, além de levar à formação de bolhas, dificultando a visualização do fungo. Quanto aos corantes testados, além do Trypan Blue e do Clorazol Black E, foi testado o Cotton Blue. Este corante não foi aprovado, pois corava a raiz excessivamente, dificultando a observação do fungo. Além dos diversos corantes, diferentes tempos de coloração também foram testados: 10 a 40 min. Estes fatos demonstram a grande necessidade de adaptação das técnicas existentes a cada material estudado.

Instituto de Fisiologia da U.F.R.J.
Instituto de Botânica
Departamento de Botânica
BIBLIOTECA



Instituto de Fisiologia da U.F.R.J.
Instituto de Botânica
Departamento de Botânica
BIBLIOTECA

Figura 2 - Vesículas (v) e esporos (e) no córtex radical de *Araucaria angustifolia* (escala 10 μ m) .



Figura 3 - Vesículas no córtex radical de *Araucaria angustifolia* (escala 10 μm).

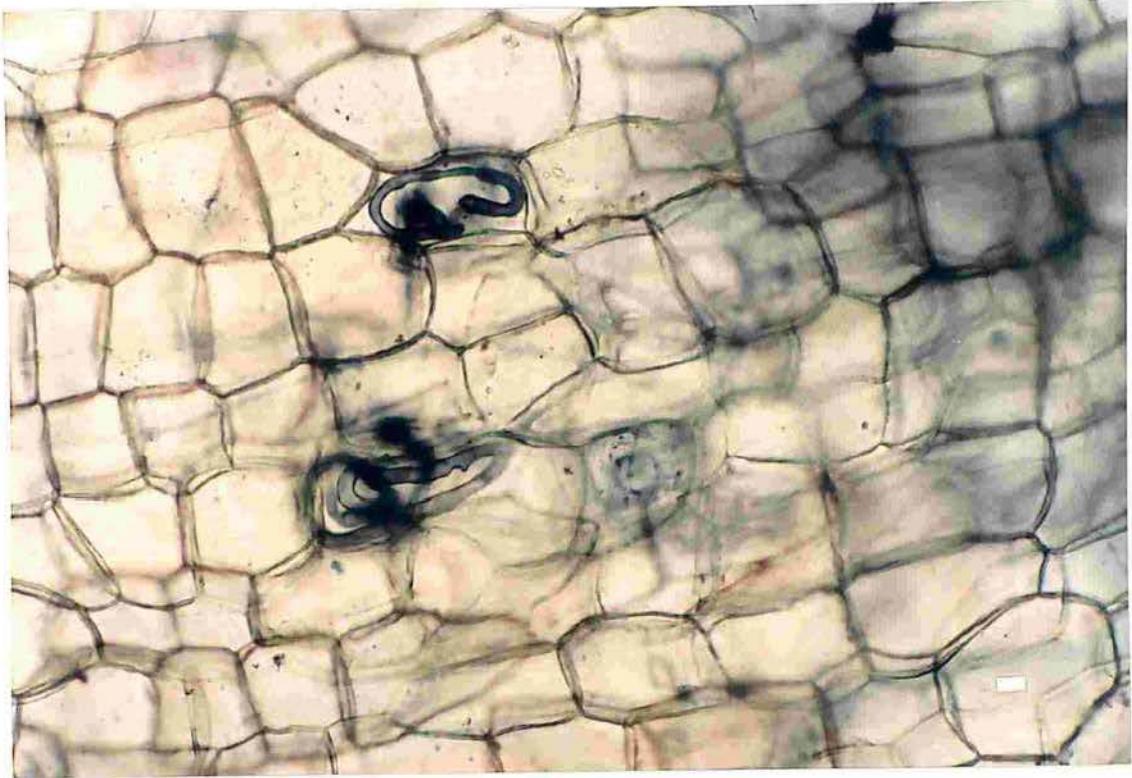


Figura 4 - Hifas no interior de células do córtex radical de *Araucaria angustifolia* (escala 10 μm) .

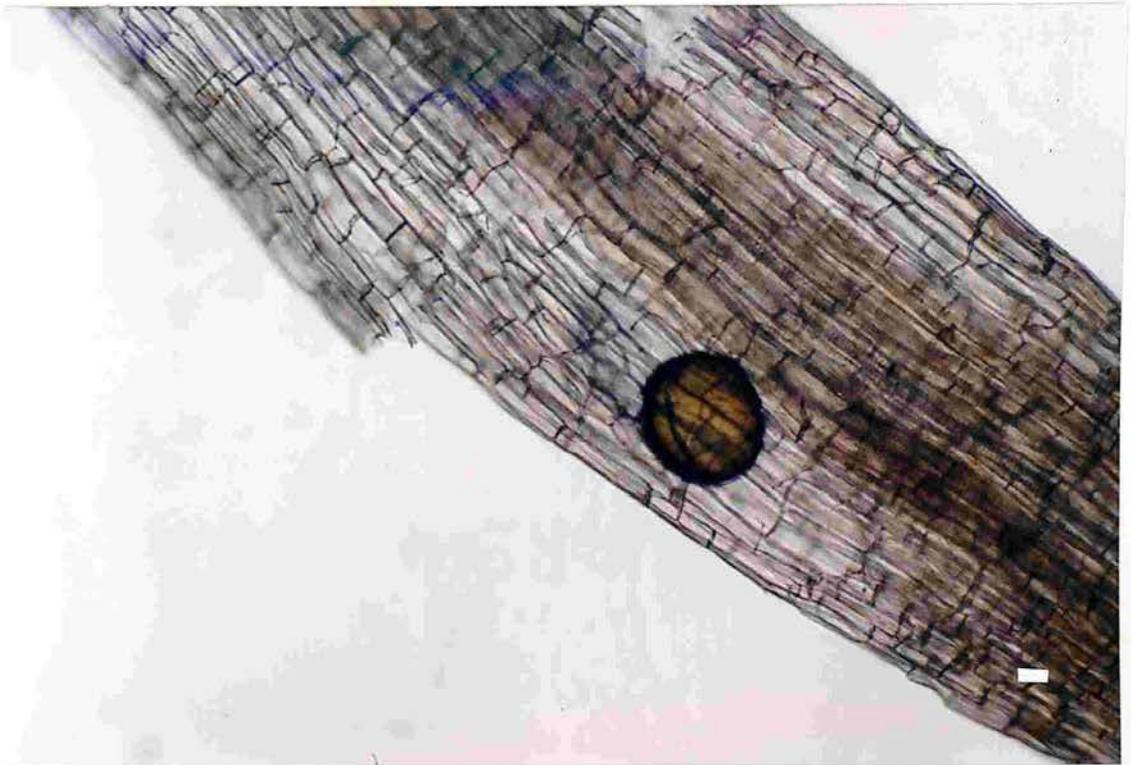


Figura 5 - Esporo de *Entrophospora colombiana* no córtex radical de *Araucaria angustifolia* (escala 10 μm).

Identificação de esporos de micorrizas:

As nove espécies de micorrizas encontradas na rizosfera de *Araucaria angustifolia*, foram:

Acaulospora scrobiculata Trappe (Fig. 6)

Entrophospora colombiana Spain & Schenck (Fig. 7)

Glomus clarum Nicolson & Schenk

Glomus etunicatum Becker & Gerdemann

Glomus fasciculatum Thaxter

Glomus geosporum Nicolson & Gerdemann (Fig. 8)

Glomus macrocarpum Tul. & Tul. (Fig. 9)

Glomus microaggregatum Koske, Gemma & Olexia

Glomus microcarpum Thaxter

Os esporos mais abundantes na amostra coletada foram *G. geosporum* e *G. macrocarpum*. Estes podem ter sido os mais abundantes na época em que foi feita esta coleta (Junho 1998). Isto não significa que estas espécies sejam as mais abundantes ao longo de todo o ano. Por este motivo, estudos sobre a sazonalidade da distribuição dos esporos devem ser feitos para caracterizar a dinâmica temporal dos fungos micorrízicos. Além disto, as referidas espécies são as mais abundantes no local de coleta. A área de estudo deverá ser ampliada para diversas outras áreas de ocorrência de *A. angustifolia*, para uma melhor delimitação da distribuição das espécies de micorrizas. Um outro aspecto interessante a ser estudado futuramente diz respeito à comparação das populações de fungos micorrízicos entre zonas de mata com *Araucaria* e os campos adjacentes.

Das espécies acima listadas, duas delas foram também encontradas na rizosfera de *A. angustifolia*, cultivadas no Jardim Botânico de São Paulo (Bononi *et al.*, 1989): *G. macrocarpum* e *G. fasciculatum*. A comparação das espécies com os esporos encontrados em associação com *A. cunninghami* por Bevege (1971) e Thapar & Khan (1973) ainda não foi possível, pois, nesta época, a taxonomia deste grupo de fungos ainda era muito pouco conhecida, sendo que todos os gêneros da família Endogonaceae eram classificados dentro de *Endogone*, com vários tipos, denominados, simplesmente, de A, B, C, etc.



Figura 6 - Esporo de *Acaulospora scrobiculata* (escala 10 μm).

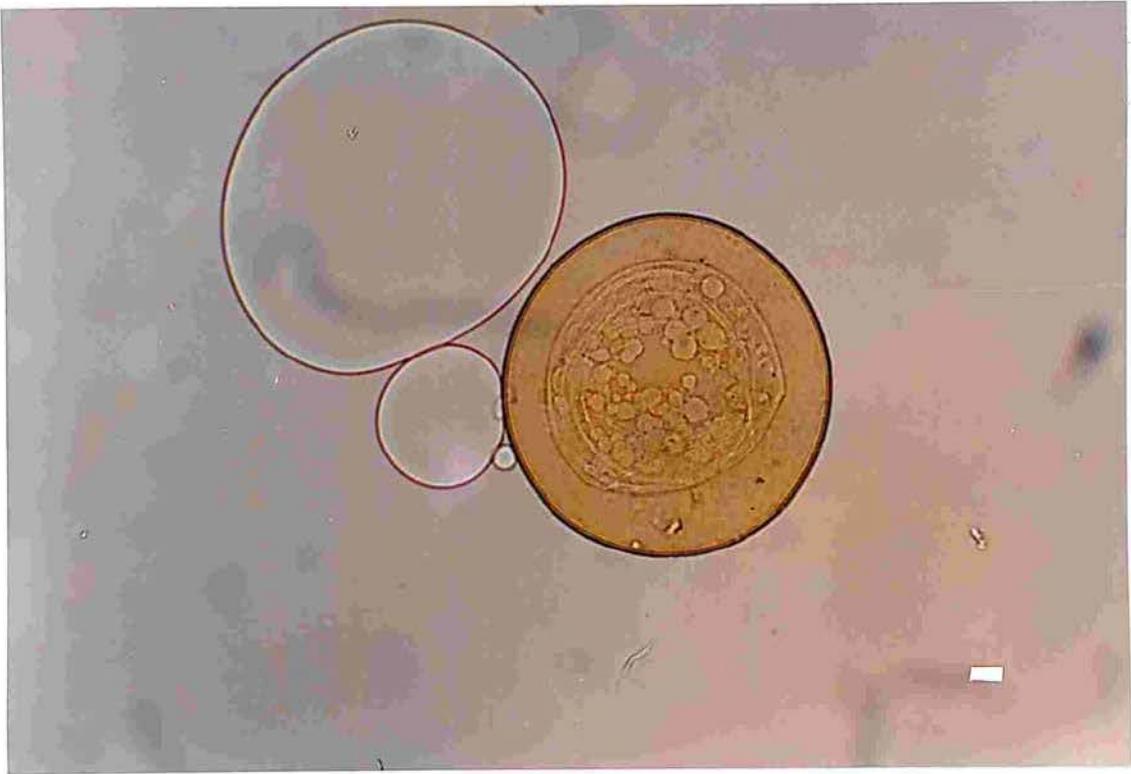


Figura 7 - Esporo de *Entrophospora colombiana* (escala 10 μm).



Figura 8 - Esporo de *Glomus geosporum* (escala 10 μm).



Figura 9 - Esporo de *Glomus macrocarpum* (escala 10 μm).

Experimentos preliminares:

A maioria dos parâmetros de crescimento avaliados não diferiram significativamente entre as plantas controle e as cultivadas em solo infectivo, provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral. Desta forma, serão apontadas e discutidas as tendências observadas. A altura das plantas cultivadas em solo infectivo não diferiu significativamente, mas tendeu a ser maior do que a das plantas controle no experimento 1 (Fig. 10a). No experimento 2 (Fig. 10b), o mesmo não foi observado. O acúmulo de biomassa não diferiu significativamente entre os tratamentos, em ambos os experimentos realizados (Figs. 11a, b). No entanto, a produção de massa seca de raízes laterais, medida apenas no experimento 2, tendeu a ser maior nas plantas cultivadas em solo infectivo do que nas plantas controle (Fig. 11b). Em termos de comprimento da raiz principal, observou-se um maior comprimento nas plantas controle em ambos os experimentos (Figs. 12a, b). A partir da massa seca das raízes laterais e da principal, foi calculada a razão de biomassa entre estas duas frações do sistema radical no experimento 2 (Fig. 13). Esta razão foi maior no tratamento com solo infectivo. Após o desmonte, a análise da presença de colonização micorrízica nas plantas cultivadas em solo infectivo mostrou que esta não havia ocorrido.

Os motivos que levaram aos resultados negativos na colonização radical e aos reduzidos efeitos sobre o crescimento das plântulas, sob presença de solo infectivo, podem ter sido de várias naturezas. Primeiramente, poder-se-ia pensar que a espécie é indiferente à presença de micorrizas. No entanto, sabe-se que as raízes do gênero *Araucaria* reúnem várias características típicas de plantas com alto grau de dependência micorrízica (Hentrick *et al.*, 1990; Manjunath & Habte, 1990), como baixa densidade e comprimento radical, grande diâmetro das raízes e pequena quantidade de pêlos radicais, resultando em, reduzida superfície de contato das raízes com o solo. Também se sabe que, sob condições naturais, ocorre um alto grau de colonização micorrízica na espécie (Milanez e Monteiro, 1950 e observações pessoais). Uma outra possível causa seria a pequena duração do experimento (3 meses), pois sendo a *A. angustifolia* uma espécie de crescimento lento, leva mais tempo para haver colonização. Problema semelhante foi apontado por Muchovej *et al.* (1992), onde o experimento com *Araucaria* teve a duração de 4 meses. Por outro lado, os experimentos realizados por Bevege (1971), com *A. cunninghamii*, tiveram duração de 10 e 23 meses e tiveram resultados positivos. Outro motivo seria a fertilidade do solo. As análises químicas dos substratos utilizados revelaram alto conteúdo de P na mistura de terra

preta e areia (Tabela 1). A planta pode ter “rejeitado” a infecção micorrízica devido à alta disponibilidade de P (Sylvia & Neal, 1990; Cooke *et al.*, 1992; Manjunath & Habte, 1992). Outra questão foi o solo utilizado como camada infectiva. Tratava-se de solo de mata nativa com *Araucaria*, diluído em esporos e não era o inóculo tipicamente utilizado em experimentos com micorrizas: camada de solo, contendo esporos previamente multiplicados em planta anual.

No desmonte do experimento, chamou atenção que, nas plântulas do tratamento da camada infectiva, as raízes laterais concentravam-se nesta camada. Embora esta tendência não tenha sido quantificada, ela pode indicar algum tipo de percepção ao tratamento pela plântula. Uma maior concentração de raízes neste local aumentaria o grau de contato das raízes laterais, tipicamente alvos da colonização, com os esporos disponíveis. Inclusive, houve um nítido, embora não significativo, encurtamento na extensão da raiz principal, resultando numa maior razão entre raízes laterais e principal (Fig. 13). Karabaghli-Dregon *et al.*, 1998 obtiveram efeitos semelhantes com o fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* e sua hospedeira *Picea abies*. Estes autores isolaram o sistema radical dos esporos com o uso de papel celofane e, mesmo impedindo a colonização, detectaram uma maior produção de raízes laterais. Os resultados por eles obtidos foram explicados pela liberação de auxina pelo fungo no substrato, que resultaria numa maior disponibilidade de superfície radical para colonização.

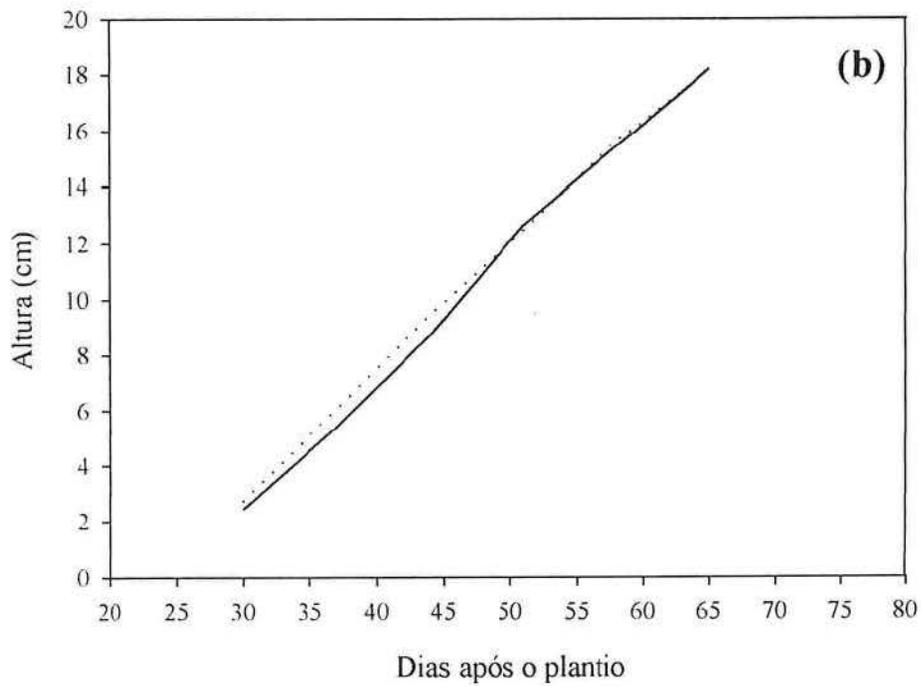
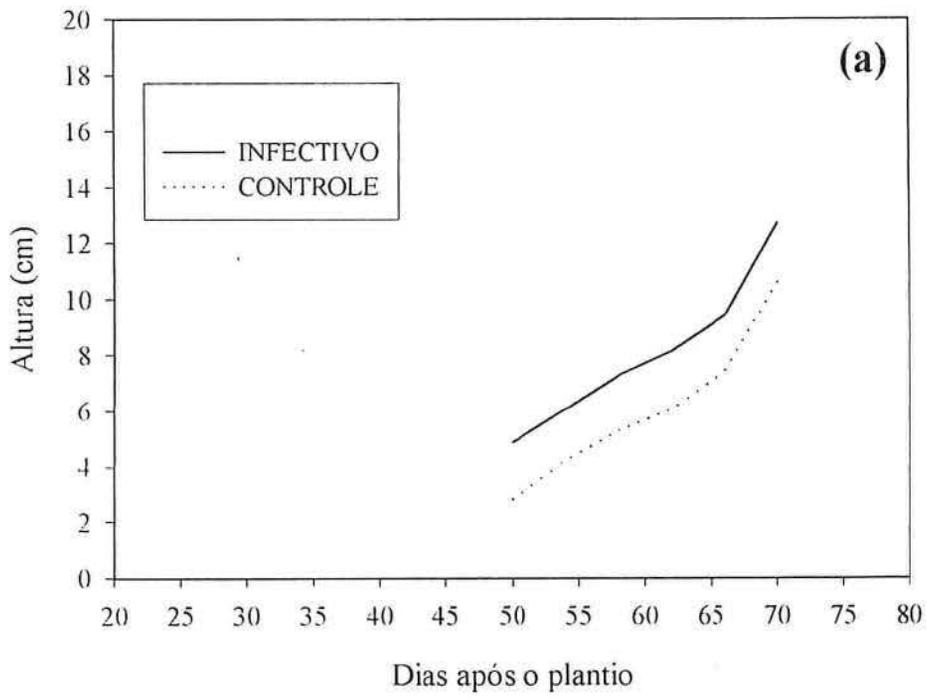


Figura 10 - Crescimento em altura de plântulas de *Araucaria angustifolia*: (a) experimento 1 e (b) experimento 2.

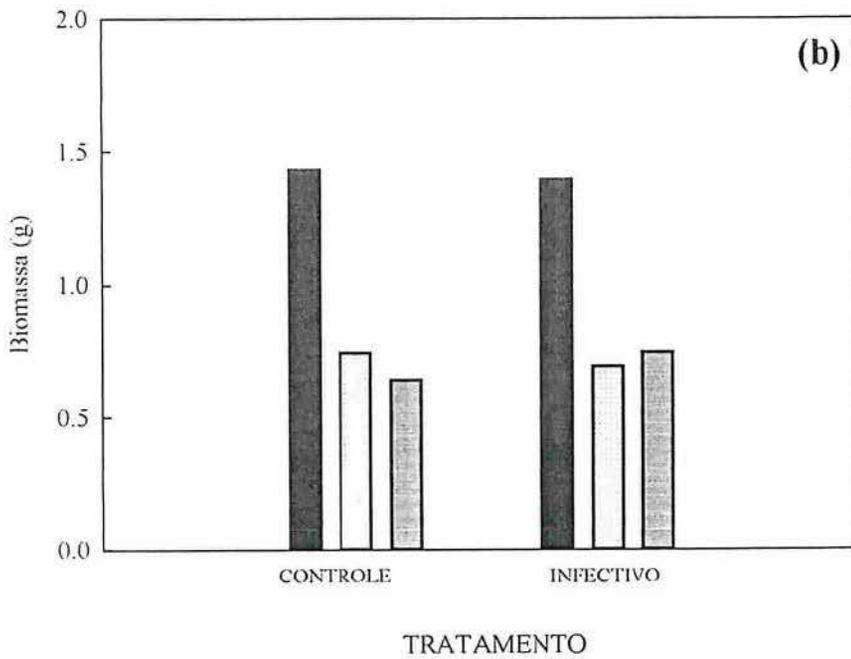
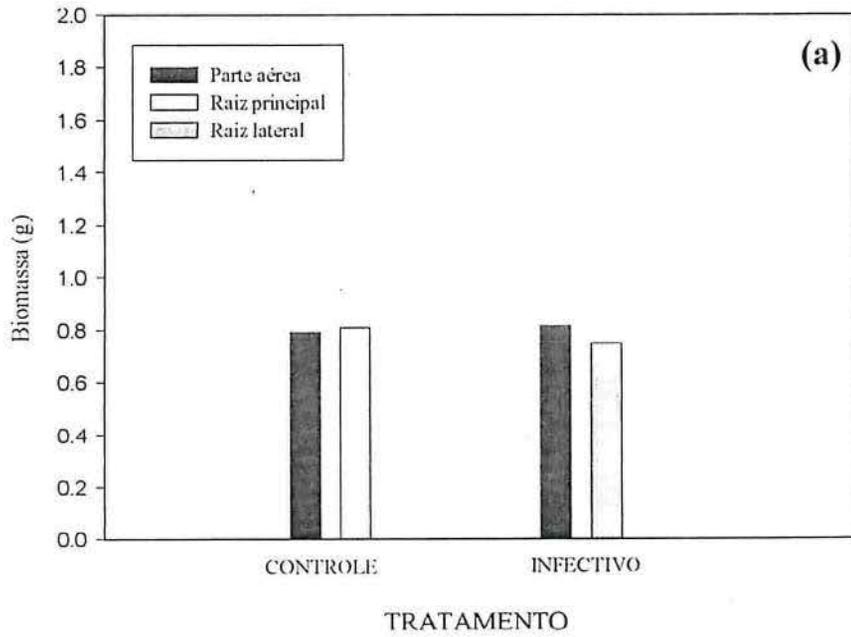


Figura 11 - Acúmulo de biomassa em plântulas de *Araucaria angustifolia*: (a) experimento 1 e (b) experimento 2.

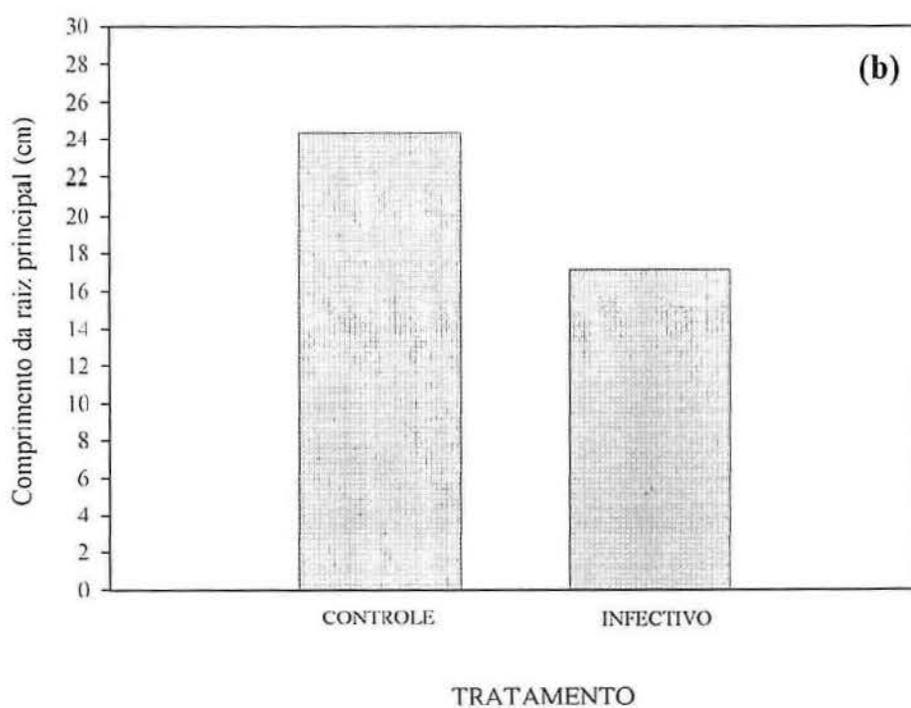
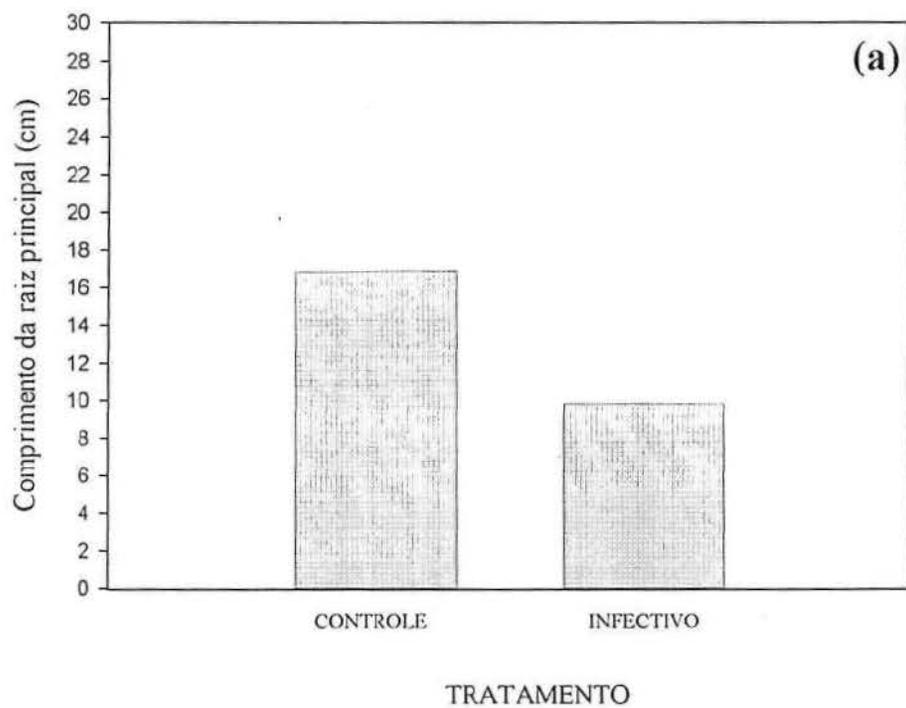


Figura 12 - Comprimento de raiz principal em plântulas de *Araucaria angustifolia*:
(a) experimento 1 e (b) experimento 2.

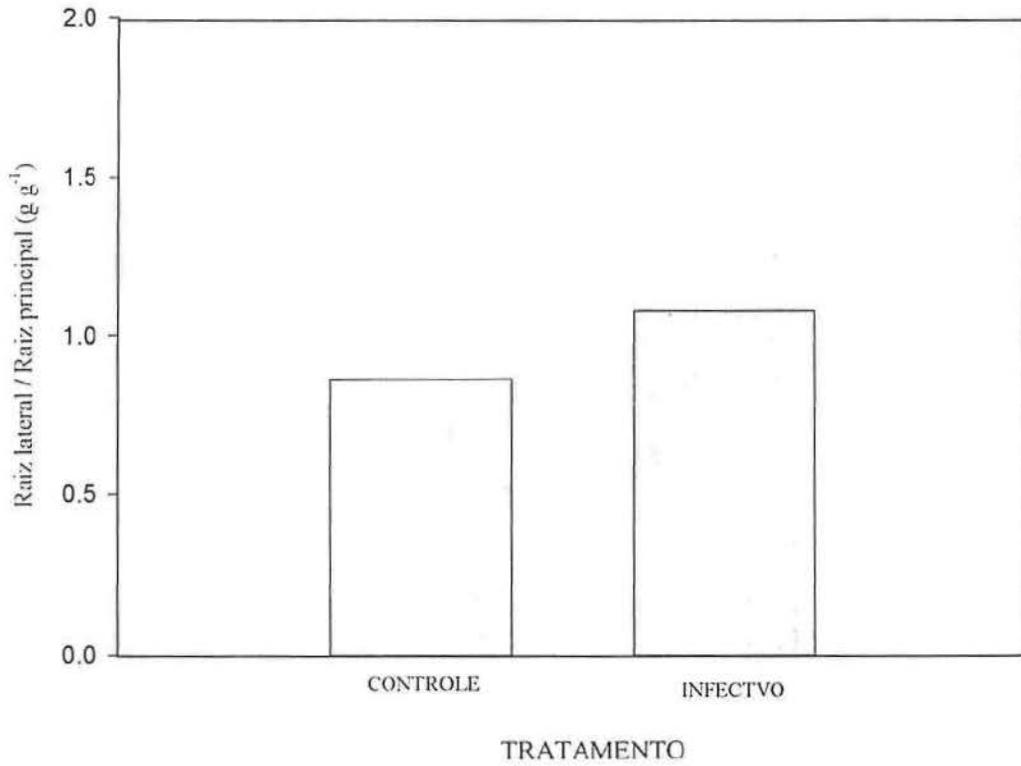


Figura 13 - Razão de biomassa entre raízes laterais e raiz principal em plântulas de *Araucaria angustifolia* (experimento 2).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica para a análise de colonização foi adaptada, com sucesso, para a espécie em questão. Com isso a quantificação e observação de colonização micorrízica em futuros experimentos realizados em casa de vegetação ou a campo poderão ser feitos com sucesso. Com relação à identificação dos esporos, pretende-se, futuramente, ampliar as coletas tanto no espaço quanto no tempo. Desta forma, poder-se-á caracterizar a dinâmica temporal e espacial de espécies micorrízicas associadas ao pinheiro brasileiro.

Estudos futuros visando analisar os efeitos das micorrizas sobre o crescimento da espécie devem ter maior tempo de duração. O substrato de cultivo deverá ser mais próximo do encontrado no ambiente natural da espécie, para permitir extrapolações mais seguras dos resultados obtidos em casa de vegetação para a situação de campo. A camada infectiva deverá ser composta por solo contendo alta densidade de esporos, formando o inóculo propriamente dito. Esta maior densidade poderá ser obtida pela prévia multiplicação dos esporos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, I. J. & FAIRLEY, I. R.; Effects of N fertilisation on populations of fine roots and mycorrhizas in spruce humus. *Plant and Soil*, **71**: 49- 53, (1983).
- ALLEN, M. F.; The ecology of mycorrhizae. Cambridge Studies in Ecology, Cambridge, 180p., (1991).
- AUBREVILLE, A.; A floresta de pinho do Brasil. *Anais Brasileiro de Economia Florestal*, **2**(2): 21-36, (1949).
- BACKES, A.; Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Brasil. *Pesquisas (Botânica)* **39**: 5-39, (1988).
- BERTA, G., FUSCNI, A. & TROTTA, A.; VA Mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environmental and Experimental Botany*, **33**(1): 159-173, (1993).
- BEVEGE, D. I.; A rapid technique for clearing tannins and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone* spp., and some records of infection in Australian plants. *Transactions British Mycological Society*, **51**: 808-811, (1968).
- BEVEGE, D. I.; Vesicular-arbuscular mycorrhizas of *Araucaria*: aspects of their ecology and physiology and role in nitrogen fixation. Doctor Thesis, University of New England, Armidale, (1971).
- BLEDSOE, C. & ZASOSKI, R. J.; Effects of ammonium and nitrate on growth and nitrogen uptake by mycorrhizal Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil*, **71**: 445-454, (1983).
- BONONI, V. L. R., GRANDI, R. A. P., LOPES, S. A. R., RODRIGUES, E. & FONSECA, M. P.; Micorrizas vesículo-arbusculares em *Araucaria angustifolia* (Bert.)O. Ktze. In: *Programa e Resumos... III Reunião Brasileira Sobre Micorrizas*, Piracicaba, p. 42, (1989).
- BROWN, A. M. & BLEDSOE, C. ; Spatial and temporal dynamics of mycorrhizas in *Jaumea carnosa*, a tidal saltmarsh halophyte. *Journal of Ecology*, **84**: 703-715, (1996).
- BRUNDRETT, M., MURASE, G. & KENDRICK, B.; Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Canadian Journal of Botany*, **68**: 551-578, (1989).

- BRUNDRETT, M.; Mycorrhizas in natural ecosystems. In: Begon, M. & Fitter, L. A., *Advances in Ecological Research*, v. **21**, Academic Press, London, p: 171-313, (1991).
- CAREY, P. D., FITTER, A. H. & WATKINSON, A. R.; A field using the fungicide benomyl investigate the effect of mycorrhizal fungi on plant fitness. *Oecologia*, **90**: 550-555, (1992).
- COOKE, M. A., WIDDEN, P. & O'HALLORAN, I.; Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sugar maple (*Acer saccharum*) and effects of base-cation ammendment on vesicle and arbuscule formation. *Canadian Journal of Botany*, **71**: 1421-1426, (1992).
- COLOZZI-FILHO, A. & BALOTA, E. L.; Micorrizas arbusculares. In: Hungria, M. & Araujo, R. S., *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*, EMBRAPA, Brasília, p: 383-418, (1994).
- DAFT, M. J.; The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. *Plant and Soil*, **71**: 331-337, (1983).
- DE LA ROSA, T. M., APHALO, P. J. & LEHTO, T.; Effects of far-red lighth on the growth, mycorrhizas and mineral nutrition of Scots pine seedlings. *Plant and Soil*, **201**: 17-25, (1998).
- EASON, W. R., NEWMAN, E. I., & CHUBA, P. N.; Specificity of interplant cycling of phosphorus: the role of mycorrhiza. *Plant and Soil*, **137**: 267-274, (1991).
- FAURE, S., CLIQUET, J. B., THEPHANY, G. & BOUCAUD, J.; Nitrogen assimilation in *Lolium perene* colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *New Phytologist*, **138**: 411-417, (1998).
- FERREIRA, A.G.; Fitomassa e sobrevivência de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em campo manejado com o fogo. *Caderno de Pesquisa Série Botânica*, Santa Cruz do Sul, **2**: 23-47, (1990).
- FLEMING, L. V.; Succession of mycorrhizal fungi on birch: infection of seedling planted around mature trees. *Plant and Soil*, **71**: 263-267, (1983).
- FRANCIS, R. & READ, D. J.; Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, whith special reference to impacts on plant community structure. *Canadian Journal of Botany*, **73**: S1301-S1309, (1995).
- GERDEMAN, J. W. & NICOLSON, T. H.; Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, **46**(2): 235-244, (1963).

- GUISSOU, T., BÂ, A. M., OUADBA, J. M., GUINKO, S. & DUPONNOIS, R.; Responses of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth, *Tamarindus indica* L. And *Zizyphus mauritiana* Lam. to mycorrhizal fungi in a phosphorus-deficient sandy soil. *Biological Fertility of Soil*, **26**: 194-198, (1998).
- HARLEY, J. L. & SMITH, S. E.; *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, (1983).
- HETRICK, B. A. D., WILSON, G. W. T. & LESLIE, J. F.; Root architecture of warm- and cool-season grasses: relationship to mycorrhizal dependence. *Canadian Journal of Botany*, **69**: 112-118, (1990).
- HOLDEN, J. M., THOMAS, G. W. & JACSON, R. M.; Effect of mycorrhizal inocula on the growth of *Sitka spruce* seedlings in diferent soils. *Plant and Soil*, **71**: 313-317, (1983).
- HUECK, K.; Distribuição e habitat natural do Pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*). *Boletim, 156 Botânica*, 10, 5-24, São Paulo,(1953).
- IKRAM, A., MAHMUD ,M. N.,GHANI, M. N., IBRAHIM, M. T. & ZAINAL A. B.; Field nursery inoculation of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. seedlings rootstock with vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. *Plant and Soil*, **145**: 231-236, (1992).
- ISSAC, S.; *Fungal-plant interactions*, Chapman & Hall, London, (1992).
- JANOS, D. P.; Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology*, **61**(1): 151-162, (1980).
- JONES, M. D., DURALL D. M., & TINKER P. B.; A comparison of arbuscular and ectomycorrhizal *Eucalyptus coccifera*: growth response, phosphorus uptake efficiency and external hyphal production. *New Phytologist*, **140**: 125-134, (1998).
- JOHNSON, N. C., GRAHAM, J. H. & SMITH, F. A.; Functioning of mycorrhizal association along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, **135**: 575-585, (1997).
- KARABAGHLI-DEGRON, C, SOTTA, B., BONNET, M., GAY, G., LE TACON, F.; The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, **140**: 723-733, (1998).

- KHASA, P., FURLAN, V. & FORTIN, J. A.; Response of some tropical plant species to endomycorrhizal fungi under field conditions. *Tropical Agriculture*, **69**(3): 279-283, (1992).
- KLIRONOMOS, J. N., MOUTOGLIS, P., KENDRICK, B. & WIDDEN, P.; A comparison of spatial heterogeneity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in two maple-forest soils. *Canadian Journal of Botany*, **71**: 1472-1480, (1993).
- KLIRONOMOS, J. N., URSIC, M., RILLIG, M. & ALLEN, M. F.; Interspecific differences in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to *Artemisia tridentata* grown under elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist*, **138**: 599-605, (1998).
- KOIDE, R. & ELLIOTT, G.; Cost, benefit and efficiency of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Functional Ecology*, **3**: 249-255, (1989).
- KOIDE, R. T. & LI, M.; Mycorrhizal fungi and the nutrient ecology of three oldfield annual plant species. *Oecologia*, **85**: 403-412, (1991).
- KORMANIK, P. P., BRYAN, W. C. & SCHULTZ, R. C.; Effects of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on sweetgum seedlings from nine mother trees. *Forest Science* **27**(2): 327-335, (1981).
- KORMANIK, P. P., BRYAN, W. C. & SCHULTZ, R. C.; The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on the growth and development of eight hardwood tree species. *Forest Science*, **28**(3): 531-539, (1982).
- KOSCINSKI, M. E.; O pinheiro brasileiro. *ABC do Lavrador Prático*, **4**: 1-32, (1934).
- KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N.; Fungal reaction to plants prior to mycorrhizal formation. In: Allen M. F, *Mycorrhizal Functioning*, Chapman and Hall, New York, (1992).
- MANJUNATH, A. & HABTE, M.; Root morphological characteristics of host species having distinct mycorrhizal dependency. *Canadian Journal of Botany*, **69**: 671-676, (1990).
- MANJUNATH, A. & HABTE, M.; External and Internal P Requirements of Plant Species Differing in Their Mycorrhizal Dependency. *Arid Soil and Rehabilitation*, **6**: 271-284, (1992).
- MARSCHNER, H.; *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, (1986).
- MASON, P. A., WILSON, J. & LAST F. T.; The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil*, **71**: 247-256, (1983).

- MERRYWEATHER, J. & FITTER, A.; The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. *New Phytologist*, **138**: 131-142, (1998).
- MILANEZ, F. R. & MONTEIRO N. H.; Nota prévia sobre a micorriza do pinho do Paraná. *Arquivos do Serviço Florestal*, **4**: 93-97, (1950).
- MORTON, J. B., BENNY, G. L.; Revised classification of Arbuscular Mycorrhizal fungi (Zigomyvetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, **37**: 471-491, (1990).
- MOYERSON, B., ALEXANDER, I. J. & FITTER, A. H.; Phosphorus nutrition of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal tree seedlings from a lowland tropical rain forest in Korup National Park, Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, **14**: 47-61, (1998).
- MULLEN, R. B. & SCHMIDT, S. K.; Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adoneus*: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia*, **94**: 229-234, (1993).
- OLIVEIRA, B.; As Regiões de ocorrência normal da *Araucaria*. *Anuário Brasileiro de Economia Florestal*, **1**(1): 185-199, (1948).
- PEREIRA, E. G., SIQUEIRA, J. O., CURI, N., MOREIRA, M. S. & PURCINO, A. A. C.; Efeito da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **8**(1): 59-65, (1996).
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S.; Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*, **66**: 1255-1259, (1970).
- POPE, P. E., CHANEY, W. R., RHODES, J. D. & WOODHEAD, S. H.; The mycorrhizal dependency of four hardwood tree species. *Canadian Journal of Botany*, **61**: 412-417, (1982).
- RAMBO, B.; O elemento andino no pinhal Riograndense. *Anais Botânicos*, **3**: 7-39, (1951).
- REITZ, R., KLEIN, R. M. & REIS, A.; *Projeto Madeira do Rio Grande do Sul*. SUDESUL, Governo do Estado do Rio Grande do Sul e Herbário Barbosa Rodrigues, (1988).
- REVEES, M.; The role of VAM fungi in nitrogen dynamics in maize-bean intercrops. *Plant and Soil*, **144**: 85-92, (1992).

- SANDERS, I. R.; Temporal infectivity and specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. *Oecologia*, **93**: 349-355, (1993).
- SCHENCK, N. C.; *Methods and principles of mycorrhizal research*. APS PRESS, Minnesota, (1982).
- SIEVERDING, E.; *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, (1991).
- SOUSA, M. M. S. R., PACOVSKY, R. S., CARDOSO, E. J. B. N., Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em *Araucaria angustifolia*. In: *Resumos... FERTBIO*, Caxambu, Minas Gerais, p: 605, (1998).
- STADDON, P. L., GRAVES, J. D. & FITTER A. H.; Effects of enhanced atmospheric CO₂ on mycorrhizal colonization by *Glomus mosseae* in *Plantago lanceolata* and *Trifolium repens*. *New Phytologist*, **139**: 571-580, (1998).
- STANLEY, M. R., KOIDE, R. T. & SHUMWAY, L. D.; Mycorrhizal symbiosis increases growth, reproduction and recruitment of *Abutilon theophrasti* Medic. in the field. *Oecologia*, **94**: 30-35, (1993).
- SYLVIA, D. M. & NEAL, L. H.; Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. *New Phytologist*, **115**: 303-310, (1990).
- THAPAR, H.S. & KHAN, S.N.; Studies on endomycorrhiza in some forest species. *Proceedings of the Indian Natural Science Academy*, **39**: 687-694, (1973)
- TISSERANT, B., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V.; Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. *Canadian Journal of Botany*, **74**: 1947-1955, (1996).
- TRUFFEM, S. F. B., BONONI, V. L.; Micorrizas vesículo-arbusculares de culturas introduzidas em áreas de cerrado. *Rickia*, **12**: 165-187, (1985).
- TRUFFEM, S. F. B.; Aspectos ecológicos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da mata tropical úmida da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, **4**(2): 31-45, (1991).
- TRUFFEM, S. F. B., MALATINSZKY, S. M. M., OTOMA, H. S.; Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de plantas do litoral arenoso do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, **8**(2): 219-230, (1994).

- WEST, H. M., FITTER, A. H. & WATKINSON, A. R.; Response of *Vulpia ciliata* ssp. *Ambigua* to removal of mycorrhizal infection and to phosphate application under natural conditions. *Journal of Ecology*. **81**: 351-358, (1993).
- WRIGHT, D. P., READ, D. J. & SCHOLES, J. D.; Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, **21**: 881-891, (1998).
- WRIGHT, D. P., SCHOLES, J. D. & READ, D. J.; Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, **21**: 209-216, (1998).

UNIVERSITY OF
NORTHUMBRIA
LIBRARY
1998