



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

CRESCIMENTO DE *Lunularia cruciata*
ASSOCIADA AO FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR *Glomus proliferum* IN VITRO

Discente

JACSON BATISTA FIGUEIREDO

Orientador

RICARDO LUÍS LOURO BERBARA

Seropédica, Rio de Janeiro.

Janeiro – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

CRESCIMENTO DE *Lunularia cruciata*
ASSOCIADA AO FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR *Glomus proliferum* IN VITRO

Discente

JACSON BATISTA FIGUEIREDO

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Sob a orientação do professor
RICARDO LUÍS LOURO BERBARA

Seropédica, Rio de Janeiro.

Janeiro – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

CRESCIMENTO DE *Lunularia cruciata*
ASSOCIADA AO FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR *Glomus proliferum* IN VITRO

Aprovada em 08 de Janeiro de 2010

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luís Louro Berbara
(UFRRJ /IA/ Departamento de Solos)

Titular: Prof. Dr. Leandro Azevedo Santos
(UFRRJ /IA/ Departamento de Solos)

Titular: Dr^a. Adriana França Figueira
(UFRRJ /IA/ Departamento de Solos)

DEDICATÓRIA

Esta monografia é dedicada em especial a minha amada mãe Badia, irmã Jurani e tia Leila, que acreditaram e todo o possível fizeram, sem hesitar, para que eu chegasse até aqui.

Aos meus dois amores Rafael e Franciele, por serem a razão da minha vida.

A minha avó Carmosina, pelo exemplo de coragem.

E a todos os meus irmãos, sobrinhos, familiares e amigos, que me apoiaram nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiro ao grande e todo poderoso bom Deus, pela vida e saúde. Muito obrigado!

A toda minha família e em especial a minha mãe Maria Batista Figueiredo, meus amores Rafael Lopes Figueiredo e Franciele Lopes Ribeiro, meus irmãos Juliana, Jurani, Janine, Janderson, Marcos Ezequiel, Denis Renan, meus sobrinhos, meus tios e meus primos; pela confiança em mim depositada, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas alegrias sempre presentes nos momentos de reencontro e pelo incentivo de sempre na busca pelos meus objetivos. Muito obrigado!

Ao professor, orientador, Ricardo Luis Louro Berbara, pelo estágio oferecido no laboratório de Biologia do Solo, pela bolsa no meu momento de maior necessidade, pela orientação desta monografia, pela qualidade das suas aulas, pelo exemplo de pesquisador aplicativo e por todo o apoio, informação e condições disponíveis para ampliação do meu conhecimento. Muito obrigado!

A minha segunda família, moradora do alojamento M3/316: ao Luiz, pelo exemplo como pessoa, pelos muitos momentos de alegria e pela amizade incondicional em todas as situações desse percurso; ao Carlos, pela amizade e pelo grande exemplo de pessoa aplicada; ao Iran, pela presença de liderança, pelo bom convívio, pela boa amizade e por minimizar o tédio dos nossos finais de semanas com seus almoços e sessões de filmes; ao Rivaly, pela amizade e bom convívio; ao Charles, pela amizade e bom convívio, pelas muitas ajudas intelectuais e pelo exemplo de simplicidade e disciplina; ao Fabio, pelo grande exemplo de pessoa, pela grande amizade e pela simplicidade; ao Pedro, pela descontração de muitos momentos de tédio, pela simplicidade e pela boa amizade; ao Hermes, Jander e Elias, pela grande amizade, pelas muitas alegrias proporcionadas, pela disposição a ajudar sempre, pelo exemplo de aplicação e pela simplicidade de cada um; ao Charles e o Elias por emprestarem muitas vezes os seus computadores para escrever esta monografia. Muito obrigado!

A Adriana F. Figueira, a Natália Zatorre e o Wallace Lima, por me receberem tão bem no laboratório de biologia do solo, pela grande atenção sempre disponível, pelo bom coração e por me ajudar em muitos momentos difíceis. Muito obrigado!

A Camila Nobre, que a pouco chegou, mas com seu jeito simples e sincero conquistou o respeito e carinho de todos. Por me ajudar nesta monografia e a entender muitas coisas. Muito obrigado!

A todos os pós-graduandos e estagiários, que se encontram ou já passaram no laboratório de biologia do solo: Adriana, Natália, Wallace, Pedro, Eduardo Mondino, Camila Nobre, Sael, Deladier, Jurema, Rafael Lustrino, Hudson, Sérgio, Wagner, Camila, Nardele, Nemilson, Renata, Beto, Thiago, Jamile, Wellington, Michel, Hanna; com os quais muito aprendi. Muito obrigado!

Ao Carlos Buch e Leandro Azevedo, pelas explicações químicas e a todos os estagiários e pós-graduandos do laboratório de nutrição mineral de plantas, pela boa recepção. Muito obrigado!

A todos os meus amigos e colegas de graduação da turma 2004-II de Engenharia Florestal, pela atenção, respeito e bom convívio. Muito obrigado!

A todos os professores do instituto de Floresta, por todos os ensinamentos e informações que contribuíram para minha formação. Muito obrigado!

RESUMO

A capacidade das plantas de estabelecer relações mutualistas com certos grupos de fungos do solo é um fenômeno generalizado na natureza, conhecido como micorrizas. Embora tenha surgido há mais de 400 milhões de anos, quando as plantas iniciaram o processo de colonização do habitat terrestre, esse fenômeno só foi reconhecido e tratado cientificamente em meados do século XIX, quando foram publicados os primeiros relatos detalhados da associação entre células radiculares e micélios fúngicos. Tais descobertas, entretanto, geraram muita polêmica com relação à natureza da associação, se mutualista ou parasítica. Isso estimulou estudos complementares que culminaram com as evidências experimentais, necessárias para consolidação do caráter mutualista da simbiose, porém a maioria desses estudos se deu com plantas “vasculares”. Recentemente, ao final de um trabalho com briófitas hepáticas, “planta avascular”, associada com fungo micorrízico arbuscular, surgiu uma especulação sobre a possibilidade da relação hepática-fungo micorrízico arbuscular, ao contrário de simbiose mutualística, ser parasita-hospedeiro, onde o fungo não estaria aumentando a captação de nutrientes para a briófitas, e sim estaria drenando uma quantidade de foto-assimilados significativamente prejudicial ao crescimento ótimo desta. Com esse fato este trabalho teve como objetivo, o monitoramento, por meio de imagens digitais, da associação simbiótica estabelecida entre a espécie de briófitas hepáticas *Lunularia cruciata* e o fungo micorrízico arbuscular *Glomus proliferum* para avaliar o grau mutualístico e a influência do fungo no crescimento (cm²) da briófitas, estando os dois associados em um sistema *in vitro* de placa de petri.

Ao final de 106 dias, os resultados de 5 capturas de imagens para os dois tratamentos apresentaram diferença estatística “não significativa” ao teste de Tukey a 5% até a quarta captura (86 dias após a montagem do experimento) e “significativa” na quinta captura (106 dias após a montagem do experimento). Sendo o crescimento das briófitas axênicas maior que o das briófitas associadas ao fungo.

Palavras chave: mutualismo, parasitismo, briófitas hepáticas, cultivo axênico

ABSTRACT

The ability of plants to establish mutualistic relationships with certain groups of soil fungi is a widespread phenomenon in nature, known as mycorrhizae. While there was more than 400 million years, when plants began the process of colonization of the terrestrial habitat, this phenomenon was not recognized and treated scientifically in the mid-nineteenth century, when they published the first detailed accounts of the association between root cells and fungal mycelia. These findings, however, generated much controversy regarding the nature of the association, whether mutual or parasitic. This prompted further studies that culminated with the experimental evidence necessary to consolidate the mutual nature of the symbiosis, but most of these studies took place with plants "vascular". Recently, at the end of a job with hepatic bryophytes, "plan avascular associated with arbuscular mycorrhizal fungi, speculation has arisen about the possibility of liver relationship-arbuscular mycorrhizal fungus, in contrast to mutualistic symbiosis be parasite-host, where the fungus would not be increasing the uptake of nutrients to the bryophytes, but would be draining a quantity of photo-assimilated significantly detrimental to the growth of this great. With this fact this work aimed to monitoring by means of digital images of the symbiotic association is established between the species of bryophytes liver lunate cruciata and arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus proliferum* to assess the extent and influence of mutualistic fungus growth (cm²) of bryophytes, and the two members in an in vitro system of petri dish.

At the end of 106 days, the results of 5 snapshots for both treatments were statistically "insignificant" to the Tukey test at 5% until the fourth arrest (86 days after the experimental design) and "significant" in the fifth catch (106 days after the assembly of the experiment). As the growth of bryophytes axenic greater than that of bryophytes associated with the fungus.

Keywords: mutualism, parasitism, bryophytes liver axenic

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA).....	2
2.2. Briófitas.....	7
2.3. Meios nutritivos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Produção de meio de cultura (SRV).....	13
3.2. Origem e multiplicação da Briófito <i>Lunularia cruciata in vitro</i>	16
3.3. Multiplicação de FMA em banco de germoplasma <i>in vitro</i>	17
3.4. Montagem do experimento.....	20
3.5. Coleta e processamento dos dados.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Análise da metodologia.....	24
4.2. Análise do crescimento da briófito.....	25
5. CONCLUSÕES.....	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Soluções estoque e produção de meio de cultura em Becker sobre agitador magnético.....	14
Figura 02: Calibração do pH.....	15
Figura 03: Erlenmeyers com meio de cultura e autoclave.....	15
Figura 04: Câmara de fluxo laminar estéril com placas petri distribuídas.....	16
Figura 05: <i>Lunularia cruciata</i> na natureza e suas gemas (propágulo sexual).....	16
Figura 06: Ramificação estrutural das hifas de <i>Glomus proliferum</i> (DALPÉ & DECLERCK.). Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).....	18
Figura 07: Aglomerado de esporos de <i>Glomus proliferum</i> (DALPÉ & DECLERCK.), contendo várias centenas de indivíduos. Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).....	18
Figura 08: Imagem mostrando momento em que uma hifa de <i>Glomus proliferum</i> (DALPÉ & DECLERCK.) se dividiu em duas e novamente se fundiu. Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).....	18
Figura 09: Esporo jovem de <i>Glomus proliferum</i> (DALPÉ & DECLERCK.), com proeminência do tubo germinativo (sh). Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).....	19
Figura 10: Visualização da parede do esporo de <i>Glomus proliferum</i> (DALPÉ & DECLERCK.), por microscopia eletrônica de transmissão. (L1, L2, L3, L4), são camadas compactadas. Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).....	19
Figura 11: Briófita cultivada in vitro (Axênica).....	20
Figura 12: Gemas de <i>L. cruciata</i> antes da montagem do experimento e gemas no dia da montagem do experimento.....	21
Figura 13: Cultura de <i>Lunularia cruciata</i> com <i>Glomus proliferum</i> depois de 100 dias em meio SRV.....	21
Figura 14: Tratamento cultivo monoxênico.....	22
Figura 15: Suporte para fotos perpendiculares a uma altura constante.....	23

Figura 16: 1) Imagem digitalizada de placa Petri com <i>L. cruciata</i> e etiquetas de tamanho conhecido. 2) Imagem convertida para o formato bitmap (BMP) monocromático. 3) Recorte da imagem utilizada para o processamento.....	23
Figura 17: Editoração das imagens no SIARCS 3.0.....	24
Figura 18: Teste de normalidade (T de Student).....	25
Figura 19: Análises de discrepância.....	25
Figura 20: Imagens do crescimento axênico (placa 1A) e monoxênico (placa 20 A) 30, 40, 55, 86 e 106 dias após a montagem do experimento.....	27
Figura 21: Crescimento da briófitas (Cm ²) nos dois tratamentos.....	28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Classificação filogenética atual do filo Glomeromycota e a distribuição das espécies segundo ordem, família e gênero. Fonte: de Souza et al., (2007).....6
- Tabela 02:** Reagentes que compõem o meio semi-sólido (SRV).....13
- Tabela 03:** Dados de crescimento da briófitas analisados em teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....27

1. INTRODUÇÃO

A simbiose micorrízica arbuscular é a mais ancestral dentre todos os tipos de micorrizas conhecidas (Berbara et al., 2006). Evidências fósseis indicam que as primeiras plantas terrestres já estavam colonizadas por fungos que apresentavam estruturas miceliais e esporos similares aos dos atuais fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Redecker et al., 2000b). Especula-se, portanto, que esses fungos foram fundamentais para a conquista de ambientes terrestres pelas plantas (Simon et al., 1993b; Simon, 1996) lembrando que suas raízes eram desprovidas de pêlos radiculares ou ramificações. Eram estruturas similares a rizóides, sem tecidos vasculares, semelhantes aos encontrados em briófitas e hepáticas (Malloch et al., 1980; Raven & Edwards, 2001). Inúmeros trabalhos já confirmaram os benefícios dessa associação simbiótica, em vários aspectos, para as “plantas vasculares”, porém observações recentes realizadas por Fonseca e Berbara em 2009 com a briófitas hepática *Lunularia cruciata* (planta não-vascular) colonizada por *Glomus proliferum*, apresentou nas plantas associadas uma redução de biomassa quando comparada com plantas axênicas (não associadas), sugerindo um possível dreno de recursos para o fungo e conseqüente redução de nutrientes necessários para o ótimo crescimento da planta. Colocando em questão a possibilidade de que, em certas circunstâncias, a relação entre *L. cruciata* e *G. proliferum* tenha características de parasitismo e não de simbiose mutualística, abrindo novas perspectivas para futuros estudos na determinação da natureza da relação hepática-fungo arbuscular (Fonseca et al., 2009).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

“Plantas não têm raízes, elas têm micorrizas”. Essa sentença foi proferida décadas atrás por J.L. Harley com o intuito de alertar ecologistas e biólogos para o fato de que, em condições naturais, a maioria das espécies de plantas se encontra associada a determinados fungos de solo numa simbiose mutualística do tipo micorrízico, do grego mico [fungo] e riza [raiz]. Indo além das relações funcionais que se estabelecem entre plantas e esses fungos (van der Heijden et al., 1998a,b) enfatizaram que “associações micorrízicas devem sempre ser consideradas quando se busca entender a ecologia e evolução de plantas, suas comunidades e ecossistemas”. Uma vez que eles, sem exceção, são simbiontes obrigatórios e dependem da simbiose com plantas compatíveis para sua multiplicação (Berbara et al., 2006).

Essa consideração está baseada em experimentos que demonstram o papel dessa simbiose no resultado da competição e sucessão de plantas, bem como na hipótese de que a evolução de plantas terrestres tem sido dependente da presença dessa simbiose (van der Heijden et al., 1998a,b; Kiers et al., 2000; Klironomos et al., 2000; Cairney, 2000; Brundrett, 2002; Allen et al., 2003).

Esta simbiose se caracteriza pela penetração inter e intracelular das células do córtex radicular e formação de estruturas intracelulares denominadas arbúsculos (Douds & Millner, 1999). Ela é encontrada em todas as latitudes e em quase todos os ecossistemas terrestres (Siqueira & Franco, 1988), desde que, com existência de plantas. Wang & Qiu (2006) publicaram um levantamento da 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 ancestral (de Souza et al., 2007).

A maioria das angiospermas e muitas gimnospermas pteridófitas e briófitas formam associação com FMA (Smith & Read, 1997). Com tudo isso, é provável que eles sejam os fungos de solo mais abundantes na maioria dos ecossistemas tropicais, principalmente nos sistemas agrícolas, onde eles podem representar quase 50 % da

biomassa microbiana (Olsson et al., 1999). Essa associação é simbiótica, pelo fato de os organismos co-existirem em um mesmo ambiente físico, raiz e solo, e mutualística, porque, em geral, ambos os simbioses se beneficiam da associação. Ela é considerada como mutualista nutricional, em que a planta supre o fungo com energia para crescimento e manutenção via produtos fotossintéticos, enquanto o fungo provê a planta com nutrientes e água. Nesse sentido, essa simbiose amplia a capacidade de absorção de nutrientes por parte do simbionte autotrófico e, conseqüentemente, a sua competitividade interespecífica e produtividade (Berbara et al., 2006).

A contribuição dos fungos MA para a nutrição fosfatada de plantas está amplamente aceita e documentada na literatura nacional e internacional. No entanto, os serviços prestados pelo fungo vão muito além da nutrição de plantas individualizadas, pois eles também contribuem para a estruturação de comunidades vegetais (Berbara et al., 2006). O micélio de fungos MA freqüentemente interconecta o sistema radicular de plantas vizinhas da mesma espécie ou de espécies distintas. Nesse sentido, a maioria das plantas está interligada por uma rede de hifas micorrízicas comum, durante alguma fase do seu ciclo de vida (Newman, 1988). Como decorrência dessa imensa quantidade de hifas produzidas por FMAs, existe significativo impacto sobre a estruturação e estabilidade de agregados em solos (Jastrow et al., 1998), não só pela ação física do micélio fúngico, mas também através da ação de uma glicoproteína denominada glomalina que é produzida por esses fungos (Wright & Upadhyaya, 1996, 1998; Rillig & Mummey, 2006).

Os FMAs contribuem também para a acumulação de estoques de carbono (Rillig et al., 2001) e biomassa microbiana em solos (Olsson & Wilhelmsson, 2000). Como conseqüência, existem evidências de que FMAs colaboram no aumento do dreno de C da atmosfera, variável importante e pouco estudada diante dos processos de mudanças climáticas (Leake et al., 2004).

Estudos diversos usando C^{14} têm demonstrado que fotossintetatos são deslocados da parte aérea às hifas poucas horas após este elemento ter sido marcado (Bucking & Shachar-Hill, 2005). Esses resultados confirmam que FMAs são drenos importantes de C da planta, podendo impor perdas de até 20 % do C fixado pelo simbionte autotrófico. Como resposta da planta ao dreno imposto pelo sistema micorrízico, há aumentos significativos de sua taxa fotossintética, ocasionando

aumentos no potencial da produtividade primária e dreno de C da atmosfera (Jakobsen et al., 2002).

Estima-se que, globalmente, FMAs possam ser responsáveis pelo dreno anual de cinco bilhões de toneladas (5 Gt) de C aos solos (Bago et al., 2000). As consequências desse fenômeno são ainda desconhecidas, seja nas propriedades do solo, seja em escala global, nas relações referentes às mudanças globais e ao papel desta simbiose no seqüestro de C da atmosfera. Pode-se especular sobre a necessidade de ampliar as linhas de investigação das MAs para além de seus aspectos nutricionais. Pois essas características fazem com que a simbiose micorrízica arbuscular tenha potencial biotecnológico e ecológico imenso ainda a ser explorado (Berbara et al., 2006).

A taxonomia dos fungos micorrízicos vem sendo alterada significativamente. Gerdemann & Trappe (1974) propuseram a primeira classificação dos fungos MA. Esses pesquisadores utilizaram características morfológicas para agrupá-los na ordem Endogonales (Zigomicota), gênero *Endogone*. Posteriormente, Morton & Benny (1990) utilizaram cladística para analisar características morfológicas e formular uma nova classificação, em que os fungos MA foram reclassificados em uma nova ordem, chamada Glomales, composta por duas subordens: Glominea e Gigasporineae. Esta ordem excluía o gênero *Endogone*, que forma ectomicorrizas. No entanto, o filo Zigomicota não refletia adequadamente a filogenia dos fungos MA. Em 1998, Cavalier-Smith (1998) criou a classe Glomeromicetos para englobar os fungos MA dentro do filo Zigomicota. Morton (1999) lançou uma hipótese segundo a qual os fungos MA teriam uma origem polifilética, contrariando evidências moleculares, que indicavam claramente que os fungos MA constituíam um grupo monofilético e que Acaulosporaceae era filogeneticamente próxima da família Gigasporaceae e não de Glomeraceae (Simon et al., 1993a; Simon, 1996).

Com base na análise filogenética de seqüência de DNA as mudanças continuaram ainda por muitos anos: Morton & Redecker (2001); Schwarzott et al. (2001); Schüßler et al. (2001); Helgason et al. (2003); Corradi et al. (2004); Souza et al. (2005b). Atualmente, o projeto AFToL (“Assembling the Fungal Tree of Life” - Lutzoni et al., 2004) está seqüenciando um conjunto de genes cromossomais e mitocondriais de representantes de todos os grupos de fungos conhecidos, visando aprimorar a filogenia dos fungos. No entanto, pouco tem sido feito para a diferenciação de espécies (Berbara et al., 2006).

A sistemática microbiana tem evoluído de forma espantosa nos últimos anos. Essa evolução vem sendo impulsionada pelos avanços no desenvolvimento de novas técnicas nos campos da química, biologia molecular, genômica, proteômica, microscopia e informática, bem como pela implementação e/ou melhoria de bancos de germoplasma. A sistemática dos glomeromicetos vem seguindo essa tendência e vários avanços têm sido obtidos nos últimos anos (de Souza et al., 2007).

A tabela 01 traz a classificação filogenética atual do filo Glomeromycota e a distribuição das espécies segundo ordem, família e gênero.

Tabela 01: Classificação filogenética atual do filo Glomeromycota e a distribuição das espécies segundo ordem, família e gênero.

Fonte: de Souza et al., (2007).

Classificação filogenética atual dos Glomeromycota segundo Ordens, Famílias e Gêneros, número de espécies descritas por gênero e presença de espécies com a forma glomóide no gênero, formação de vesículas (V), células auxiliares (CA) e modo de germinação.

Ordem	Família	Gênero	Número de espécie ¹	Esporos com forma glomóide	V	CA	Germinação
Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>	1	+	-	-	???
		<i>Intraspora</i> ¹	1	-	raras?	-	???
	Appendicisporaceae	<i>Appendicispora</i>	7	-	+	-	através do apêndice
	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i> ²	1	+	-	-	???
Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	33	-	+	-	através da parede
		<i>Kuklospora</i> ⁴	2	-	+	-	através da parede
	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>	1	+	+	-	???
	Entrophosporaceae ⁴	<i>Entrophospora</i>	2	-	???	-	???
	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>	8	-	-	+	através da parede
		<i>Scutellospora</i>	33	-	-	+	através da parede
	Pacisporaceae ⁵	<i>Pacispora</i>	7	+	+	+	através da parede
Glomerales	Glomeraceae ⁶	<i>Glomus</i>	107	+	+	-	através da hifa de sustentação
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>	2	+	-	-	???
Total	4	10	13	205			

+ = presença, - = ausência, ??? = sem informação, ou necessita de confirmação; raras? = informação necessita confirmação devido à formação de esporos intraradiculares;

- (1) O número total de espécies inclui algumas sinônimas;
- (2) O gênero *Appendicispora* foi proposto a partir da espécie *Acaulospora appendiculata* e espécies classificadas como *Archaeospora* (Spain et al. 2006). Posteriormente Walker et al. 2007 elegeram a família *Appendicisporaceae*, como nome legítimo da família *Archaeosporaceae* (Walker et al. 2007a).
- (3) *Geosiphon* forma simbiose mutualística com cianobactérias, mas não forma simbiose com plantas, assim não é FMA. Por outro lado sua inclusão no Filo Glomeromycota é amplamente justificada por evidências morfológicas (esporos glomóides) e moleculares pela análise do 18S rDNA.
- (4) A família *Entrophosporaceae* e os gêneros *Kuklospora* e *Intraspora* foram propostos para acomodar espécies classificadas como *Entrophospora*, mas que apresentam claras diferenças morfológicas quanto à formação e estrutura de esporos, bem como algum suporte da filogenia molecular baseado no gene ribossomal (25S rRNA) para *Intraspora* (Sieverding & Oehl 2006);
- (5) A família *Pacisporaceae* e o gênero *Pacispora* foram propostos para acomodar a espécie *Glomus scintillas* e espécies relacionadas que formam esporos glomóides com paredes geminativas com características encontradas nos gêneros *Acaulospora*, *Kuklospora* e *Scutellospora* (Oehl & Sieverding 2004). A família *Pacisporaceae* foi agrupada na Ordem *Diversisporales* com base em características citológicas, morfológicas e moleculares (Walker et al. 2004; Walker & Schüssler 2004).
- (6) O gênero *Glomus* é polifilético e foi subdividido em *Glomus* A, B e C (Schwarzott et al. 2000). *Glomus* grupo C foram reclassificados para família *Diversisporaceae* gênero *Diversispora*;

2.2. Briófitas

Briófitas são plantas criptógamas avasculares, pertencentes ao sub-reino Embryophyta e representadas por três grupos: musgos, hepáticas e antóceros, que atualmente encontram-se nas respectivas divisões: Bryophyta, Marchantiophyta e Anthocerotophyta (Shaw & Goffinet, 2000). Contribuem significativamente para a biodiversidade do planeta, sendo o segundo grupo de plantas com maior riqueza específica, com cerca de 15.000 espécies, das quais 4.000 espécies (2.600 musgos, 1.350 hepáticas e 30 antóceros) ocorrem no Neotrópico (Gradstein et al., 2001). O Brasil abriga 2/3 da brioflora neotropical, sendo reconhecidas 2.675 espécies, 1.964 musgos (Yano, 1996), 700 hepáticas e 11 antóceros (Gradstein & Costa, 2003).

As briófitas desempenham importante papel na dinâmica das florestas tropicais, pois auxiliam no balanço hídrico do ecossistema, contribuindo na captação e manutenção da umidade atmosférica, e na prevenção da perda de água, pois possuem alta capacidade de retenção de água da chuva (Brito & Pôrto, 2000). Estão intimamente relacionadas com a dinâmica da maioria dos ecossistemas terrestres, sendo importantes na retenção da umidade do solo, na ciclagem de nutrientes e em interações ecológicas, fornecendo habitat para outros organismos (Hallingbäck & Hodgetts, 2000).

Por sua natureza poiquilohídrica, as briófitas são especialmente vulneráveis a distúrbios ambientais, sendo utilizadas como bioindicadoras (Gradstein, 2002). São excelentes indicadoras climáticas, pois reagem aos fatores como umidade, temperatura e luminosidade, possuem ciclo de vida curto e dispersão por esporos (Hallingbäck & Hodgetts, 2000). Podem ser utilizadas também como indicadoras na avaliação dos efeitos da fragmentação de habitat, principalmente as epífilas (que vivem sobre folhas vivas), por serem mais sensíveis às condições ambientais e mais vulneráveis do que a maioria dos grupos vegetais que ocorrem nas florestas tropicais (Pócs, 1996, Gradstein et al., 2001, Zartman, 2003).

A partir de esporos (via reprodução sexuada) e outros diásporos (via reprodução assexuada) como gemas, bulbilhos, “tubers” (gemas rizoidais) e fragmentos de plantas adultas, novos indivíduos são originados, os quais podem constituir uma nova

população, em geral, crescendo em número de ramos e/ou indivíduos (fragmentados) assexuadamente (Longton & Schuster, 1983; During, 2001).

O monoicismo e o dioicismo regem a dinâmica de populações de briófitas, uma vez que essas plantas são, em geral, fortemente dependentes da presença de água para que haja a fertilização da oosfera (gameta feminino, imóvel) por um anterozóide (gameta masculino, flagelado e móvel) (Glime, 2007). Os anterozóides são limitados a curtas distâncias de deslocamento até a oosfera mais próxima, que chega a aproximadamente 2 - 5 cm (0,2 - 1 m) (During & van Tooren, 1987). Por essa razão, populações de espécies dióicas são muitas vezes constituídas de um único sexo e dependentes totalmente do fluxo de anterozóides ou esporos de populações vizinhas, que originem plantas do outro sexo.

Populações de um único sexo e a raridade de plantas masculinas são comumente registradas entre hepáticas e musgos, e em algumas espécies um dos sexos nunca foi encontrado (Longton & Schuster, 1983). Algumas explicações podem ser propostas como razões desproporcionais entre os sexos em adição à proliferação de populações unissexuais por crescimento clonal (Longton & Greene, 1969); distâncias curtas de dispersão dos anterozóides (Wyatt, 1977); mortalidade diferencial dos sexos (Bowker et al., 2000); inibição da formação de gametângios em um sexo, devido provavelmente a fatores de 4 induções diferenciais para os sexos (Longton & Greene, 1979; Mishler & Oliver, 1991); e variação em níveis de fecundidade entre plantas masculinas e femininas (McLetchie, 1996).

Por outro lado, espécies monóicas, ainda que apresentem os dois sexos são prejudicadas pelo excesso de auto-fertilização e baixa variabilidade genética (During & van Tooren, 1987; Longton & Schuster, 1983). Embora a auto-incompatibilidade não tenha sido registrada em briófitas, em algumas espécies outra estratégia para evitar o auto-cruzamento é a separação temporal dos sexos, que inviabiliza as chances de fertilização dentro de uma população (During & van Tooren, 1987). Dessa forma, muitas espécies de briófitas apresentam populações pequenas e fortemente dependentes das interações com populações vizinhas. Elas são distribuídas de modo fragmentado, ocupando freqüentemente superfícies de rochas, troncos em decomposição, cascas de árvores, folhas vivas, entre outros, e parecem exibir dinâmicas metapopulacionais (Husband & Barrett, 1996).

A reprodução sexuada é uma das características mais importantes para a sobrevivência das espécies, uma vez que ela gera tanto diásporos para dispersão no espaço e no tempo (bancos de diásporos), como variação genética (Söderström & During, 2005).

A reprodução assexuada também produz diásporos que podem ser tão importantes para a sobrevivência de populações locais de briófitas quanto os esporos produzidos sexualmente. Contudo, uma vez que a identidade genética é, em geral, igual a da planta mãe (exceto quando ocorrem mutações somáticas) eles não contribuem para a diversificação genética (Söderström & During, 2005).

A produção de esporos por esporófito varia de 50.000 a 600.000 em muitas espécies de musgos. Já em hepáticas, grupos com esporos maiores (Marchantiales) apresentam baixa produção (Longton & Schuster, 1983). A distância de dispersão dos diásporos é inversamente relacionada ao tamanho dessas estruturas. Esporos menores tendem a ser levados, em geral, pelo vento a longas distâncias, enquanto esporos maiores e outros diásporos (gemas e fragmentos) raramente ultrapassam alguns metros (Söderström & During, 2005) além das populações fontes. A dispersão biótica via pequenos artrópodes (ácaros, colêmbolas, tardígradas, moscas, entre outros) anelídeos e moluscos (caramujos e lesmas) também deve ser considerada, embora existam poucas evidências experimentais sobre o tema (Schuster, 1985; Kimmerer & Young, 1995; Glime, 2007). A distância alcançada pelos diásporos não é sozinha um fator preditor, pois além de alcançar grandes distâncias os diásporos devem ser tolerantes ou resistentes a condições experimentadas, por exemplo, a elevadas alturas (radiação UV, dessecação).

Os esporos (ou menos comumente outros diásporos) devem apresentar características que promovam a germinação e o estabelecimento apenas quando as condições ambientais forem propícias e estáveis (Glime, 2007). O tempo de vida de uma população (sub-população) depende da taxa de mortalidade dos ramos individuais (gametóforos) e da taxa de recrutamento. Quando a taxa de recrutamento é igual ou superior à taxa de mortalidade, a extinção de uma população pode ocorrer apenas se forças externas como destruição do habitat ou destruição mecânica suprimirem aquela população. Quando habitats são efêmeros, ao exemplo de troncos em decomposição e folhas vivas, o desaparecimento do habitat é pré-determinado e com ele a população também desaparece.

Para sobrevivência em escala regional, novos fragmentos de habitat devem ser colonizados na mesma taxa tão breve um desapareça (Snäll et al., 2003; Söderström & During, 2005). Há uma tendência para espécies monóicas de musgos e hepáticas apresentarem menor tempo de vida e uma tendência para estratégias anuais e efêmeras, enquanto as dióicas serem colonizadoras e perenes (Longton & Schuster, 1983; sensu During, 1979; apud Longton, 1992).

2.3. Meios nutritivos

Os meios nutritivos para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*, as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células, por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro*, complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Historicamente, passos importantes no desenvolvimento de formulações nutritivas foram dados nos estudos de nutrição mineral de plantas, que culminaram na definição da solução nutritiva de Knop. Foi nessa solução que Gautheret (1934) se baseou para formular os macronutrientes do seu meio nutritivo, uma composição diferente de macronutrientes com base na solução nutritiva de Uspenski e Uspenskaia foi desenvolvida ao longo de uma série de estudos com cultura de raízes de trigo e de tomate por White (1932; 1933; 1934; 1938) (Caldas; Haridasan; Ferreira, 1998).

Alguns dos primeiros meios apresentavam, entre os micronutrientes, metais exóticos como níquel, titânio e berílio (Nobécourt, 1938), além dos mais comuns (ferro, manganês, zinco, cobre e boro); a lista dos minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foi definida por White (1943b; 1945). O meio de White continha,

ainda, vitaminas e sacarose como suplementos orgânicos, dos hormônios vegetais, ou reguladores de crescimento, apenas a auxina, ácido 3-indolacético, era conhecida nas décadas de trinta e quarenta. Gautheret (1939; 1942) e Nobécourt (1937; 1939) utilizaram esta auxina nos meios para promover a formação de calo em tecidos cambiais de cenoura (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Uma revisão interessante desta fase dos estudos de meios nutritivos é apresentada por White (1951). Nota-se que a ênfase desses primeiros trabalhos era a identificação dos compostos essenciais para o crescimento de células ou órgãos isolados das demais partes da planta (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Durante anos, o meio de White foi utilizado como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies, a mudança de ‘padrão’ de meio seguiu as tentativas de otimizar o crescimento de calo *in vitro*, essas modificações posteriores envolveram, principalmente, o aumento das concentrações dos sais em geral, uma diminuição na concentração de sódio e o acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato (Murashige & Skoog, 1962). O meio Murashige Skoog (MS) (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extrato de folhas de fumo, foi demonstrado que a fração do extrato que mais estimulou o crescimento era aquela dos compostos inorgânicos. O meio MS, juntamente com o B5 (Gamborg et al., 1968), é usado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Quando se encontra na literatura uma citação do meio MS, por exemplo, normalmente se refere à composição dos sais minerais do meio de Murashige & Skoog (1962), que pode ser identificado como um meio básico, se as combinações de vitaminas não foram mencionadas no trabalho, supõe-se que foram utilizadas, também, as vitaminas do meio MS, a concentração de sacarose ou de outro carboidrato, bem como dos reguladores de crescimento, é geralmente especificada em cada trabalho (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Algumas revisões tratam de diferentes aspectos do assunto de meios nutritivos: Street (1966) e De Fossard (1976) apresentaram revisões gerais e Dougall (1980), Gamborg (1984) e Ojima & Ohira (1978) discutiram a nutrição de calo e suspensões celulares. O uso da técnica de cultura de tecidos para estudos bioquímicos e metabólicos foi discutido por Ludden & Carlson (1980) (Caldas; Haridasan; Ferreira, 1998).

No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos de plantas, houve desde o início uma procura de meios definidos, de composição conhecida e controlada, assim, torna-se possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar, para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica ('p.a.') (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Os meios são esterilizados, após distribuídos nos frascos ou vasilhames de cultura, por autoclavagem a 121°C (1 kg/cm²) por 15 a 20 minutos (Caldas; Haridasan; Ferreira, 1998).

Algumas substâncias orgânicas são degradadas pelo calor, por isso precisam ser esterilizadas a frio, utilizando filtro especial de acetato de celulose tipo millipore; entre as substâncias usadas na cultura de tecidos de plantas, que são lábeis na autoclavagem encontram-se: a glutamina, o ácido giberélico (Van Bragt & Pierik, 1971), a tiamina (Linsmaier & Skoog, 1965) e o ácido abscísico, no caso das duas últimas, a degradação pode ser satisfatoriamente compensada pelo aumento na concentração usada, em muitos casos (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

Outras reações ocorrem, também, durante a autoclavagem, como reações entre açúcares e aminoácidos (a 'caramelização', Peer, 1971) e a hidrólise de sacarose (Ball, 1953); estas reações se intensificam com o aumento do tempo da autoclavagem; assim, é aconselhável manter os meios no autoclave pelo mínimo de tempo necessário para completar a esterilização (Caldas, 1998; Haridasan, 1998; Ferreira, 1998).

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Produção de meio de cultura (SRV)

O sucesso da cultura *in vitro* está intimamente ligado à escolha do meio nutritivo com uma composição físico-química mais apropriada ao tipo de material vegetal que se pretende cultivar. O meio utilizado nesse trabalho foi o semi-sólido (SRV), que é uma modificação feita a partir do MS Declerck et al. (1998) (Fonseca HMAC, 2001). Sua composição se encontra na Tabela 02.

Tabela 02: Reagentes que compõem o meio semi-sólido (SRV).

Macronutrientes						
Reagente	g/L	(mM)		Reagente	g/L	(mM)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.739	3.00		KNO ₃	0.076	0.75
KCl	0.065	0.87		Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.359	1.52
KH ₂ PO ₄	0.0041	0.03				
Micronutrientes						
Reagente	g/L	(μM)		Reagente	g/L	(μM)
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0018566	11.0		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00029	1.00
H ₃ BO ₃	0.00186	30.0		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00024	0.96
NaFe·EDTA	0.008	0.02		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.000035	0.03
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0000024	0.01		CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.000238	0.85
Vitamins						
Reagente	g/L	(μM)		Reagente	g/L	(μM)
Biotin(H)	0.0000009	.004		Cyanocobalamin(B12)	0.0004	0.29
PanhotenateCa(B5)	0.0009	1.88		Pyridoxine-HCl(B6)	0.0009	4.38
Thiamine-HCl(B1)	0.001	2.96		Nicotinic.acid(B)	0.001	8.1

Para produção do meio nutritivo a pesagem normal dos reagentes demandaria muito tempo, por isso é costume, fazer soluções estoques, ou seja, fez-se uma pesagem grande (multiplicada por x vezes) para todos os reagentes e estes foram agrupados de forma a não reagirem entre si. Os grupos foram diluídos em água destilada e as soluções avolumadas e armazenadas (em geladeira). E então para a produção de um determinado volume do meio de cultura foram utilizadas alíquotas correspondentes ao peso e concentração necessária. Exceto para o Gel – Gro (agente solidificador) e a Sacarose, que devem ser pesados na hora. Na produção do meio as alíquotas das soluções estoque (exceto as vitaminas) foram misturadas em um volume de água destilada, correspondente a aproximadamente a metade do volume de meio de cultura desejado. Essa mistura foi feita em Becker sobre agitador magnético (Figura 01).



Figura 01: Soluções estoque e produção de meio de cultura em Becker sobre agitador magnético.

Após a adição dos reagentes acrescentou-se a sacarose e com a dissolução total da mistura se corrigiu o pH. Este é um fator muito importante, pois interfere desde a polimerização do meio (com o agente solidificador) até o crescimento dos organismos que vão ser mantidos no meio. Sendo geralmente ajustado entre 5,5 - 5,8 (Figura 02).



Figura 02: Calibração do pH para 5,5 – 5,8.

Depois de corrigido o pH acrescentou-se o Gel – Gro e manteve-se o meio sobre agitação com o aquecimento ligado até a sua completa dissolução.

Após a completa dissolução do agente solidificador a mistura do meio nutritivo foi cuidadosamente, avolumada e distribuída em erlenmeyers, esses foram tampados com algodão e papel alumínio e autoclavados (120 °C por 20 minutos) para esterilização (Figura 03).



Figura 03: Erlenmeyers com meio de cultura e autoclave.

Terminada a autoclavagem, os erlenmeyers com o meio foram levados para uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada, onde já se encontravam placas petri, também previamente esterelizadas, distribuídas (Figura 04).



Figura 04: Câmara de fluxo laminar estéril com placas petri distribuídas.

Então, quando o erlenmeyer atinge uma temperatura (em torno de 45 °C) que permita segura-lo, ele foi aberto e as vitaminas (Tabela 02) foram filtradas, por filtros de Millipore (diâmetro do poro = 0,2 µm) estéreis e adicionadas no meio nutritivo, devido elas serem de fácil degradação nas condições de alta temperatura e pressão e por isso não irem à autoclavagem. Em seguida o meio foi rapidamente, homogeneizado e vertido nas placas petri, em um volume aproximado de 30 ml. Após a solidificação do meio, essas placas tiveram suas bordas flambadas, fechadas com filme (PVC) e foram guardadas por 48 horas para confirmação da esterilidade do processo.

3.2. Origem e multiplicação da Briófitas *Lunularia cruciata* “in vitro”

A hepática *Lunularia cruciata* (Lindberg) foi coletada (por Ricardo L. L. Berbara) em 2003, no Campus da Universidade de Aveiro, Portugal (Figura 05).



Figura 05: *Lunularia cruciata* na natureza e suas gemas (propágulo sexual).

Suas gemas (propágulo sexual) foram retiradas e lavadas por 15 segundos em etanol 96%, imersas por 5 a 25 minutos em alvejante comercial a 7% e após a imersão foram coletadas imediatamente, rinsadas e mergulhadas quatro vezes por 5 minutos em água destilada autoclavada. Os isolados resultantes foram separadamente colocados em placas Petri com meio Knop (Reski & Abel, 1985) e mantidas a 25°C em uma câmara de crescimento (Sanyo MLR– 350H) por 120 dias a 25°C, com um fotoperíodo de 10/14h luz/escuro para promover o crescimento da planta. Após o crescimento estéril, os isolados foram repicados e seus explantes transplantados para novas placas Petri, contendo 30 mL do meio (SRV) e após, foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo.

3.3. Multiplicação de Fungo M. Arbuscular em banco de germoplasma *in vitro*

Esse processo foi realizado em Portugal (por Ricardo L. L. Berbara), se iniciou com a extração de esporos viáveis de FMAs do solo, que foi realizada pela técnica do peneiramento úmido (GERDEMANN & NICOLSON, 1963) seguida por decantação em água e flutuação em sacarose (DANIELS & SKIPPER, 1982). Após a extração os esporos foram identificados taxonomicamente (através de características morfológicas ou genéticas) e então cultivados de forma monospórica em copos de 50 ml, com solo estéril e sementes desinfestadas de planta isca (brachiária, sorgo, etc). Foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente com água destilada ou filtrada. Após 30 dias foi coletada uma pequena amostra de cada copo, para verificação da germinação. Havendo germinação, todo o sistema do copo de 50 ml foi transplantado cuidadosamente para potes de 500 ml também com solo estéril, onde permaneceu por um período de seis meses, resultando em grandes quantidades de esporos de espécies individualizadas. Passado esse tempo realizou-se uma nova extração de esporos do solo e a sua desinfestação superficialmente, por meio de soluções: tween 20 (0,05% v/v), cloramina T (2% p/v) e antibióticos (estreptomicina + gentamicina) em ambiente estéril, segundo a metodologia modificada de BÉCARD & PICHE (1992). Após a desinfestação, os esporos limpos foram colocados em sistema *in vitro* de placa Petri contendo ágar-ágar. E então após o tempo mínimo de 10 dias os esporos germinados são transplantados para novas placas Petri, contendo meio nutritivo semi-sólido e hospedeiro, com os quais se associarão e multiplicarão. Neste trabalho a espécie de

FMA utilizado foi o *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK, cujas algumas de suas características morfológicas seguem abaixo (Figura: 06, 07, 08, 09, 10).



Figura 06: Ramificação estrutural das hifas de *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK..

Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).

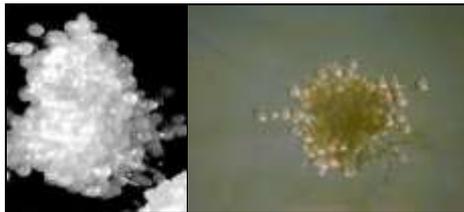


Figura 07: Aglomerado de esporos de *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK, contendo várias centenas de indivíduos.

Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).

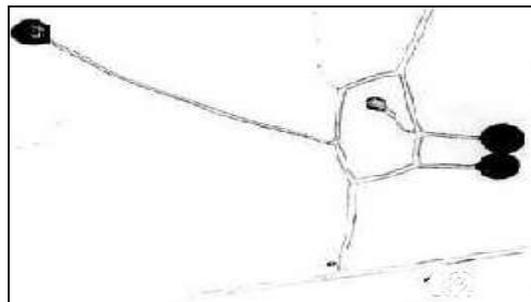


Figura 08: Imagem mostrando momento em que uma hifa de *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK se dividiu em duas e novamente se fundiu.

Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).

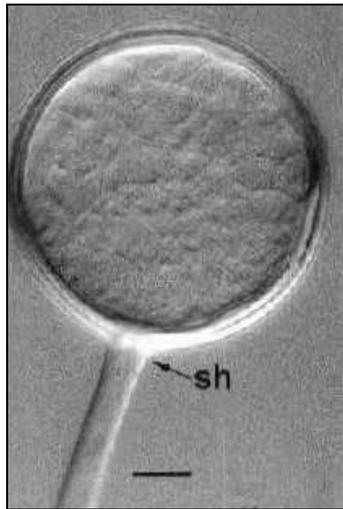


Figura 09: Esporo jovem de *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK, com proeminência do tubo germinativo (sh).
Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).

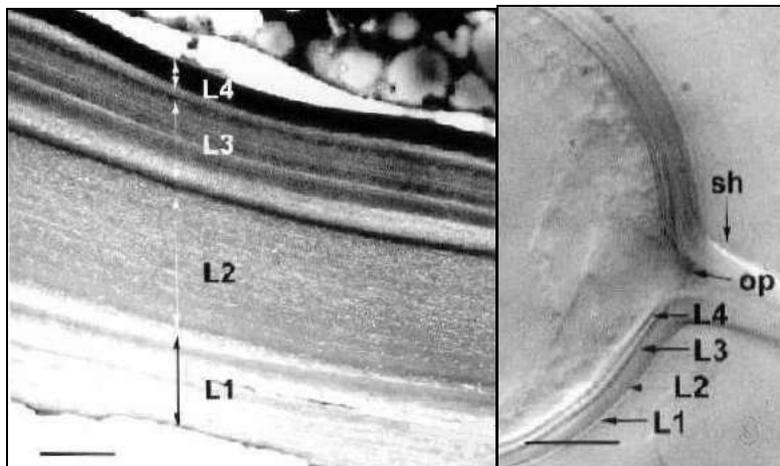


Figura 10: Visualização da parede do esporo de *Glomus proliferum* DALPÉ & DECLERCK, por microscopia eletrônica de transmissão. (L1, L2, L3, L4), são camadas compactadas.
Fonte: Glomeromycota in vitro collection (GINCO).

3.4. Montagem do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia do Solo, Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Iniciou-se no dia 29/07/2009 com a coleta de gemas (propágulo sexual) de uma briófitas já estéril e cultivada *in vitro*, há aproximadamente oito meses (Figura 11).



Figura 11: Briófitas cultivadas *in vitro* (Axênica).

Toda manipulação das placas Petri (abertura e fechamento) foi realizada em câmara de fluxo laminar. As gemas foram coletadas com auxílio de uma pipeta Pasteur e água destilada autoclavada e no mesmo momento, cuidadosamente, espalhadas em outra placa Petri contendo meio nutritivo (SRV) (Figura 12). Após uma semana, novas placas, com meio (SRV), foram preparadas e guardadas em observação, para certeza de sua esterilidade. No dia 13/08/2009, com as gemas crescidas em tamanho ideal para manipulação (Figura 12) as placas definitivas foram montadas.



Figura 12: Gemas de *L. cruciata* antes da montagem do experimento e gemas no dia da montagem do experimento.

Com delineamento inteiramente casualizado o experimento teve dois tratamentos: cultivo axênico (apenas *Lunularia cruciata*) e monoxênico (*Lunularia cruciata* com *Glomus proliferum*) em meio nutritivo (SRV) e 11 repetições. No tratamento cultivo monoxênico (Figura 14) as placas com meio de cultura receberam no centro uma gema e ao lado dessa um pequeno inóculo de *Glomus proliferum* com aproximadamente 40 esporos proveniente de um cultivo *in vitro* com simbiose FMA e briófitas estabelecido em um tempo aproximado de 100 dias (Figura 13).

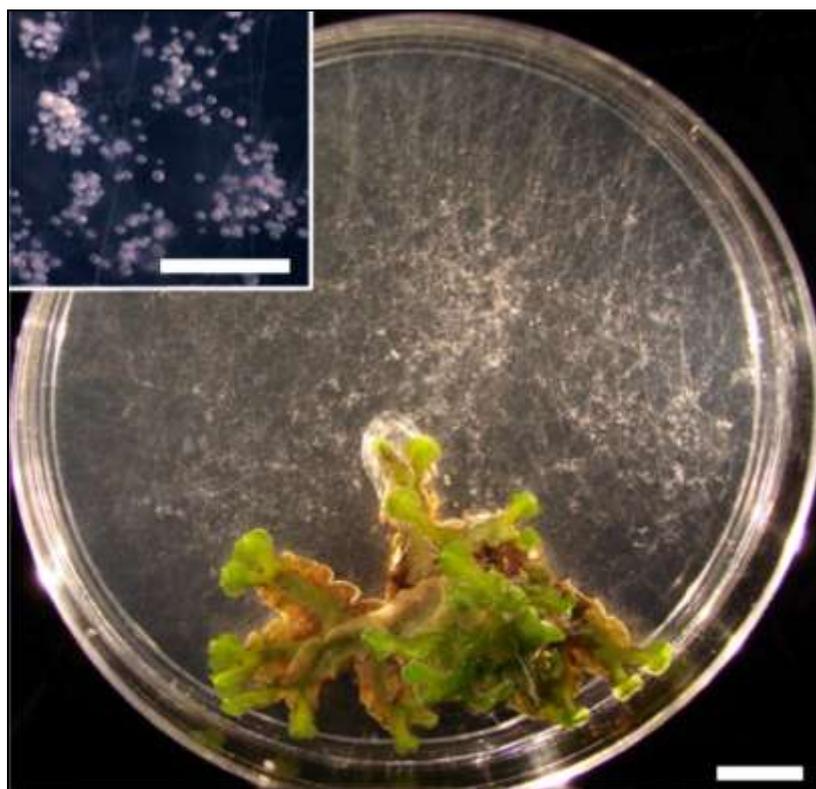


Figura 13: Cultura de *Lunularia cruciata* com *Glomus proliferum* depois de 100 dias em meio SRV.

Fonte: Fonseca, H.M.A.C. *et al.*, (2009).

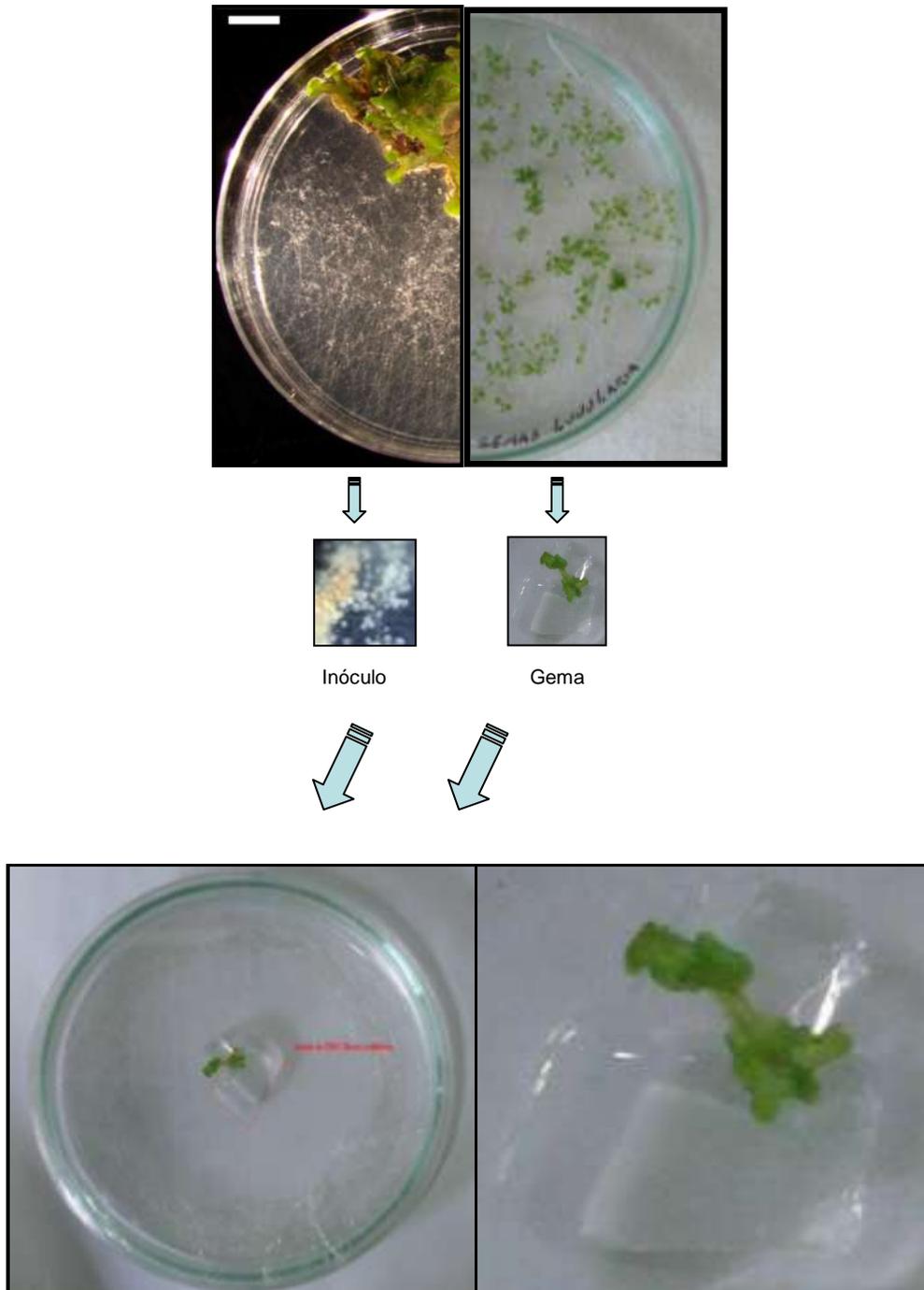


Figura 14: Tratamento cultivo monoxênico.

3.5. Coleta e processamento dos dados

Para avaliação do crescimento (área em cm²) das briófitas foi utilizada a metodologia de editoração de imagens digitais proposta por LIMA et al., (2006) com a utilização 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 SONY de 7.2 Mega pixels foram capturadas imagens das placas Petri com resolução de 1280 x 960 pixels, 16,7 milhões de cores (24 Bits) e formato JPEG; utilizando a mesma altura da câmara e o mesmo zoom (automático) e de preferência o mesmo posicionamento (Figura 15). Sobre a superfície de cada placa Petri, foram colocadas três pequenas etiquetas de tamanho conhecido (2,5 cm). Duas laterais para manter o mesmo posicionamento (Figura 15) e uma superior que além de receber a identificação da placa, serviu como referência para a medida da área de crescimento da briófitas (Figura 16).



Figura 15: Suporte para fotos perpendiculares a uma altura constante.

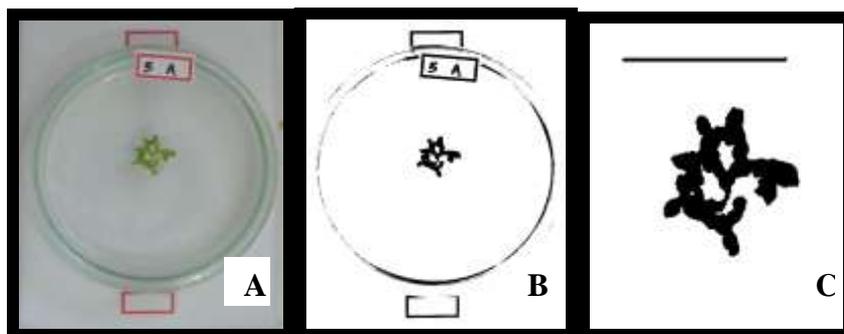


Figura 16:

- A) Imagem digitalizada de placa Petri com *L. cruciata* e etiquetas de tamanho conhecido.
- B) Imagem convertida para o formato bitmap (BMP) monocromático.
- C) Recorte da imagem utilizada para o processamento.

Para ser possível a editoração das imagens no SIARCS (Figura 17) foi necessária uma modificação para um formato aceito pelo software conforme metodologia descrita por OLIVEIRA et al., (2003). Assim (através do software Paint), a definição das imagens foi reduzida de 16,7 milhões de cores, para monocromático e os arquivos transformados do formato JPEG para o formato bitmap (BMP). Editorando as imagens no SIARCS, com o fornecimento do tamanho conhecido da etiqueta, o software forneceu o crescimento em cm² das briófitas. Esse crescimento foi avaliado em seis épocas diferentes: 0, 30, 40, 55, 86 e 106 dias após a montagem do experimento.

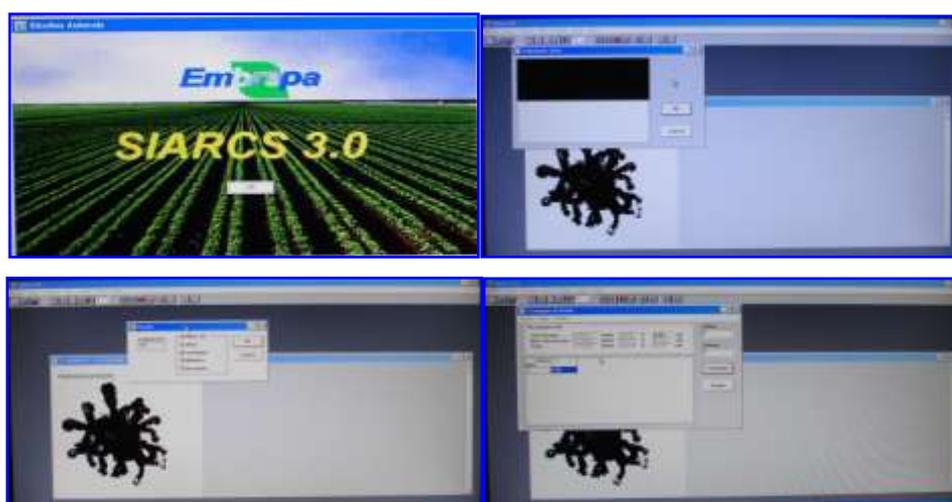


Figura 17: Editoração das imagens no SIARCS 3.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da metodologia

A metodologia sugerida por LIMA et al., (2006) com a utilização do SIARCS, se mostrou muito prática e adequada para avaliar o crescimento das briófitas *in vitro*. Porém bastante dependente da qualidade e capacidade da câmera fotográfica digital utilizada. Para a captura das imagens em relação às briófitas a câmera digital utilizada (SONY 7.2 Mega Pixels) foi bastante satisfatória, porém não foi possível a captura de imagens do crescimento do micélio vegetativo do fungo.

4.2. Análise do crescimento da briófitas

Os dados de crescimento apresentaram distribuição normal (Figura 18).

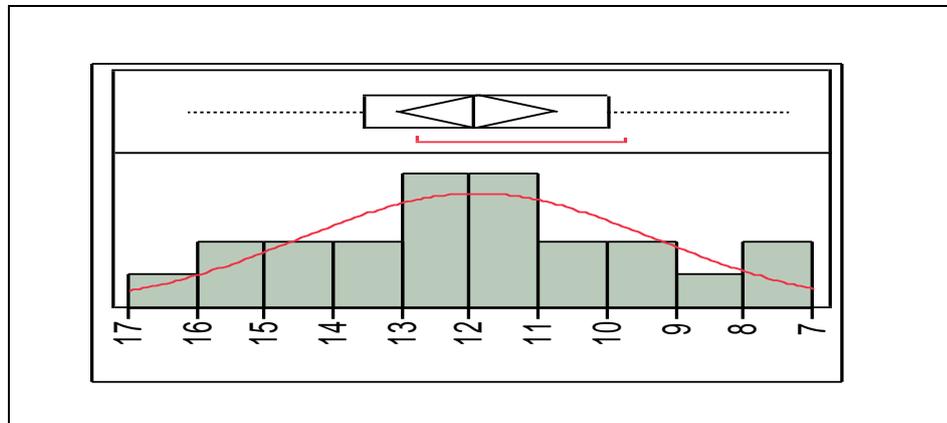


Figura 18: Teste de normalidade.

É a distribuição de probabilidade mais importante na estatística. Abrange um grande número de fenômenos e oferece base para inferência estatística clássica devido à sua afinidade com o teorema do limite central.

Um dos dados, após apresentar-se como discrepante aos testes de Jackknife e Mahalanobis (Figura 19), foi descartado das análises estatísticas.

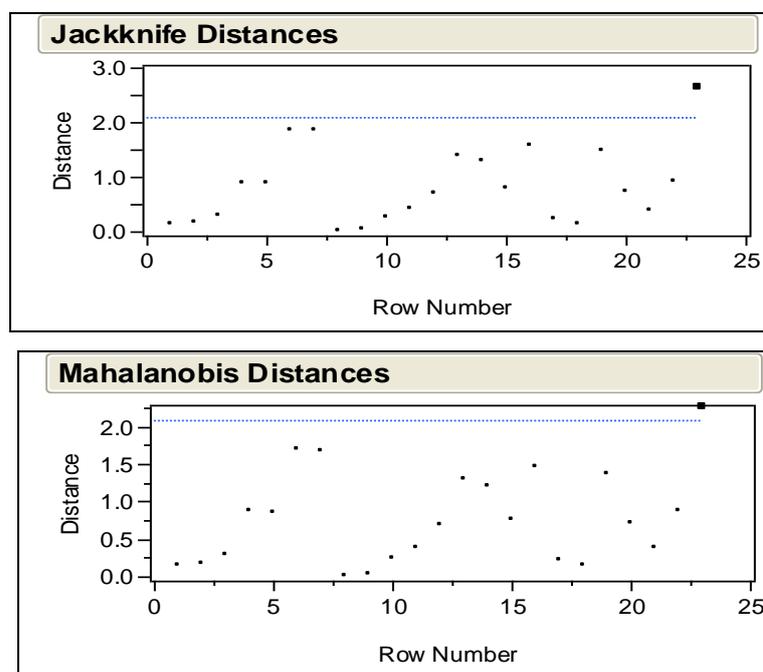


Figura 19: Análises de discrepância.

O estudo de observações discrepantes é muito antiga e a prática de excluir observações anômalas é muito polêmica. Estas observações são também chamados de outliers ou dados aberrantes quando distanciam-se do conjunto de dados. Em geral, os problemas que levam a estes outliers, são de várias procedências e, entre elas citam-se: os erros de determinações analíticas, cálculos errados, transcrição de dados, digitação, falta de calibração e manutenção de aparelhos, fatores ambientais, entre outros. Dados discrepantes podem ser encontrados em todas as áreas da ciência, principalmente nas áreas agrônômica e biológica, nas suas diferentes linhas de pesquisas. Um único outlier é capaz de apresentar grande valor de correlação e sem ele, este coeficiente seria zero. Em hipótese alguma se deve concluir baseando-se neste coeficiente e é recomendado cautela examinando-os pelos gráficos da dispersão dos resíduos. A identificação e decisão de retirada de outliers deverá estar também fundamentada na experiência do pesquisador na área de pesquisa. (Bustos, 1988, 1989, 1990).

A decisão pela exclusão do dado discrepante foi devido ao padrão de crescimento das briófitas (Figura 20), no seu estado normal serem muito inferior. E devido aos dois tratamentos não apresentar diferença estatística com a presença do dado, mesmo com forte e crescente tendência ao longo do tempo. Após a retirada desse dado a forte e crescente tendência chegou a uma diferença significativa aos 106 dias após a montagem do experimento (Tabela 3; Figura 21).

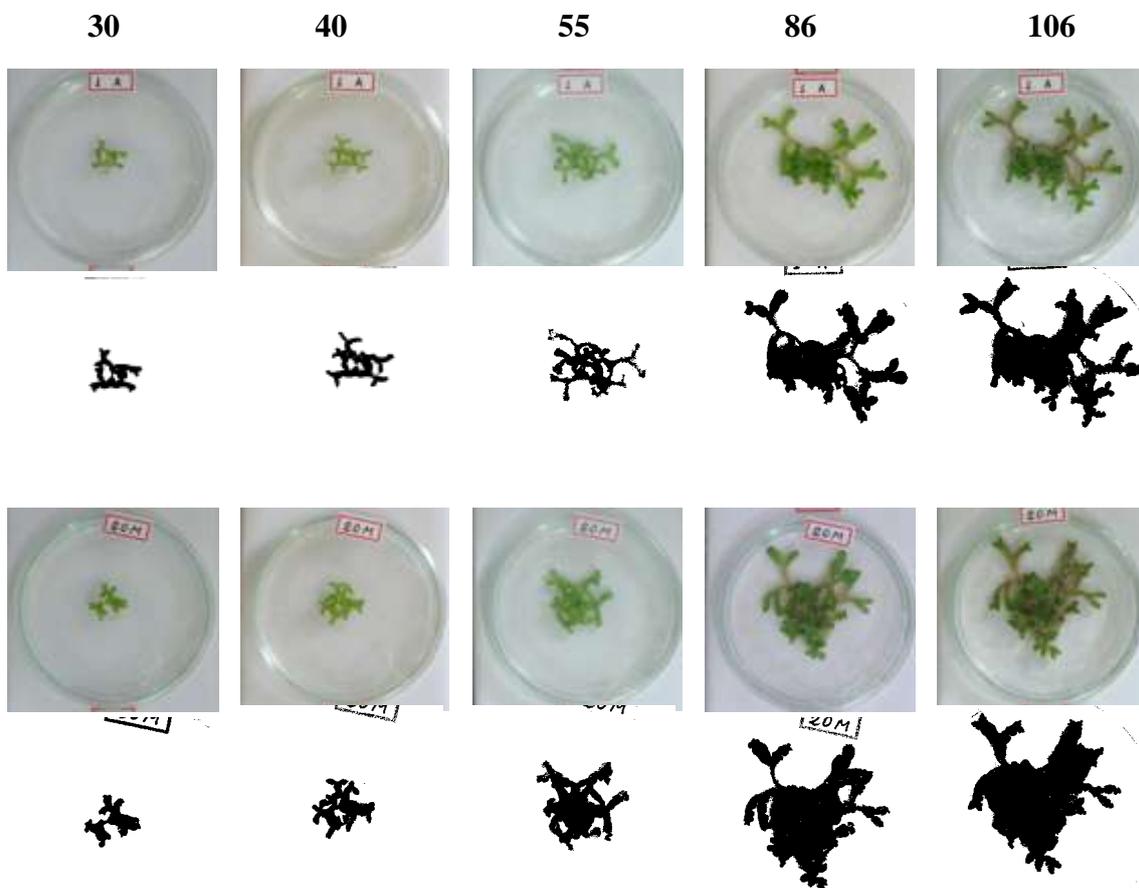


Figura 20: Imagens do crescimento axênico (placa 1A) e monoxênico (placa 20 A) 30, 40, 55, 86 e 106 dias após a montagem do experimento.

Tabela 3: Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TRATAMENTOS	Após 30 dias	Após 40 dias	Após 55 dias	Após 86 dias	Após 106 dias
Axênico	1.18 (± 0.26) A	1.70 (± 0.35) A	3.23 (± 0.73) A	10.59 (± 2.67) A	13.08 (± 2.68) A
Monoxênico	1.08 (± 0.29) A	1.59 (± 0.40) A	2.80 (± 0.85) A	8.83 (± 2.01) A	10.77 (± 1.97) B
P	0.3917 ns	0.4977 ns	0.2094 ns	0.0976 ns	0.0331 s

(*)=> Desvio Padrão.

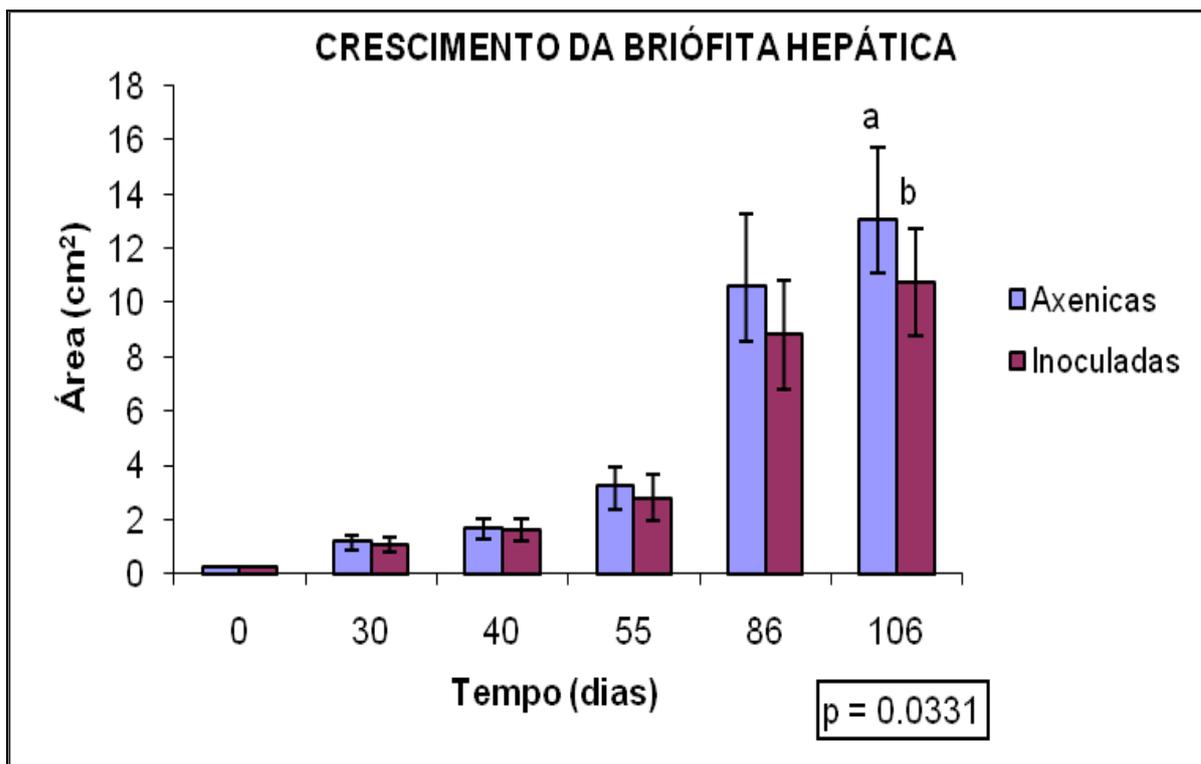


Figura 21: Crescimento da briófitas (cm²) nos dois tratamentos.

5. CONCLUSÕES

A tendência inicial dos dados, junto à diferença significativa aos 106 dias após a montagem do experimento demonstrou que “em condições *vitro*”, *in* ocorreu uma diferença negativa no crescimento das briófitas inoculadas, em relação às axênicas, comprovando a possibilidade sugerida por Fonseca et al., 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos acredito que o período de 106 dias, não foi suficiente para a análise da diferença de crescimento das briófitas nos dois tratamentos, supondo a necessidade de uma continuidade do monitoramento para uma análise mais concreta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, E.B.; ALLEN, M.E.; EGERTON-WARBURTON, L.; CORKIDI, L. & GOMEZ-POMPA A. Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. *Ecol. Appl.*, 13:1701-1717, 2003.

BERBARA, R.L.L. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. Dundee: University of Dundee, 1995. 215p. Tese de Doutorado.

BERBARA, R.L.L.; FONSECA, H.M.A.C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J.O., ed.. *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras / DCS / DCF, 1996. p.39- 66.

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.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A. ; FONSECA, H. M. A.; SOUZA, S. R. Transgenic root systems in arbuscular mycorrhizal fungi studies. *Revista Agronomia*, v. 35, n. 1/2, p. 58-65, 2001. 132

BERBARA, R. L. L.; FREIRE, L. R.; FERNANDES, M. S. Influência da colonização micorrízica arbuscular sobre a nutrição do quiabeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 9, p.1645-1653. 1999.

BLAND, W.L.; MESARCH, M.A. Counting error in the line-intercept method of measuring root length. *Plant and Soil*, The Hague, v.125, p.155-157, 1990.

BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.*, 154:275-304, 2002.

CAIRNEY, J.W.G. Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften*, 87:467-475, 2000.

CALCAS, R.A.; CALDAS, L.S. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiologia Plantarum*, v.37, p.111-116, 1976.

DE SOUZA, F. A. & BERBARA, R. L. L. (1999). Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia* 91, 343-350.

DE SOUZA, F. A., DALPÉ, Y., DECLERCK, S., DE LA PROVIDENCIA, I. E. & SEJALON-DELMAS, N. (2005A). Life history strategies in Gigasporaceae: insight

from monoxenic culture. In “*In vitro* culture of Mycorrhizas” (S. Declerck, D. G. Strullu & A. Fortin, eds.), Vol. 4, pp. 73-91. Springer Berlin Heidelberg New York.

DE SOUZA, F. A. & DECLERCK, S. (2003). Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia* 95, 1004-1012.

DE SOUZA, F. A., DECLERCK, S., SMIT, E. & KOWALCHUK, G. A. (2005b). Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). *Mycological Research* 109, 697-706.

DOUDS, D. D.; MILLNER, P. D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 74, p. 77-93, 1999.

FONSECA, H.M.A.C. Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plants with associated nitrogen fixing bacteria. Tese PhD, University of Dundee, 1994, 187 pp.

FONSECA, H.M.A.C.; BERBARA, R.L.L. & DAFT, M.J. Shoot delta N-15 and delta C-13 values of non-host *Brassica rapa* change when exposed to +/- *Glomus etunicatum* inoculum and three levels of phosphorus and nitrogen. *Mycorrhiza*, 11:151-158, 2001.

FONSECA, HENRIQUE M. A. C; FERREIRA, JOANA I. L; BERBARA, RICARDO L. L; ZATORRE, NATALIA P. Dominance of Paris-type morphology on mycothallus of *Lunularia cruciata* colonised by *Glomus proliferum*. Fonte: Braz. j. microbiol;40(1):96-101, Jan.-Mar. 2009.

GRAHAM, J.H. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D., eds. Current advances in mycorrhizae research. St. Paul, APS Press, 2000. p.127-140.

GROSS, E.; CORDEIRO, L. & CAETANO, F.H. Nodulation and mycorrhizal infection in *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* on autoclaved and non-autoclaved cerrado soil. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:95-101, 2004.

HAMEL, C.; BARRANTES-CARTIN, U.; FURLAN, V. & SMITH, D.L. Endomycorrhizal fungi in nitrogen transfer from soybean to maize. *Plant Soil*, 138:33-40, 1991.

HAMEL, C.; LANDRY, C.; ELMI, A.; LIU, A. & SPEDDING, T. Nutrient dynamics: Utilizing biotic-abiotic interactions for improved management of agricultural soils. In: CLEMENTS, D. & SHRESSTHA, A., eds. New dimensions in agroecology. New York, The Haworth Press, 2004. p.209-248.

HARRISON, M.J. Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. *J. Exper. Bot.*, 50:1013-1022, 1999.

HELGASON, T.; WATSON, I.J. & YOUNG, J.P.W. Phylogeny of the Glomerales and diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *Fems Microb. Lett.*, 229:127-132, 2003.

HIJRI, M. & SANDERS, I.R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*, 433:160-163, 2005.

HIJRI, M. & SANDERS, I.R. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Gen. Biol.*, 41:253- 261, 2004.

JAKOBSEN, I.; SMITH, S.E. & SMITH, F.A. Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition. In: van der HEIJDEN, M.G.A. & SANDERS, I., eds. *Mycorrhizal ecology*. Berlin, Springer-Verlag, 2002. p.75-92. (Ecological Studies, 157)

JASTROW, J.D.; MILLER, R.M. & LUSSENHOP, J. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biol. Biochem.*, 30:905- 916, 1998.

JEFFRIES, P. & BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: HOCK, B., ed. *The mycota*. New York, Springer, 2001. v.9. p.95-113.

JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K. & BAREA, J.M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fert. Soils*, 37:1-16, 2003.

JOHNSON, N.C.; GRAHAM, J.H. & SMITH, F.A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.*, 135:575-586, 1997.

KLIRONOMOS, J.N.; MCCUNE, J.; HART, M. & NEVILLE, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Letters*, 3:137-141, 2000.

LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and beta-1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytol.*, 140:33-42, 1998.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K. & DOUDS Jr., D.D., eds. *Current advances in mycorrhizae research*. St. Paul, APS Press, 2000. p.45-59.

LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F. & ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 160:421-428, 2003.

LIMA, W. L.; TAVARES, G. C. M. B.; LIMA, A. A.; MATIAS, G. C. S.; SOUZA, S. R. Teores de nitrogênio e crescimento de raízes transformadas de trevo cultivadas em meio mínimo. In: XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Resumos. 2003, Ribeirão Preto. 2003.

LIMA, W. L. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Bioquímica e Morfologia da Interação com Ácidos Húmicos e sua Multiplicação em Aeroponia. Seropédica, 2004. 99 f, Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2004.

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>

MALLOCH, D.W.; PIROZYNSKI, K.A. & RAVEN, P.H. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (a review). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77:2113-2118, 1980.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. v.1. 625p.

MORTON, J.B. Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales. In: BACON, C.W. & WHITE, J.H., eds. Microbial endophytes. New York, Marcel Dekker, 1999. p.121-140.

MORTON, J.B. & BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): 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.

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, 93:181-195, 2001.

OLSSON, P.A. & WILHELMSSON, P. The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. Plant Soil, 226:161-169, 2000.

WANG, B. AND Y.-L. QIU. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16:299-363.

RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEIN, N. & BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. Nature, 414:462-466, 2001.

RAVEN, J.A. & EDWARDS, D. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. J. Exper. Bot., 52:381-401, 2001.

REDECKER, D.; MORTON, J.B. & BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). Molec. Phylog. Evol., 14:276-284, 2000b.

SANTOS, B.A.; SILVA, G.A.; MAIA, L.C. & ALVES, M.V. Mycorrhizae in Monocotyledonae of Northeast Brazil: subclasses Alismatidae, Arecidae and Zingiberidae. Mycorrhiza, 10:151- 153, 2000.

SIMON L, LEVESQUE RC, LALONDE M. 1993b. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation-polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4211–4215.

SIMON L. 1996. Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytologist* 133, 95–101.

SIQUEIRA, J.O.; & FRANCO, A.A. *Biotecnologia do solo. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, Brasília, p. 125-177, 1988.*

SCHARDL, C.L. & CRAVEN, K.D. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molec. Ecol.*, 12:2861-2873, 2003.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O. & MUNCH, J.C. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosys. Environ.*, 98:255-262, 2003.

SCHÜBLER, A. Glomales SSU rRNA gene diversity. *New Phytol.*, 144:205-207, 1999.

SCHÜBLER, A.; BONFANTE, P.; SCHNEPF, E.; MOLLENHAUER, D. & KLUGE, M. Characterization of the geosiphon pyriforme symbiosome by affinity techniques – confocal laser scanning microscopy (clsm) and electron microscopy. *Protoplasma*, 190:53-67, 1996.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D. & WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 105:1413-1421, 2001.

SMITH SE, READ DJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, London. 605 pp. ISBN 0-12-652840-3

VAN DER HEIJDEN et al., 1998a M. VAN DER HEIJDEN, J. KLIRONOMOS, M. URSIC, P. MOUTOGLIS, R. STREITWOLF-ENGEL, T. BOLLER, A. WIEMKEN. AND I. SANDERS, Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity, *Nature* 396 (1998), pp. 69–72.

VAN DER HEIJDEN et al., 1998b M. VAN DER HEIJDEN, T. BOLLER, A. WIEMKEN AND I. SANDERS, Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure, *Ecology* 79 (1998), pp. 2082–2091.