

# FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Fotos e ilustrações cedidas pelos autores

Características, associação simbiótica e aplicação na agricultura

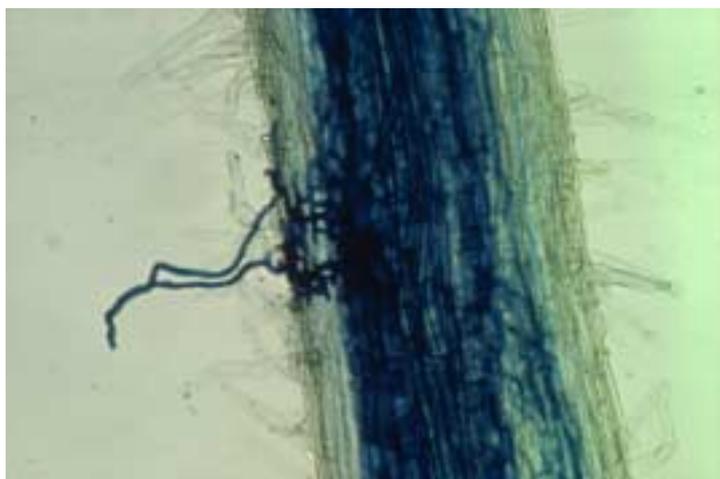
## Origem e características dos fungos Glomaleanos

**A**s plantas terrestres estabelecem simbioses mutualísticas ou parasíticas com diversos microrganismos, os quais encontram ambientes favoráveis nas partes aéreas ou subterrâneas dos vegetais. As micorrizas são as relações mutualísticas mais comuns na natureza, sendo formadas por certos fungos do solo e as raízes da grande maioria das plantas (Smith & Read, 1997). Entre os sete tipos de micorrizas conhecidos, as micorrizas arbusculares (MAs), formadas por fungos da Ordem Glomales, são as mais comuns nos ecossistemas terrestres. Embora tradicionalmente classificados na Divisão Zygomycota, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) apresentam divergências suficientes, com base na

análise do RNA ribossômico 18S, para formarem uma nova Divisão. Schußler et al. (2001) propuseram a Divisão Glomeromycota para abrigar os organismos formadores de MAs, colocando esse grupo de fungos no mesmo nível da hierarquia taxonômica que os tradicionais grupos basidiomicetos e ascomicetos. Existem fortes evidências de que os FMAs desempenharam um papel crucial na conquista do ambiente terrestre pelas plantas (Redecker et al., 2000). Essa premissa é corroborada por evidências de estudos de biologia molecular que confirmam que a origem dos FMAs coincide com a origem das plantas terrestres, há cerca de 353-462 milhões de anos (Simon et al., 1993). A origem dos FMAs foi também confirmada por análises em materiais fósseis do Devoniano, os quais revelaram a presença de estruturas fúngicas similares àquelas formadas pelos fungos Glomaleanos atuais (Pirozynski, 1981).

Os FMAs são simbiotróficos obrigatórios, pois completam seu ciclo de vida apenas se estiverem associados a uma planta hospedeira, a qual lhes fornece carboidratos e outros fatores necessários ao seu desenvolvimento e esporulação (Siqueira et al., 1985). Essa aparente desvantagem da relação com a planta, no entanto, é compensada

pela ausência de especificidade existente entre os FMAs e os hospedeiros. Normalmente, uma determinada espécie fúngica pode colonizar as raízes de vários hospedeiros entre as Angiospermas, Gimnospermas e Pteridófitas. Apesar de apenas 3% das espécies vegetais terem sido examinadas para a presença de MAs, pode-se afirmar que cerca de 95% das espécies vegetais atuais pertencem a famílias que são caracteristicamente micorrízicas (Trappe, 1987). Assim, as MAs são a regra e não a exceção na natureza. Famílias de plantas tipicamente não-micorrízicas incluem Caryophyllaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Juncaceae, Polygonaceae, Cyperaceae, que parecem ter perdido a capacidade de formar essa associação em tempos mais recentes, evolutivamente. Os FMAs podem ser encontrados em plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas que ocupam os mais diversos ecossistemas, como florestas, desertos, dunas, savanas, campos e agrossistemas. O longo tempo de co-evolução entre os FMAs e as plantas pode explicar a presença ubíqua desses fungos nos ecossistemas. Eles invariavelmente associam-se à maioria das plantas nativas dos trópicos e a espécies de interesse econômico como café, soja, milho, sorgo, maçã, citrus, feijão, entre outras. No Brasil, os estudos realizados pelos autores sobre a



**Figura 1.** Segmento de raiz de gramínea, mostrando o aspecto microscópico da penetração e colonização do córtex por fungo micorrízico arbuscular

### **José Oswaldo Siqueira**

Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Ph.D. Prof. Titular de  
Microbiologia do Solo  
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG  
bolsista do CNPq  
siqueira@ufla.br

### **Márcio R. Lambais**

Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Ph.D. Prof. Associado de  
Microbiologia do Solo  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de  
Queiroz", USP, Piracicaba, SP  
bolsista do CNPq  
mlambais@esalq.usp.br

### **Sidney L. Stürmer**

Biólogo Ph.D. Prof. de Botânica na  
Universidade Regional de Blumenau - FURB  
Blumenau-SC  
sturmer@furb.br

ocorrência dos FMAs em ecossistemas naturais e em agrossistemas indicam que o número de espécies pode variar de 35 em dunas costeiras até mais de 40 em cultivos de café e no cerrado nativo. Essa diversidade representa aproximadamente 1/3 de todas as espécies de Glomales descritas até o momento. A estrutura das comunidades de FMAs nos diferentes sistemas é bastante variável. Por exemplo, três espécies de Acaulospora (*A. scrobiculata*, *A. morrowiae* e *A. mellea*) são as mais freqüentemente encontradas em solos com cafeeiros, enquanto que no cerrado, *Scutellospora pellucida*, *Gigaspora margarita* e para *Glomus diaphanum* são geralmente as espécies predominantes (Siqueira et al., 1989). Estudos sobre a ecologia desses simbiotes devem ser incentivados para obter-se um inventário mais completo de sua diversidade taxonômica, fisiológica e genética. Essas informações poderiam ser utilizadas para a seleção de isolados eficientes para a aplicação em processos biotecnológicos de interesse agrícola ou ambiental.

Os FMAs não produzem alterações morfológicas visíveis nas raízes das plantas, e, desta forma, um processo de coloração e observação ao microscópio é necessário para a visualização das estruturas fúngicas nas raízes colonizadas (**figura 1**). As MAs possuem três componentes, quais sejam: a raiz da planta hospedeira, as estruturas formadas no córtex radicular (arbúsculos e vesículas) e o micélio e esporos extraradiculares (**figura 2**). As vesículas, estruturas globosas ou alongadas contendo grânulos de glicogênio e lipídios, são consideradas estruturas de estocagem dos fungos e podem ser formadas dentro ou fora das células do córtex. Os arbúsculos são as estruturas características das MAs. São formados pela intensa



**Figura 2.** Ilustração esquemática da anatomia de uma raiz com micorriza arbuscular

ramificação de hifas intracelulares e são responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbiotes. O desenvolvimento de arbúsculos é acompanhado da invaginação da membrana plasmática vegetal, não comprometendo a integridade das células radiculares. As hifas intra e extra-radiculares são importantes como propágulos para iniciar nova colonização, para gerar novos esporos, para aquisição de nutrientes e ainda podem favorecer a agregação do solo. O micélio extra-radicular pode atingir de 14 a 50 m g<sup>-1</sup> de solo, diferenciando-se em hifas absorptivas, as quais formam uma rede dicotomicamente ramificada que se estende solo adentro para absorção de nutrientes e água.

Os esporos formados pelos FMAs são assexuados e servem para sua disseminação e sobrevivência (**figura 3**). Possuem diâmetro que varia de 45 a 700 µm (os maiores encontrados no Reino Fungi), coloração hialina, amarelada, esverdeada, amarronzada ou mesmo preta, e forma globosa, alongada ou muitas vezes irregular (Morton, 1988), podendo ter parede lisa ou ornamentada. Os tipos de esporos são distinguíveis em função de sua ontogenia, que, juntamente com características estruturais, formam a base

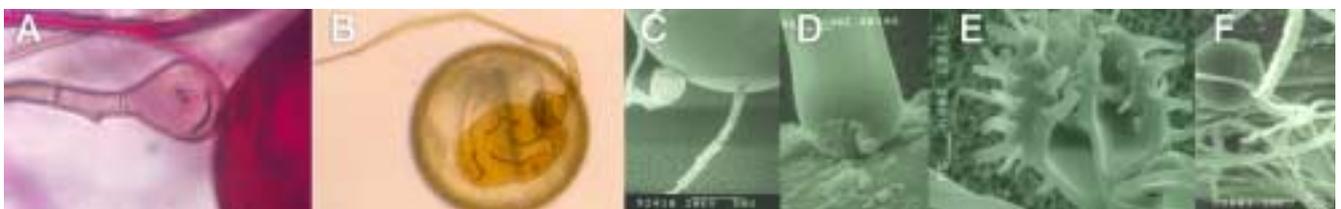
da taxonomia e sistemática dos FMAs. Alguns tipos de esporo e aspectos da sua germinação são ilustrados na **figura 3**. A diversidade estrutural nos esporos permite reconhecer atualmente cerca de 168 espécies de fungos Glomaleanos, pertencentes a sete gêneros distribuídos em cinco famílias (**figura 4**). Apesar de germinarem facilmente em meios de cultura, o crescimento continuado e a esporulação dos FMAs não ocorrem na ausência de células vivas do hospedeiro.

As dificuldades de se cultivar os FMAs *in vitro* representa um obstáculo ainda não superado, o qual tem limitado os estudos de sua biologia e desenvolvimento biotecnológico.

#### Desenvolvimento da associação simbiótica

Os mecanismos que regulam o desenvolvimento e funcionamento das MAs ainda não foram elucidados. Além do crescimento intercelular, o processo de colonização das raízes pelos FMAs é caracterizado pelo crescimento intracelular das hifas no tecido cortical e por diferenciação de hifas intracelulares terminais em arbúsculos (**figura 2**). Apesar do crescimento intrarradicular extensivo, normalmente observado nessa associação, as reações de defesa da planta são brandas e localizadas, sugerindo a existência de um mecanismo de reconhecimento mútuo entre os simbiotes, o qual é controlado por genes do fungo e da planta.

A sinalização molecular entre os simbiotes deve ter início muito antes de seu contato físico. Os esporos germinam quando as condições de umidade, temperatura e pressão parcial de CO<sub>2</sub> são



**Figura 3.** Esporos de fungos Glomaleanos. (a) detalhe de célula suspensora bulbosa em *Gigaspora* sp.; (b) *Scutellospora* spp mostrando o escudo de germinação; (c) fotomicrografia de *Gigaspora margarita* mostrando tubo germinativo próximo à hifa de sustentação, (d) detalhe da base do tubo na parede do esporo, (e) detalhe de uma célula auxiliar produzida *in vitro* e (f) fotomicrografia de *Glomus* sp na rizosfera

**Tabela 1** – As ações das micorrizas arbusculares no crescimento das plantas

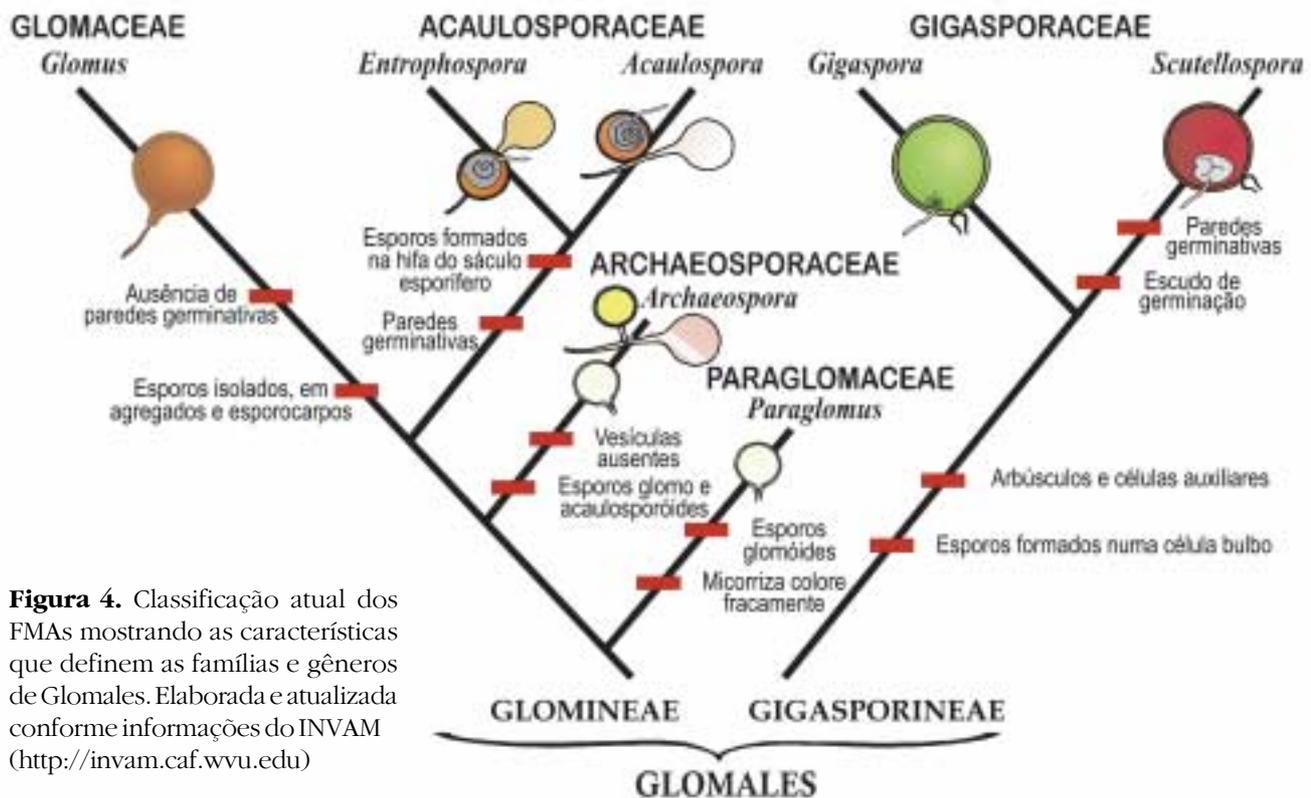
Ação	Mecanismos principais
Biofertilizadora	Maior absorção e utilização de nutrientes do solo. Favorecimento da nodulação e fixação de N <sub>2</sub> em leguminosas. Amenização de estresses nutricionais e nutrição balanceada. Acessos a nutrientes pouco disponíveis.
Biocontroladora	Ação de biocontrole sobre certos patógenos e pragas. Redução de danos causados por pragas e doenças. Amenização de estresses causados por fatores diversos como metais pesados e poluentes orgânicos. Efeitos benéficos na agregação do solo, melhora a conservação da água e do solo.
Biorreguladora	Atua na produção/acúmulo de substâncias reguladoras do crescimento (desenvolvimento e floração). Interfere favoravelmente na relação água-plantas (aumenta tolerância a déficit hídrico); Alterações bioquímicas e fisiológicas (acúmulo de certos metabólitos secundários).

favoráveis, e não há evidências de sinalização nesse estágio de desenvolvimento. No entanto, quando nas proximidades das raízes de plantas hospedeiras, o crescimento e a ramificação de hifas de esporos germinados são altamente estimulados (**figura 5**), sugerindo existência de uma sinalização específica. De fato, fatores presentes nos exsudatos de plantas hospedeiras estimulam o crescimento (**figura 6**) e a ramificação de hifas (**figura 5**), e sua divisão nuclear (Buee et al., 2000; Douds & Nagahashi, 2000). Ao contrário do que ocorre com células de hospedeiros, aquelas de não hospedei-

ros não estimulam o crescimento do fungo. A natureza dessas moléculas sinalizadoras ainda não foi determinada. Embora certos compostos fenólicos sintetizados por plantas, como os flavonóides, flavononas e isoflavonóides estimulem o crescimento de hifas *in vitro* (Nair et al., 1991; Bécard et al., 1992; Bécard et al., 1995) e a colonização micorrízica (Siqueira et al., 1991), a essencialidade desses compostos para o desenvolvimento da simbiose, como ocorre em interações leguminosas-rizóbios, não foi demonstrada. Estudos com mutantes de milho deficientes em chalcona sintase, enzima cha-

ve na síntese dos flavonóides, indicam que esses compostos fenólicos não são necessários para o desenvolvimento de MAs (Bécard et al., 1995). Essenciais ou não, flavonóides estimulam a colonização micorrízica e apresentam grande potencial de aplicação prática, como abordado neste artigo.

A primeira e mais importante indicação de reconhecimento de um hospedeiro compatível é a diferenciação de hifas fúngicas em apressórios (Staples & Macko, 1980). A formação de um apressório funcional, após um período de proliferação e ramificação abundante



**Figura 4.** Classificação atual dos FMAs mostrando as características que definem as famílias e gêneros de Glomales. Elaborada e atualizada conforme informações do INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu>)

**Tabela 2** – Exemplos de culturas, fungos eficientes e efeitos da inoculação no Brasil (Siqueira & Klauberg Filho, 2000)

Cultura	Fungos eficientes	Efeitos da inoculação
Abacaxi	<i>Glomus clarum</i> , <i>Gigaspora margarita</i> e <i>Glomus intraradices</i>	Melhor desenvolvimento de mudas micropropagadas.
Cafeeiro	<i>Glomus clarum</i> , <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	Melhor desenvolvimento de mudas, melhor sobrevivência no campo e maior produção.
Citros	<i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Gl. etunicatum</i> , <i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus fasciculatum</i>	Crescimento mais rápido de porta enxertos e de mudas no campo.
Leguminosas	<i>Glomus etunicatum</i> , <i>Glomus clarum</i>	Favorecimento da nodulação, do acúmulo de N, da produção de grãos e da tolerância ao déficit hídrico.
Milho	<i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	Nutrição favorecida, melhor ia do crescimento e da produção.
Mamão	<i>Glomus etunicatum</i> , <i>Entrophospora colombiana</i>	Melhor desenvolvimento inicial e de nutrição de mudas.
Tomate	<i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , <i>Gigaspora margarita</i>	Crescimento estimulado e maior eficiência de uso de fósforo.
Plantas arbóreas: reflorestamento e frutíferas	<i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , <i>Glomus fasciculatum</i>	Essencial para o desenvolvimento de mudas de espécies de semente pequena e crescimento rápido.

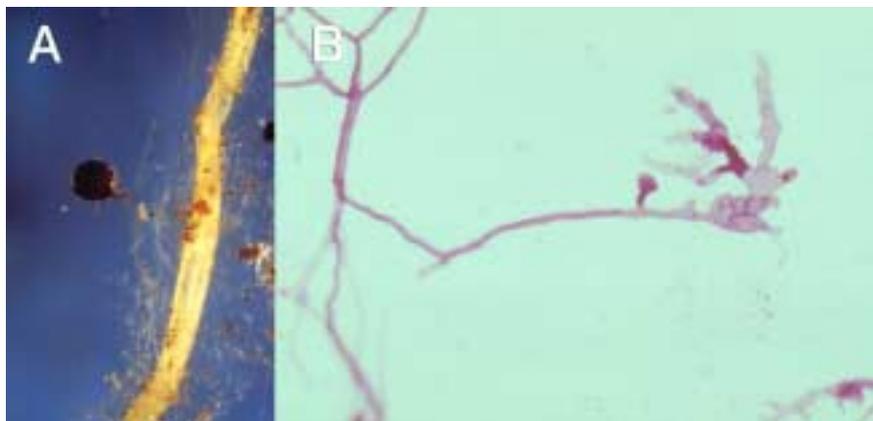
das hifas de FMAs na rizosfera do hospedeiro e adesão à superfície da célula vegetal, resulta em penetração e posterior colonização do tecido cortical. A formação de apressórios depende do genoma da planta hospedeira, de modo que o fungo não é capaz de formar apressórios funcionais em raízes de plantas não-hospedeiras, muito embora dilatações de hifas semelhantes a apressórios possam ser observadas quando o fungo é colocado próximo às raízes (figura 5). Esses resultados sugerem a existência de fatores essenciais para a completa diferenciação das hifas em apressórios funcionais (Giovannetti et al., 1993). Nagahashi & Douds (1997) observaram que a diferenciação de hifas em apressórios é dependente do reco-

nhecimento específico da parede de células epidérmicas em plantas hospedeiras.

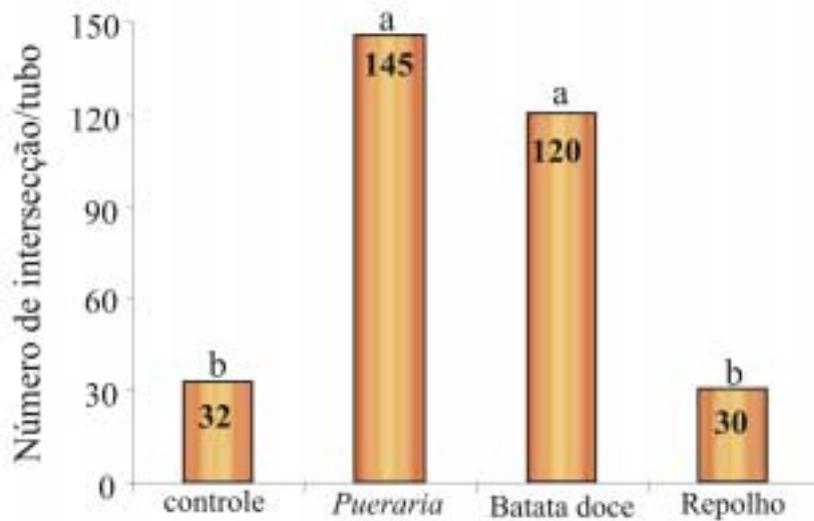
O processo de colonização, propriamente dito, tem início na superfície da raiz, com a penetração resultante da combinação de pressão mecânica e degradação enzimática parcial da parede celular vegetal. A produção de enzimas hidrolíticas como pectinases, celulases e hemicelulases por FMAs tem sido documentada e pode ser essencial para o desenvolvimento da simbiose. A colonização intrarradicular é limitada aos tecidos externos à endoderme, e se dá pelo crescimento inter- e intracelular das hifas. O crescimento intracelular inicial é caracterizado pela formação de enovelamentos de hifas transcelulares e pela

invaginação da membrana plasmática vegetal, de modo que não existe comprometimento da integridade das células hospedeiras. Esse processo é acompanhado também pela deposição de material semelhante à parede celular vegetal ao redor da hifa, criando uma região apoplástica (interface) com características bioquímicas específicas (figura 7). Em algumas células corticais, hifas intracelulares se diferenciam em arbúsculos. Durante esse processo, a parede celular fúngica se torna amorfa, desaparecendo as cadeias de quitina cristalina. Adicionalmente, intensa síntese de membrana plasmática, fragmentação do vacúolo, aumento do volume de citoplasma, decréscimo no número de amiloplastos, movimentação do núcleo, rearranjo do citoesqueleto e aumento da atividade de transcrição gênica são também alterações observáveis durante o desenvolvimento dos arbúsculos (Bonfante & Perrotto, 1995).

Alterações bioquímicas no fungo e no hospedeiro ocorrem não somente durante o desenvolvimento de arbúsculos, mas também durante o processo de colonização intrarradicular. Evidências de alterações do metabolismo do fungo são dadas pelas observações da atividade e localização de ATPases e da atividade de fosfatase alcalina vacuolar (Saito, 1995). Durante o crescimento de hifas de esporos germinados, ATPases ativas são localizadas próximo à extremidade das hifas, enquanto em hifas intercelulares e nos arbúsculos elas se localizam ao



**Figura 5.** Esporo germinado e crescendo na rizosfera de uma planta hospedeira (a) e resposta induzida pela presença de componentes de exsudatos da planta (b)



**Figura 6.** Efeito da presença de suspensão de células de plantas hospedeiras e não hospedeiras no crescimento micelial assimbiótico da *Gigaspora gigantea* em meio de cultura (Dados de Paula & Siqueira, 1990)

longo de toda a membrana plasmática fúngica. Já a atividade de fosfatase alcalina vacuolar é maior durante o processo de colonização das raízes, comparada à atividade em hifas proveniente de esporos germinados. No hospedeiro, a expressão diferencial de vários genes envolvidos na defesa vegetal contra o ataque de patógenos, avaliada com base em atividades enzimáticas, acúmulo de proteínas e/ou de mRNAs, tem sido observada durante o desenvolvimento das MAs, podendo ter papel fundamental no controle da colonização intrarradicular (Lambais, 2000).

O crescimento de FMAs no interior das raízes parece ser um processo “controlado”, já que a colonização de tecidos meristemáticos e/ou de vasos condutores não é observada. Adicionalmente, nem todas as células corticais são infectadas e a diferenciação de hifas terminais em arbúsculos ocorre somente em algumas das células colonizadas. No entanto, os fatores atuantes nesse controle são desconhecidos. A regulação do desenvolvimento e da funcionalidade das MAs envolve uma complexa troca de sinais entre os simbiossomas, a qual pode ser afetada também pelas condições ambientais. O resultado dessa sinalização é a síntese dos simbiossomas, representados pelos arbúsculos, membrana periarbúscular e interfaces características (figura 7).

Apesar da colonização extensiva das raízes pelos FMAs, não há desenvolvimento de sintomas evidentes de resposta de hipersensibilidade (acúmulo de fito-

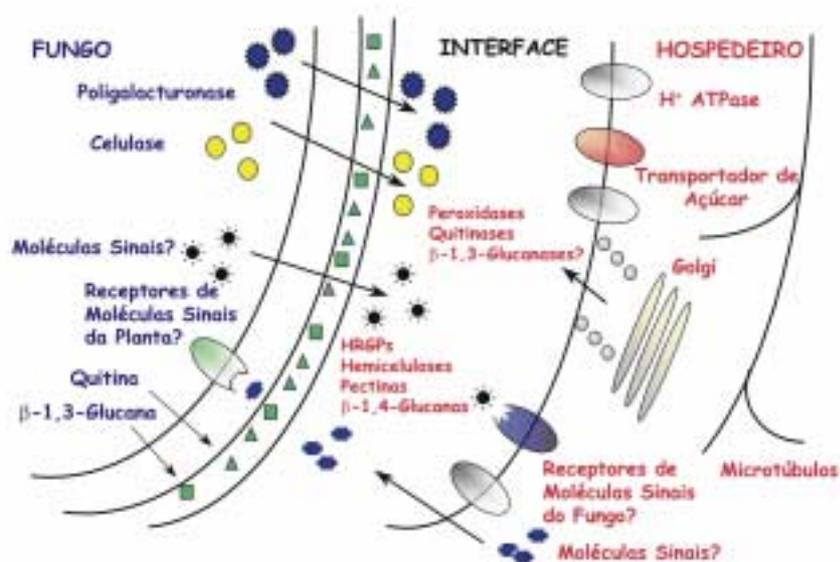
alexinas e morte das células microbianas ou do hospedeiro) em MAs (Gianinazzi, 1991). O acúmulo de fitoalexinas ocorre predominantemente nas fases mais tardias do desenvolvimento da simbiose, e atinge concentrações muito inferiores àquelas observadas em interações com fungos fitopatogênicos. A ausência de reações de hipersensibilidade é, da mesma forma, observada na simbiose entre leguminosas e rizóbios. Aparentemente, esses microssimbiontes são reconhecidos pelos hospedeiros de modo a formarem interações compatíveis de longa duração (Lambais & Mehdy, 1995).

A utilização de modelos de sinalização e regulação gênica que ocorrem nas simbioses leguminosas-rizóbios tem contribuído para melhor entendimento dos processos atuantes em MAs. A existência de fatores comuns entre os dois tipos de simbiose tem sido sugerida pelo fato de que mutantes de plantas de ervilha que não são capazes de desenvolver micorriza típica, e têm a colonização bloqueada em um estágio imediatamente posterior à formação do apressório (*myc* precoces), são também não-nodulantes, i.e., *nod<sup>-</sup>* (Gianinazzi-Pearson et al., 1995). Mutantes que formam nódulos não-fixadores, i.e., *nod<sup>+</sup> fix<sup>-</sup>*, também não desenvolvem micorriza típica. Nesse caso, ocorre penetração e colonização intercelular, mas não há formação de arbúsculos, definindo os mutantes *myc<sup>-</sup> tardios* (Lambais, 1996). Diferente dos mutantes *myc<sup>-</sup> precoces* de ervilha, mutantes de *Lotus japonicus* não-nodulantes têm o desenvolvimento da micorriza bloquea-

do na colonização do córtex, e foram denominados *Coi<sup>-</sup>* (“cortex invasion”) (Wegel et al., 1998). Raízes micorrizadas sintetizam também proteínas imunologicamente relacionadas com nodulinas, proteínas específicas de nódulos de leguminosas (Wyss et al., 1990; Perotto et al., 1994), e fatores *Nod* sintetizados por rizóbios são capazes de estimular a colonização intrarradicular de fungos micorrízicos (Xie et al., 1995).

Tem sido sugerido que a colonização intrarradicular por FMAs depende da capacidade do fungo em evitar a ativação ou mesmo em suprimir o sistema de defesa vegetal. A não ativação do sistema de defesa vegetal pode estar associada à maior atividade de enzimas anti-oxidantes (catalase, por exemplo) em raízes micorrizadas (Lambais, 2000). As atividades de quitinases são induzidas nos estádios iniciais do desenvolvimento da simbiose, e suprimidas posteriormente a níveis inferiores aos observados em plantas sem micorrizas. Essa supressão é atenuada em condições de alto P, onde a colonização é inibida. Em condições de alto P, o acúmulo de mRNAs codificando uma isoforma ácida de quitinase é induzido em células contendo arbúsculos ou sua vizinhança (Lambais & Mehdy, 1993). As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanases são também suprimidas em certos estádios do desenvolvimento da simbiose, e dependem da concentração de P. Em condições de baixo P, tem sido observado acúmulo de mRNAs codificando uma isoforma de  $\beta$ -1,3-glucanase, homóloga a uma isoforma básica de soja, em células contendo arbúsculos e suas imediações. Além da indução localizada, uma supressão sistêmica, em condições de alto P ou em raízes micorrizadas, também tem sido observada (Lambais & Mehdy, 1998). Os mecanismos que controlam o sistema de defesa vegetal podem envolver a regulação diferencial de isoformas de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, em consequência de alterações hormonais e/ou síntese de moléculas elicitóricas/supressoras específicas (Lambais, 2000).

O desenvolvimento de novas técnicas de análise de expressão gênica, como hibridização em microarrays (arranjos ordenados de milhares de genes em lâminas de vidro especiais), análise sistemática de ESTs (Expressed Sequence Tags) e SAGE (Serial Analyses of Gene Expression), bem como a análise de proteomas de raízes micorrizadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa, permitirá um melhor entendimento dos mecanismos que con-



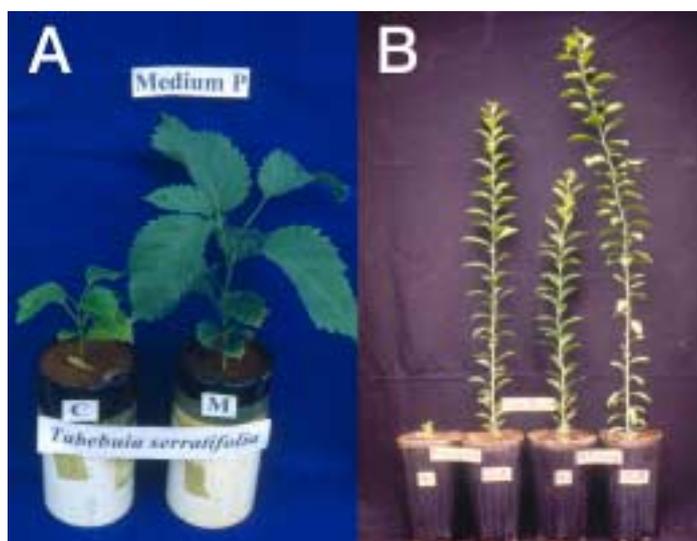
**Figura 7.** Enzimas e sinais moleculares de origem fúngica ou vegetal secretados na interface apoplástica de micorrizas arbusculares

trolam a formação de MAs e poderá contribuir para a efetiva aplicação em larga escala dos FMAs na agricultura.

#### Efeitos no crescimento das plantas

Embora as MAs sejam conhecidas desde o início do século XIX, seus efeitos benéficos para as plantas só foram documentados no século passado, quando verificou-se que certas espécies vegetais apresentavam desenvolvimento retardado e sintomas de distúrbios (deficiências) nutricionais quando cultivadas em solos esterilizados para controle de patógenos. No período de 1950-60, experimentos confirmativos desenvolvidos na Inglaterra e nos Estados Unidos evidenciaram que plantas inoculadas com propágulos de fungos extraídos do solo desenvolviam-se melhor (figura 8), por conterem teores mais elevados de nutrientes minerais, especialmente daqueles pouco móveis no solo, como fósforo, zinco e cobre, cuja absorção é facilitada pelas hifas externas (figura 2). Sabe-se, no entanto, que, devido a efeitos secundários da micorrização, outros nutrientes são também absorvidos em maior quantidade em plantas micorrizadas. Embora os efeitos das MAs sejam mais

consistentes para os nutrientes de baixa mobilidade, os FMAs interferem direta ou indiretamente na absorção de outros elementos como Br, I, Cl, Al e Si e metais pesados. Os efeitos nutricionais dependem da disponibilidade relativa dos elementos no meio de crescimento e da exigência da planta a eles, sendo mais acentuados em condições de deficiência, especialmente de P. A absorção de P tem relação direta com o crescimento da planta, sendo que quando este atinge concentrações próximas da adequada, a colonização das raízes é inibida por mecanismos auto-regulatórios da simbiose, tornando as MAs desnecessárias e



**Figura 8.** Resposta do ipê: c - sem inoculação e m - inoculada (a) e do citros (b) à inoculação com FMAs. Foto de citros cedida por A. Colozzi-Filho-IAPAR- Londrina, correspondendo a plantas sem e com inoculação em solo fumigado e não fumigado

incompatíveis com as condições de excesso de nutrientes no solo.

A maior absorção de nutrientes resulta de inúmeros mecanismos, como aumento na superfície e capacidade de absorção das raízes, maior acessibilidade aos nutrientes, utilização de formas não disponíveis a raízes não-colonizadas, por solubilização e mineralização de nutrientes na rizosfera, e amenização de fatores adversos à absorção, como metais, compostos orgânicos tóxicos e patógenos que atacam o sistema radicular (Siqueira, 1994). A contribuição das micorrizas para a absorção de alguns nutrientes tem sido estimada em 80% para o P, 60% para o Cu e entre 10% a 25% para os demais nutrientes (Marschner & Dell, 1994). Se a difusão química no solo é limitante, as hifas podem aumentar a área de absorção em até 1800% (Okeefe & Sylvania, 1991). Além da alta capacidade e eficiência de absorção de P, as hifas crescem a partir das raízes solo adentro (figura 2), absorvendo este e outros nutrientes fora da zona de esgotamento que se desenvolve próximo à superfície das raízes absorventes, transferindo-os para o hospedeiro nos arbúsculos.

Devido ao fato da disponibilidade de N e P ser o principal fator limitante para o crescimento e a produtividade das plantas, os FMAs apresentam grande potencial como insumo biológico para a agricultura. A inoculação de milho e soja com isolados fúngicos eficientes pode reduzir em 34% e 56% o requerimento externo de fertilizante fosfatado, respectivamente (Siqueira, 1994). Essa redução representa um efeito “biofertilizante equivalente” estimado de 30 e 60kg de  $P_2O_5$  aplicado ao solo, respectivamente, para essas culturas. Considerando-se a área plantada com soja e milho no país, cerca de 28 milhões de ha, e o efeito das MAs em condições de campo, aproximadamente um terço do que é observado em condições controladas, pode-se estimar que a contribuição dessa simbiose para a economia com fertilizantes fosfatados nestas culturas seria da ordem de US\$ 250 milhões no Brasil. O efeito biofertilizante varia para as diferentes culturas em função da exigência nutricional, eficiência de absorção e de uso do nutriente, assim como da capacidade de formar uma simbiose eficiente com o fungo e



**Figura 9.** Atividades de Pesquisa e Desenvolvimento visando à aplicação de fungos micorrízicos arbusculares na agricultura

do nível de fertilidade ou manejo da adubação. Em condições nutricionais ótimas, a colonização intrarradicular é reduzida, assim como os benefícios do fungo. No caso do N, as plantas com micorrizas absorvem mais o N disponível no solo e evidências recentes indicam que os FMAs são capazes de mineralizar N orgânico no solo, facilitando assim a nutrição nitrogenada das plantas. É interessante também o sinergismo que existe entre os FMAs e bactérias diazotróficas. No caso do rizóbio, a nodulação e a quantidade de N fixada pelas leguminosas é favorecida em plantas inoculadas com FMAs. Um dos mecanismos envolvidos nessa relação é a maior absorção de P do solo, nutriente exigido em grande quantidade para a fixação biológica de  $N_2$ . Em solo de cerrado adubado com metade da quantidade de fósforo ótima, a inoculação com FMAs dobrou a quantidade acumulada de N na soja. Em sistema de sorgo consorciado com soja, a inoculação com FMAs favoreceu a transferência de N da soja para o sorgo, de modo que a produção de grãos deste aumentou em 67% e 157% na ausência ou presença de fungo micorrízico, respectivamente (Bressan, 1996).

Além dos efeitos nutricionais, as micorrizas exercem outros papéis sobre a planta hospedeira, os quais são resumidos na **tabela 1**. Plantas micorrizadas são menos danificadas por danos causados por diversos tipos de estresse do solo ou ambientais, facilitando seu estabelecimento e sobrevivência em locais adversos. As MAs são componentes essenciais em programas de recuperação de áreas degradadas e solos poluídos com metais pesados ou compostos orgânicos poluentes.

#### Aplicação dos FMAs na agricultura

Devido à sua natureza ubíqua, à ausência de especificidade hospedeira e à susceptibilidade generalizada das plantas à micorrização, os FMAs apresentam enorme potencial biotecnológico. Alguns exemplos da aplicação desses fungos na agricultura e no reflorestamento são apresentados na **tabela 2**. Sua exploração é viabilizada pelo aumento da taxa de micorrização das plantas, que pode ser conseguido: a) pela inoculação com isolados fúngicos selecionados; b) por práticas de manejo seletivo da população fúngica indígena dos solos agrícolas

e; c) mais recentemente, pela aplicação de compostos estimulantes da micorrização.

A inoculação garante efeitos benéficos, podendo ser efetuada no solo durante a semeadura de plantas anuais e de pastagens, na repicagem de mudas de plantas olerícolas, na formação de mudas de espécies arbustivas ou arbóreas (**figura 9**) com finalidades agrônômica, florestal, de recuperação ambiental e de ornamentação. As respostas da inoculação variam de 10% a 800% em aumento da biomassa vegetal (Siqueira & Franco, 1988), e são maiores, mais consistentes e promissoras em plantas que passam por fase de formação de mudas. No entanto, a aplicação desses fungos em larga escala é ainda muito limitada, principalmente pela falta de inoculante aceito comercialmente. A principal razão para essa falta de inoculante é o caráter biotrófico obrigatório do fungo, que exige que sua propagação seja feita em plantas multiplicadoras. São conhecidos vários sistemas para a multiplicação de propágulos, em solo desinfestado, substratos inertes, sistemas hidropônicos e aeropônicos, e produção de inoculantes. Em condições favoráveis apropriadas, pode-se obter até 200.000 esporos de FMAs por litro de substrato em 4 meses, o que seria suficiente para inocular de 2.000 a 3.000 mudas. O estabelecimento de padrões de qualidade de inoculantes, considerando-se aspectos de pureza e sanidade, é essencial para o desenvolvimento comercial desses fungos. Pacotes tecnológicos para aplicações diversas já foram desenvolvidos, como é o caso da inoculação do cafeeiro (Saggin Júnior & Siqueira, 1996), cuja viabilidade técnica já foi demonstrada no Brasil e sua aplicação é concretizada na Colômbia, onde existem várias empresas produtoras de inoculantes. Mudanças inoculadas com esporos de fungos selecionados (**figura 10**) desenvolvem-se mais rapidamente no viveiro, sobrevivem melhor quando transplantadas para o campo e produzem mais. Aumentos de produção no primeiro ano variam de 30% a 800%, enquanto que, nos anos seguintes, esses efeitos são muito inconsistentes. Valores médios para aumento de produção nos cinco primeiros anos, em diversos experimentos realizados em Lavras e Patrocínio (MG), são da ordem de 50% em relação às mudas sem inoculação na formação. Isso representa um aumento de produtividade acumulada de 35 sacas de café beneficiado por ha no período. Esses estudos revelaram efeitos complementares entre a aplicação de P com a



**Figura 10.** Suspensão de esporos obtida de vasos de multiplicação pronta para uso em inoculações (a) e mudas de cafeeiro micorrizadas preparadas para o plantio no campo (b)

resposta do cafeeiro à micorrização. Sem P não há resposta à inoculação e a dose de P necessária para atingir a produção máxima foi de 207 e 100 g de  $P_2O_5$  por planta, sem e com inoculação na formação, respectivamente. Portanto, em solos de cerrado, a micorriza pode reduzir a necessidade de P do cafeeiro à metade (Siqueira et al 1998).

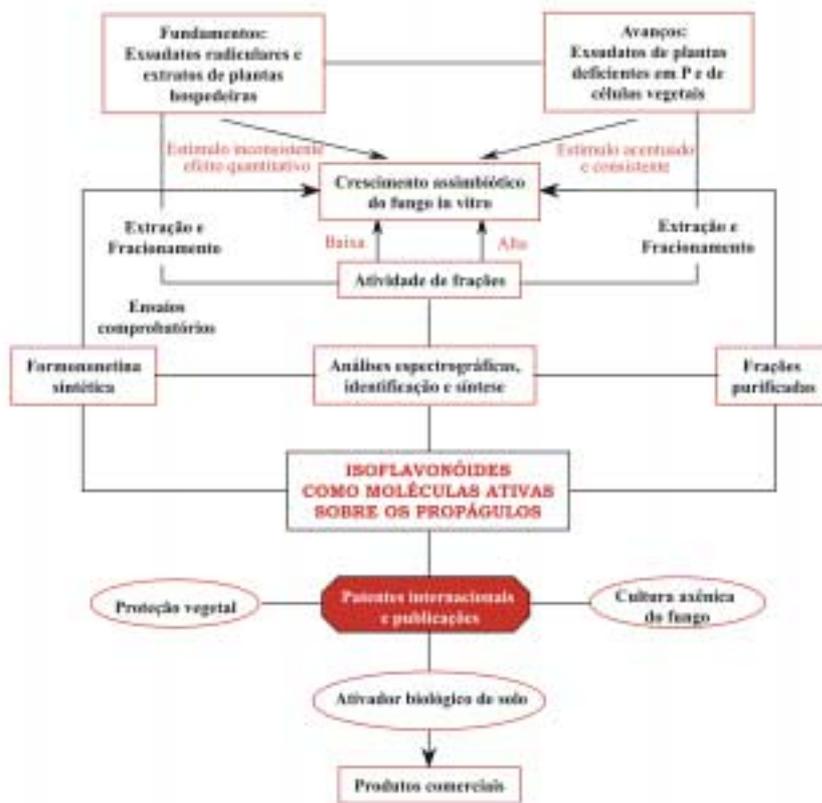
Nos cultivos anuais extensivos, a inoculação com FMAs não é viável, devido ao grande volume de inoculante que seria necessário. Nesse caso, uma alternativa seria o manejo da população

de fungos indígenas que, embora presentes em todos os solos, não se encontram em quantidades suficientes para atingir, em tempo, taxas de colonização necessárias para garantir benefícios às culturas de ciclo curto como milho, soja, feijão. Conhecendo os fatores edáficos e culturais que influenciam os FMAs, suas populações podem ser manejadas. É relativamente fácil aumentar a densidade de propágulos no solo, porém difícil promover alterações qualitativas específicas. Em geral, o cultivo mínimo do solo, o uso reduzido de agroquímicos e o

cultivo com leguminosas favorecem os FMAs. Já, o cultivo com espécies não micorrizadas, como crucíferas e membros da Chenopodiaceae, e monoculturas de gramíneas de uso prolongado reduzem a densidade de propágulos no solo.

A identificação de compostos orgânicos ativos sobre os FMAs em exsudatos de plantas sob estresse nutricional (Nair et al., 1990, Paula e Siqueira, 1990) possibilitou o desenvolvimento de uma nova estratégia para estimular os propágulos desses fungos em solos agrícolas (figura 11). Compostos naturais de alta atividade sobre os FMAs *in vitro* e na micorrização foram encontrados e serviram de base para o desenvolvimento de produtos estimulantes da micorrização (US patent no. 5.002.603, de 03/1991). Durante a década de 90, estudos de P & D conduzidos por pesquisadores da Michigan State University (MSU), nos EUA, e da Universidade Federal de Lavras (MG) permitiram o desenvolvimento de formulações comerciais à base de formononetina sintética (figura 12) como o Myconate™, atualmente produzido pela VAMTech (L.C.C.,EUA), sob licença da MSU. Em experimentos realizados em Lavras (MG), a aplicação de 60 a 100 g de Myconate no solo ou na semente aumentou a produtividade do milho de 8,0 t ha<sup>-1</sup> no controle para 10,4 t ha<sup>-1</sup> no melhor tratamento, correspondendo a 37 sacas ha<sup>-1</sup> (figura 13). Respostas semelhantes foram encontradas para a soja no Brasil (figura 12) e para esta e outras culturas em outros países (Nair et al 1999). Devido à predominância de solos pobres e à alta exigência de P das culturas, o Brasil apresenta enorme potencial para essa tecnologia, a qual já foi licenciada para uma empresa nacional do ramo de insumos biológicos. Testes finais de campo estão sendo realizados visando ao registro e à comercialização do Myconate. Para obter-se sucesso com o emprego de produtos à base de isoflavonóides é importante considerar: a) a cultura deve ser micorrizada e apresentar alta compatibilidade com os fungos indígenas; b) deve haver propágulos viáveis no solo, porém em densidade abaixo da necessária para atingir máxima colonização; c) as condições nutricionais ou ambientais devem impor algum grau de estresse para garantir os benefícios da melhor micorrização; d) a viabilidade tecnológica depende de benefícios consistentes na produtividade e/ou redução no uso de insumos, como os fertilizantes fosfatados.

A aplicação dos FMAs em larga escala



**Figura 11.** Representação esquemática das etapas da descoberta de substâncias vegetais bioativas e desenvolvimento de produtos estimulantes da micorrização



**Figura 12.** Formononetina pura e incorporada em veículo para aplicação (a), lavoura experimental de milho tratada com Myconate (b), produção de soja em Lavras-MG (c), Formononetina (d)

la poderá contribuir para redução no uso de agroquímicos, diminuir as perdas das culturas causadas por estresses diversos e aumentar a produção, e, ao mesmo tempo, favorecer a conservação ambiental. Portanto, os FMAs são importantes componentes da produção agrícola e, se manejados adequadamente, podem contribuir substancialmente para a sustentabilidade dos agrossistemas. Nos trópicos também são componentes importantes na recuperação de áreas degradadas, especialmente quando se emprega a fitorremediação. Sua aplicação como insumo biológico dependerá de vários aspectos:

a) exploração comercial em larga escala: está condicionada a avanços reais para produção de inoculantes, manipulação da população indígena através de manejo específico ou do emprego de produtos estimulantes da micorrização;

b) é necessário ampliar a experimen-

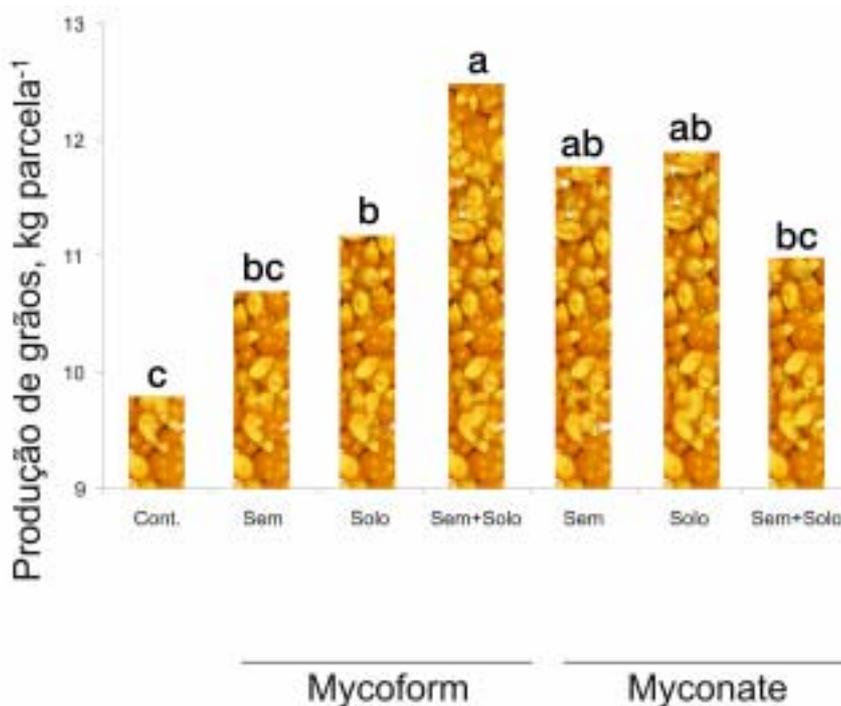
tação, em campo para obter-se resultados experimentais conclusivos e realizar análise da consistência, longevidade e custo/benefício da inoculação;

c) o mercado de fertilizantes, no que diz respeito ao preço relativo do produto, disponibilidade dos adubos para os produtores e esgotamento de matérias-primas industriais, é de grande importância. Preços altos ou relações de troca com produtos desfavoráveis facilitarão a aplicação dos FMAs na agricultura;

d) o enfoque ecológico da produção agrícola visando sustentabilidade, implicará na redução da mecanização e do uso de agroquímicos, facilitando o emprego dos FMAs. A maior conscientização dos agricultores e da sociedade sobre a necessidade de preservação ambiental e conservação de recursos naturais amplia as oportunidades para tecnologias biológicas seguras, como os FMAs, que são aliados ancestrais das plantas no ambiente terrestre.

## Referências

- Bécard, G.; Douds, D.D. & Pfeffer, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:821-825. 1992.
- Bécard, G.; Taylor, L.P.; Douds Jr., D.D.; Pfeffer, P.E. & Doner, L.W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:252-258. 1995.
- Bonfante, P. & Perotto, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130:3-21. 1995.
- Bressan, W. Micorriza, fósforo e nitrogênio no sorgo e soja consorciados (Tese de doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1996. 160p.
- Buee, M.; Rossignol, M.; Jauneau, A.; Ranjeva, R. & Bécard, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:693-698. 2000.
- Douds, D.D. & Nagahashi, G. Signaling an recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Podila, G.K. & Douds, D.D. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St. Paul: American Phytopathological Society Press. p. 11-18. 2000.
- Gianinazzi, S. Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agric. Ecosystems Environ.* 35:105-119. 1991.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Gollotte, A.; Lherminier, J.; Tisserant, B.; Franken, P.; Dumas-Gaudot, E.; Lemoine, M.C.; van Tuinen, D. & Gianinazzi, S. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1):S526-S532. 1995.
- Giovannetti, M.; Avio, L.; Sbrana, C. & Citernesi, S. Factors affecting appressorium development in vesicular-ar-



**Figura 13.** Efeitos de formulações de formononetina aplicadas na semente (sem) ou no solo na produção do milho (Romero, 2000, dissertação de mestrado-UFLA)

- buscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytol.* 123:115-122. 1993.
- Lambais, M.R. & Mehdy, M.C. Spatial distribution of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase transcripts in bean mycorrhizal roots under low and high phosphate conditions. *New Phytol.* 140:33-42. 1998.
- Lambais, M.R. & Mehdy, M.C. Suppression of endochitinase,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:75-83. 1993.
- Lambais, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J.O. *Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas*. UFLA, Lavras, MG. p. 5-38. 1996.
- Lambais, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila, G.K. & Douds, D.D. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St. Paul: American Phytopathological Society Press. p. 46-60. 2000.
- Marschner, H. & Dell, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: Robson, A.D.; Abbot, L.K. & Malajczuk, N. (eds) *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 159 (1):89-102, 1994.
- Morton, J.B. & D. Redcker. 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.
- Morton, J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32:267-324, 1988.
- Nair, M.G.; Balasubramanian, S.; Kelly, J.F.; Schutzki, R.E.; Wenzl, P. & Chávez, A.L. Natural products as potential soil amendments for crop improvement. In: Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.; Furtini Neto, A.E.; Faquin, V. & Carvalho, J.G. *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras:SBCS, UFLA, 1999. p.405-419.
- Nair, M.G.; Safir, G.N. & Siqueira, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:434-439, 1991.
- O'Keefe, D.M.; Sylvia, D.M. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. In: Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, D.G.; Knudsen, G.R. (eds) *Handbook of applied mycology*. New York: M. Dekker, 1991. p.35-53.
- Paula, M.A. & Siqueira, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and products. *New Phytol.*, 115:69-75, 1990.
- Perotto, S.; Brewin, N.J. & Bonfante, P. Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:91-98. 1994.
- Pirozynski, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. *Canadian Journal of Botany* 59:1824-1827, 1981.
- Redecker, D.; Kodner, R. & Graham, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289(5486):1829-1992, 2000.
- Saggin-Júnior, O.J. & Siqueira, J.O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: Siqueira, J.O. (ed) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p.203-254.
- Saito, M. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall. *New Phytologist* 129:425-431. 1995.
- Schussler A., Schwarzott, D. & Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, (in press), 2001.
- Simon, L., J. Bousquet, R. C. Lévesque, & M. Lalonde. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69, 1993.
- Siqueira, J.O. & Franco, A.A. *Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. MEC/ABEAS/FAEPE, Brasília, 1998. 236p.
- Siqueira, J.O. & Klauber Filho, O. Micorrizas arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva. In: Novais, R.F., Alvarez V.H. & Schaefer, C.E. (eds) *Tópicos em Ciência do Solo*. v.1, Viçosa:SBCS, 2000. p.235-264
- Siqueira, J.O. Micorrizas arbusculares. In: Araújo, R.S. & Hungria, M.(eds) *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, DF, EMBRAPA-SPI, 1994. p.151-194.
- Siqueira, J.O.; Colozzi-Filho, A. & Oliveira, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 24(12):1499-1506, 1989.
- Siqueira, J.O.; Safir, G.R. & Nair, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.* 118:87-93. 1991.
- Siqueira, J.O.; Saggin-Júnior, O.J.; Flores-Aylas, W.W. & Guimarães, P.T.G. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*, 7:293-300, 1998.
- Siqueira, J.O.; Sylvia, D.M.; Gibson, J. & Hubbell, D.H. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microbiol.* 31:965-972, 1985.
- Smith, S.E., & D.J. Read. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, 1997. 605p.
- Staples, R.C. & Macko, V. Formation of infection structures as a recognition response in fungi. *Exp. Mycol.* 4:2-16. 1980.
- Trappe, J.M. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. G. Safir (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. 1987, p.5-25.
- Wegel, E.; Schauser, L.; Sandal, N.; Stougaard, J. & Parniske, M. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:933-936. 1998.
- Wyss, P.; Boller, T. & Wiemken, A. Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by a mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) in soybean roots. *Experientia* 47:395-399. 1991.
- Wyss, P.; Mellor, R.B. & Wiemken, A. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182:22-26. 1990.
- Xie, Z.-P.; Staehelin, C.; Vierheilig, H.; Wiemken, A.; Jabbouri, S.; Broughton, W.J.; Vögeli-Lange, R. & Boller, T. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.* 108:1519-1525. 1995.