

KELLY DA SILVA COUTINHO DETMANN

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DO
TIPO *DARK SEPTATE* EM PLANTAS NATIVAS DE CERRADO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

KELLY DA SILVA COUTINHO DETMANN

**MICORRIZAS ARBUSCULARES E FUNGOS ENDOFÍTICOS DO TIPO *DARK*
SEPTATE EM PLANTAS NATIVAS DE CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de agosto de 2007.

Prof^a. Aristéa Alves Azevedo
(Co-orientadora)

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Co-orientadora)

Prof. Nairam Félix de Barros

Dr^a. Roberta Boscaini Zandavalli

Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida
(Orientadora)

A Deus, meu porto seguro a quem devo tudo
A minha amada avó, pela presença constante em minha vida
A meu querido pai, pelo carinho e cuidado
A minha querida mãe, exemplo de força e trabalho

A meu amado esposo,
pelo companheirismo, ensinamentos de vida e ser parte de mim

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, por tornar possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

Ao Conselho Nacional de e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Internacional de Educação do Brasil (IEB), pela concessão da bolsa do Programa de Pesquisas Ecosociais no Cerrado (Programa PESCO).

A Professora Andréa, pela orientação e pela confiança.

A minhas co-orientadoras, pela atenção, paciência, amizade e por ensinar com tanta vontade e sabedoria.

A meu amor, Edenio Detmann, por todo amor, respeito, compreensão e ensinamentos acadêmicos.

À minha amada família, pelo amor incondicional, pela compreensão, orgulho e confiança.

A Sílvia e Luiz Cláudio de Barcelos, por terem dado a oportunidade de começar minha vida profissional.

Ao Professor Maurício de Sousa, pelos ensinamentos acadêmicos.

Aos amigos, Marina e Vitor, pela imprescindível colaboração neste trabalho, do início ao fim, pela amizade construída e por tantos momentos de alegria e descontração.

A Tiago pela colaboração durante o experimento.

Às amigas Ana e Carol, por fazerem parte de tantos momentos de alegria e companheirismo.

À Helga, minha “filhinha”, por sempre me receber com tanta alegria e fazer companhia todos os dias.

BIOGRAFIA

Kelly da Silva Coutinho Detmann, filha de Nilton Gomes Coutinho e Sônia Maria da Silva Coutinho nasceu na cidade de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, no dia 07 de fevereiro de 1980.

Em setembro de 2003, graduou-se em Licenciatura em Biologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Em julho de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa submetendo-se à defesa de dissertação em 3 de agosto de 2007.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução	1
Referências bibliográficas	4
Capítulo I - Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo <i>Dark Septate</i> em espécies nativas de Cerrado	
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e métodos	11
Resultados	14
Discussão	15
Conclusões	18
Referências bibliográficas	19
Capítulo II - Mycorrhization and nutritional status of <i>Roupala montana</i> Aubl. (Proteaceae) in Cerrado	
Abstract	28
Introduction	29
Material and Methods	31
Resultes	33
Discussion	38
References	43
Conclusões	47

RESUMO

DETMANN, Kelly da Silva Coutinho; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2007. **Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo *Dark Septate* em plantas nativas de Cerrado** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-Orientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Aristéa Alves Azevedo

A elevada acidez, o intenso intemperismo e os altos teores de alumínio nos solos do Cerrado são fatores limitantes do desenvolvimento vegetal. Em condições de estresses abióticos a associação com fungos micorrízicos auxilia a planta hospedeira na absorção de nutrientes e água do solo. A maior disponibilidade desses elementos para a planta hospedeira pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é determinante na sobrevivência das plantas e na estruturação de formações vegetais. A presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) nas raízes das plantas é outro tipo de associação simbiótica relacionada às condições abióticas como baixa umidade e comprimento do dia. O reduzido número de trabalhos encontrados na literatura dessas associações em espécies de cerrado se deve em parte, pelas condições edáficas e características estruturais radiculares das espécies nativas que dificultam a realização de estudos *in loco*. Neste trabalho teve-se por objetivo estudar a associação de FMAs em espécies de plantas nativas do cerrado. Para isso, foram testados e adaptados métodos para observação das estruturas fúngicas em simbiose em espécies das famílias Annonaceae, Anacardiaceae, Leguminosae, Melastomataceae, Myrsinaceae, Myrtaceae e Rubiaceae coletadas durante a estação seca em cerrado *senso strictu* na Floresta Nacional (FLONA) do município de Paraopeba, Minas Gerais. Amostras radiculares foram submetidas a três tipos de protocolos para observação de estruturas fúngicas. Todas as espécies investigadas encontravam-se colonizadas por FMAs e DSEF, exceto DSEF em *Xylopia aromática*. O melhor método de diafanização foi observado quando as raízes foram autoclavadas a 121 °C em KOH 2 %, por 20 min e, subsequentemente transferidas para solução nova de KOH 2 % por 24 horas à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, em seguida, essas amostras foram imersas em H₂O₂ 2 % por 2 horas. Os arbúsculos foram observados com maiores detalhes após as raízes serem incluídas em resina, seccionadas e

coradas com azul de toluidina. O caráter generalista dos FMAs observado nas espécies vegetais do cerrado *sensu stricto* foi confirmado e sugerido para DSEFs, indicando a importância destas simbioses como estratégia adaptativa às condições de cerrado. *Roupala montana* Aubl. é uma espécie da família Proteaceae com ampla distribuição nas diferentes fitofisionomias do cerrado. Estudos recentes têm relatado estruturas típicas de fungos micorrízicos em condições de estresses abióticos em espécies dessa família tipicamente não micorrizável. A acidez e deficiência dos solos de cerrado provem apropriadas condições para o desenvolvimento e formação de associações micorrízicas em *R. montana*, como observado em outras espécies da família Proteaceae. Assim, este trabalho também teve por objetivo confirmar a presença de fungos micorrízicos arbusculares em *R. montana* crescidas naturalmente em cerrado, correlacionando a frequência de micorrização com o estado nutricional e condições edáficas. Em três repetições, indivíduos de *R. montana* foram coletados na FLONA em *cerrado sensu strictu*, *cerrado sensu strictu* denso e *cerradão* nas estações seca e chuvosa. A micorrização em *R. montana* foi correlacionada positivamente com o teor de P, Al, e Mg, no solo e de P, K e Ca nas folhas, e negativamente com Ca, Mn e N no solo. Os solos de Cerrado são ácidos com altas concentrações de Al, os quais podem inibir o transporte de Ca e K para as plantas, sugerindo que a presença de fungos micorrízicos em *R. montana* é um mecanismo adaptativo de sobrevivência as condições do cerrado brasileiro.

ABSTRACT

DETMANN, Kelly da Silva Coutinho; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Mycorrhizal and Dark Septate endophytic fungi in native Cerrado plants.** Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-Advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Aristéa Alves Azevedo

The high acidity, the intense intemperism, and high aluminum content are limiting factors to plant development in Brazilian *Cerrado*. Upon abiotic stress conditions the association with mycorrhizal fungi can assist the host plant in absorbing nutrients and water from soil. The high availability of these elements to the host plant improved by arbusculares mycorrhizal fungi (AMF) is determinant in plant survival and structuring of plant ecosystems. The presence of dark septate entophytic fungi in plant roots is another type of symbiotic association related to abiotic conditions such as low humid and day length. The reduced number of publications about these associations in cerrado species is mainly a function of edaphic conditions and root structural characteristics of native species which difficult the *in loco* studies of these characters. In this work, it was aimed to study the association between AMF and cerrado native species. It was evaluated and adapted methods for fungal structures observation in symbiosis with Annonaceae, Anacardiaceae, Leguminosae, Melastomataceae, Myrsinaceae, Myrtaceae and Rubiaceae families, which were collected during dry season on *senso strictu* Cerrado in Floresta Nacional (FLONA) in the municipal district of Paraopeba, Minas Gerais State. Root samples were submitted to three protocols for fungal structures observation. All evaluated species were colonized by AMF and dark septate fungi, except *Xylopia aromatica*, which not presented dark septate structures. The best diaphanization procedure was obtained when the root samples were autoclaved at 121°C by 20 minutes in a 2% KOH solution and transferred to a 2% KOH solution by 24 hours at room temperature. This procedure was repeated twice and, after that, the samples were submerged in a 2% KOH solution for 2 hours. The arbuscules were observed with more detail after been included in resin, sectioned and stained with toluidine blue. The non-specific

characteristic of AMF observed in *sensu stricto* Cerrado species was confirmed and suggested for dark septate associations. It indicates that these associations were important as adaptive strategies to cerrado conditions. *Roupala montana* Aubl. is a species from Proteaceae family which presents a large distribution on different phytophysionomies of cerrado. Recent studies have been showed that several mycorrhizal fungi structures occurred in these species said to be typically non-mycorrhizal. The low pH and nutrients deficiency in *cerrado* soils propitiate good conditions for development and establishment of mycorrhizal association in *R. montana*, as observed in other Proteaceae species. Therefore, in this work it was also aimed to confirm the presence of AMF in *R. montana* specimens growing at natural cerrado conditions, and correlated the mycorrhizal frequency with nutritional status and edaphic conditions. Three individuals of *R. montana* were collected in FLONA on *cerrado senso strictu*, *dense cerrado senso strictu*, and *cerradão* during dry and rain seasons. The mycorrhizal occurrence was positively correlated with P, Al, and Mg contents in the soil, and P, K, and Ca in the leaves, and negatively correlated with Ca, Mn, and N contents in the soil. The *cerrado* soils are acid and have high Al contents which can inhibit the transport of Ca and K to the plants. In this way, the presence of mycorrhizal fungi in *R. montana* could be a adaptive mechanism for plant surviving under Brazilian *cerrado* conditions.

INTRODUÇÃO

A vegetação savânica mais rica no mundo em biodiversidade é a do bioma do Cerrado brasileiro. A distribuição de seu domínio estende-se por mais de 10 estados brasileiros, em uma área de 204 milhões de hectares que totalizam 23 % do território nacional (Coutinho, 2002).

No Brasil, o termo cerrado é comumente utilizado para referir-se ao complexo fisionômico da savana brasileira que se distribui de formações campestres a florestais. A manutenção e a distribuição das diferentes fitofisionomias são comumente relacionadas a fatores edáficos e topográficos, profundidade do lençol freático, além da ocorrência de fogo (Eiten, 1972; RADAMBRASIL, 1981; Oliveira-Filho *et al.*, 1990; Haridasan, 1992). Ecologicamente, o cerrado pode ser definido como uma vegetação ecotonal (campo sujo, campo cerrado e cerrado *stricto sensu*) entre dois extremos de um gradiente fitofisionômico, o campo limpo e o cerradão (Figura 1) (Coutinho, 1978; Pivello & Coutinho, 1996).

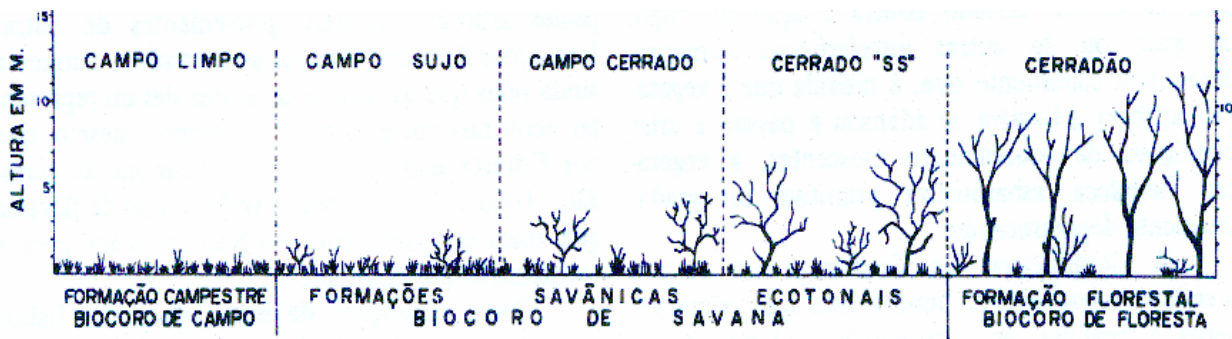


Figura 1: Esquema de um gradiente fitofisionômico do cerrado. ss: *strictu sensu*

O clima da região é caracterizado como tropical úmido, com verão chuvoso e estação seca de abril a setembro coincidindo com o inverno. As temperaturas médias anuais entre 19° e 24° C e precipitações periódicas com índice pluviométrico médio, que varia de acordo com os locais, de 1100 a 1850 mm anuais (Golfari, 1975).

Em sua maioria, os solos do cerrado são profundos, bem drenados, de média a baixa fertilidade, moderadamente a fortemente ácidos e geralmente com altos teores de alumínio

(Haridasan, 1992). Em boa parte, sua forte acidez é devida ao intenso intemperismo e lixiviação de bases e predomínio do alumínio no complexo de troca catiônica (Ritchie, 1994; Kochian et al., 2004). Essas condições correspondem a solos de baixa fertilidade o que é fator limitante do desenvolvimento vegetal no cerrado (Arens, 1971).

A toxidez por Al, a baixa disponibilidade de minerais, o gradiente de luminosidade, os altos valores de irradiação solar e as altas temperaturas afetam a locação de carbono das plantas e determinam grande investimento em estruturas subterrâneas e estratégias para superar condições estressantes do cerrado (Franco & Lüttge 2002). A formação de micorrizas é um importante mecanismo radicular que auxilia as plantas na absorção de nutrientes e água do solo. O benefício da associação para a planta surge do aumento na extensão da superfície de captação, enquanto que, em troca, o fungo é subsidiado com carboidratos fotossintéticos (Herrman *et al.*, 2004). Contudo, as respostas das plantas à micorrização variam conforme a identidade dos simbiontes, tanto pelas diferentes habilidades fúngica em induzir micorrização e absorção de nutrientes quanto na intensidade das respostas de defesa do vegetal ao próprio fungo (van der Heijden *et al.*, 1998).

A presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) nas raízes das plantas é outro tipo de associação simbiótica que está relacionada às condições abióticas como baixa umidade e comprimento do dia (Barrow & Aaltonen, 2001). Contudo, o benefício da associação com os DSEFs para a planta hospedeira ainda não é totalmente conhecido, apesar de estudos terem demonstrado que eles podem apresentar uma associação mutualista similar às micorrizas (Lingfei et al., 2005).

Para a vegetação nativa do cerrado a baixa disponibilidade no solo de nutrientes como Ca, P, S, e N direciona os carboidratos produzidos pela fotossíntese à formação de componentes estruturais, como súber espesso e compostos fenólicos (Arens, 1963). A observação de estruturas fúngicas nessas raízes é dificultada pela presença desses compostos, pois eles resistem ao processo de diafanização em hidróxido de potássio (Brundrett et al., 1996).

As características de solo e clima também podem influenciar a comunidade fúngica. O pH, a salinidade e os teores de fósforo e nitrogênio disponíveis para as plantas foram relatados como determinantes na distribuição espacial de fungos micorrízicos (FM) em florestas boreais (Escudeiro & Mendoza, 2005). Em geral, o aumento do pH, na salinidade

e na disponibilidade de nutrientes no solo reflete em menor colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (Abbott & Robson, 1991).

Escudeiro & Mendonza (2005) verificaram que a concentração de nitrogênio e fósforo em plantas difere muito ao longo de um gradiente de disponibilidade de nutrientes no solo. Outros estudos sugerem que a participação de fungos micorrízicos é determinante na estruturação de ecossistemas, desde dominância de espécies à sua distribuição (Hartnett & Wilson, 2002; Chardhry *et al.*, 2005; Toljander *et al.*, 2006). Tais estudos justificam especulações de que a habilidade de fungos micorrízicos em obterem nutrientes pode ser o fator determinante na estruturação de formações vegetais e sobrevivência de algumas espécies.

As informações de micorrização em espécies vegetais no cerrado são escassas. Em levantamento das espécies de plantas do cerrado, localizado em Rio Claro SP, Thomazini (1974) observou colonização micorrízica em espécies dos gêneros *Tabebuia*, *Caryocar*, *Byrsonima*, *Miconia*, *Palicourea*, *Tocoyena*, *Erytroxylum*, *Annona* e *Bauhinia*. Em outro levantamento, também em área de cerrado, localizado em Brasilândia, MG, Carneiro *et al.* (1998) observaram em espécies das famílias Annonaceae, Caryocaceae, Clusiaceae, Leguminosae, Papilionoideae, Malpighiaceae e Rubiaceae uma frequência de 1 a 19 % de colonização por fungos micorrízicos. Durante esse levantamento os autores não observaram a ocorrência de fungos micorrízicos nas espécies *Baubinia pulchella* L.(Leguminosae), *Dimorphandra mollis* Benth (Mimosoideae), *Machaerium acutifolium* Vogel (Papilionoideae) e *Qualea grandiflora* Mart (Verbenaceae).

R. montana (Proteaceae) é uma espécie sempre-verde de ampla distribuição no cerrado. Espécies da família Proteaceae são caracterizadas por possuir raízes proteóides e ausência de micorrização (Lamont, 2003). Contudo, trabalhos recentes têm relatado a ocorrência de fungos micorrízicos em espécies dessa família crescidas em solo contaminado por níquel e com baixo teor de fósforo (Boulet & Lambers, 2005, Pattinson & McGee, 2004). Em tais estudos, os autores questionaram o favorecimento dessa simbiose para a espécie vegetal estudada pela pouca quantidade de arbúsculos observados.

Este trabalho visou verificar a presença de fungos micorrízicos em espécies vegetais de importantes famílias do cerrado e nas raízes de *Roupala montana* em diferentes

fitofisionômicas de cerrado e correlacionando-a com o estado nutricional das plantas e fertilidade do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.; ROBSON, A. (1991). Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agric Ecos Envir*, 35: 121-150.
- ARENS, K. (1971) As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. SIMPOSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo, 1971, p.254.
- ARENS, K. (1963) As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. p 285-303. In Ferri, M. G. (Coord.), Simpósio sobre o Cerrado. São Paulo, EDUSP.
- BARROW, J.R.; AALTONEN, R.E. (2001) Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11:199–205.
- BOULET F.M.; LAMBERS, H. (2005) Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi colonization in cluster roots of *Hakea verrucosa* F. Muell (Proteaceae), and its effect on growth and nutrient acquisition in ultramafic soil. *Plant Soil* 269:357-367
- BRUNDRETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. (1996) Working with mycorrhizas in forest and agriculture. Gamberra, Pirie, 374p
- CARNEIRO, M.; SIQUEIRA, J.; MOREIRA, F.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S.; JUNIOR, O. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *CERNE*, 4:129-145, 1998.
- CHARDHRY, M.S.; BATOOL, Z.; KHAN, A.G. (2005). Preliminary assessment of plant community structure and arbuscular mycorrhizas in rangeland habitats of Cholistan desert, Pakistan. *Mycorrhiza*, 15: 606-611.
- COUTINHO, L.M. (1978). O conceito do Cerrado. *Rev Bras Bot*, 1: 17-23.
- COUTINHO, L.M. (2002). O bioma do cerrado. In: Aldo Luiz Klein (Eds.) Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. São Paulo: Ed. Unesp, Imprensa Oficial do Estado, p.77-92.

- EITEN, G. (1972). The cerrado vegetation of Brazil. *Bot Rev*, 38(2): 201-338.
- ESCUDEIRO, V.; MENDOZA, R. (2005). Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza*, 15: 291-299.
- FRANCO, A. C.; U. LÜTTGE. (2002). Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, 131: 356-365.
- GOLFARI, L. (1975). Zoneamento ecológico do estado de Minas Gerais para reflorestamento. Belo Horizonte, Série Técnica, Minas Gerais, 65p
- HARIDASAN, M. (1992). Observations on soils, foliar nutrient concentration and floristic composition of cerrado and cerradão communities in central Brazil. In: P.A. Furley; J. Proctor; J.A. Ratter (eds.). *Nature and Dynamics of Forest-Savanna Boundaries*. London, Chapman & Hall Publishing, p.171-184.
- HARTNETT, D.C.; WILSON, G.W.T. (2002). The role of mycorrhizas plant community structure and dynamics: lessons from grassland. *Plant Soil*, 244: 319-331.
- van der HEIJDEN, M.G.A.; KILRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396:69-72.
- HERRMAN, S.; OELMMULLER, R.; BUSCOT, F. (2004). Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak micronutrients and *Piloderma croceum* influence on plant development and photosynthesis. *J Plant Physiol*, 161(5):509-17
- KOCHIAN L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Ver. Plant Biol*, 55:459-493.
- LAMONT BB (2003) Structure, ecology and physiology of root clusters—a review. *Plant Soil*, 248:1-19
- LACHER, W (2004) *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, RiMa, São Paulo, 531p

- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; SHEPHERD, G.J.; MARTINS, F.R.; STUBBLEBINE, W.H. (1990). Environmental factors affecting physiognomic and floristic variation in an area of cerrado in central Brazil. *J Trop Ecol*, 5: 413-451.
- PATTINSON, G.S.; McGEE, P.A. (2004) Influence of colonisation by an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth of seedlings of *Banksia ericifolia* (Proteaceae) *Mycorrhiza*, 14:119–125
- PIVELLO, V.R.; COUTINHO, L.M. (1996). A qualitative successional model to assist in the management of Brazilian cerrados. *For Ecol Manag*, 87: 127-138.
- RADAMBRASIL (1981). Levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro, Ministério das Minas e Energia 25, folha SD- 22/Goiás.
- RITCHIE, G.S.P. (1994) Role of dissolution and precipitation of minerals in controlling soluble aluminum in acidic soils. *Adv. Agron* 53:47-83.
- THOMAZINI, L.I. (1974) Mycorrhiza in plants of the cerrado. *Plant Soil*, 41:707-711
- TOLJANDER, J.F.; EBERHARDT, U.; TOLJANDER, Y.K.; PAUL, L.R. AND TAYLOR, A.F.S. (2006). Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in boreal forest. *New Phytol*, 170:873-884.

Capítulo I

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DO TIPO *DARK SEPTATE* EM ESPÉCIES NATIVAS DE CERRADO

K.S.C. DETMANN¹, M.N. DELGADO¹, V.P.A. REBELLO¹, T.S. LEITE², A.A. AZEVEDO¹, M.C.M. KASUYA², A.M. ALMEIDA^{1*}

1-Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil; 2-Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: amalmeida@ufv.br

Artigo submetido para publicação na Revista Brasileira de Ciência do Solo.

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DO TIPO *DARK SEPTATE* EM ESPÉCIES NATIVAS DE CERRADO¹

RESUMO

A simbiose entre fungos e raízes de plantas é uma importante adaptação radicular que auxilia as plantas na captação de nutrientes e água do solo, podendo ser determinante na sobrevivência às condições de cerrado. Com objetivo de verificar a presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e fungos endofíticos do tipo *dark septate* (DSEFs) nas raízes de treze espécies arbóreas e herbáceas nativas do cerrado *sensu stricto*, *in situ*, foram testados diferentes métodos para observação das estruturas fúngicas em simbiose. O melhor método de descoloração foi observado quando as raízes foram autoclavadas a 121° C em KOH 2 %, por 20 min com subsequente transferência para solução nova de KOH 2 %, por 24 horas, à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, em seguida, essas amostras foram imersas em H₂O₂ (2 %) por 2 horas. Os arbúsculos foram observados com maiores detalhes após inclusão das raízes em historesina, seccionamento e coloração com azul de toluidina. Todas as espécies investigadas encontravam-se colonizadas por FMAs e apenas em *Xylopia aromatica* não se observou o DSEFs. As espécies herbáceas apresentaram maiores frequências de colonização micorrízica do que as arbóreas. O caráter generalista dos FMAs e DSEFs observado nas espécies vegetais do cerrado *sensu stricto*, sugere a importância destas simbioses como mecanismo adaptativo às condições de cerrado.

Termos de indexação: FMA, DSFE, herbáceas, arbóreas.

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL AND DARK SEPTATE ENDOPHYTES FUNGI IN NATIVE SPECIES GROWING IN CERRADO

SUMMARY

The mutualistic symbiosis between fungi and plant roots is an important root adaptation which helps plants to assimilate soil nutrients and water and can be determinant to plant survival upon cerrado conditions. The aim of this work was to identify the better method for studying *in situ* arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dark septate endophytes fungi (DSEF) in roots of some trees and herbaceous species from cerrado *stricto sensu*. The better method for root clarification was obtained after autoclaving the root samples in the presence of 2 % KOH for 20 min followed by incubation in a new 2 % KOH solution for 24 hs at room temperature. This procedure was repeated twice and, subsequently, the samples were immersed in 2 % H₂O₂ for 2 h. The arbuscules were better observed after including in historesin, sectioned and stained by toluidine blue. All investigated plants species were associated to AMF, and only *Xylopia aromatica* did not present association with DSFE. Herbaceous showed higher mycorrhizal frequency than trees species. Results from this work suggest that symbiosis of cerrado's plants with AMF and DSEF are important adaptation mechanisms regarding environmental factors.

Keywords: AMF, DSEF, shrub, tree

INTRODUÇÃO

A vegetação savânica mais rica no mundo em biodiversidade está no bioma do Cerrado brasileiro (Coutinho, 2002). Esse ecossistema abrange uma área de 204 milhões de hectares distribuídos em mais de 10 estados.

No Brasil, o termo cerrado é comumente utilizado para se referir ao complexo fisionômico que se distribui desde formações florestais a campestres. Os solos do cerrado, em sua maioria, têm boa drenagem, baixa fertilidade, alta acidez e teores elevados de alumínio (Haridasan, 1992). O clima tropical estacional da região é marcado, nitidamente, por um período de *déficit* hídrico que pode chegar a sete meses (Silva et al., 2001).

A baixa disponibilidade de alguns minerais, o gradiente de luminosidade, os altos valores de irradiação solar e as altas temperaturas afetam a alocação de carbono das plantas e demanda grande investimento em estruturas subterrâneas e estratégias para superar condições estressantes (Franco & Lüttge 2002, Larcher, 2004).

O direcionamento de fotoassimilados para a produção de metabólicos secundários é uma estratégia adaptativa comumente utilizada por plantas do cerrado durante o seu desenvolvimento (Arens, 1963; 1971). Os compostos fenólicos são sintetizados, primeiramente durante a rota do ácido chiquímico, e desempenham várias funções importantes na planta como o fortalecimento mecânico de parede celular e defesa contra patógenos (Taiz & Zeiger, 2004).

A formação de micorrizas é uma importante adaptação radicular que auxilia as plantas na absorção de nutrientes e água do solo devido ao aumento da extensão da superfície de absorção, enquanto que em troca o fungo é subsidiado por carboidratos fotossintéticos (Herrman et al., 2004). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) não são específicos, têm habilidade para infectar uma ampla gama de espécies, contudo o grau de benefício entre os associados depende das espécies de fungos e plantas particularmente envolvidas. As micorrizas também podem atuar como componente chave na estruturação de ecossistemas ao possibilitar a comunicação de duas ou mais plantas através das hifas fúngicas (Wardle, 2002). Em programas de reflorestamento, a inoculação de espécies vegetais com fungos micorrízicos também tem sua importância prática ao contribuir para o

crescimento vegetal e reduzir os impactos das condições estressantes (Martins et al., 1999).

A presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) nas raízes das plantas é outro tipo de associação simbiótica que está relacionada a condições abióticas como umidade e comprimento do dia (Barrow & Aaltonen, 2001). O benefício da associação com os DSEFs para a planta hospedeira ainda não está totalmente esclarecido, apesar de estudos terem demonstrado que eles podem apresentar uma associação mutualista similar às micorrizas (Lingfei et al., 2005).

As dificuldades para realização de estudos científicos sobre a micorrização em espécies vegetais do cerrado vão desde a sua coleta até a realização de atividades laboratoriais, justificando o pequeno número de trabalhos encontrados na literatura realizados *in loco*. Como exemplo, cita-se a dificuldade em visualizar as estruturas fúngicas presentes no sistema radicular dessas espécies devido, sobretudo, à sua intensa lignificação e pigmentação. Esses compostos resistem ao processo de diafanização em hidróxido de potássio, colorindo-se com azul de tripano juntamente com as estruturas fúngicas (Brundrett et al., 1996). Apesar de esses autores recomendarem o prolongamento de tempo em KOH para remoção dos compostos fenólicos, eles ressaltam que alguns segmentos radiculares podem ser fragmentados ou simplesmente não clarearem.

Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a presença de associação micorrízica arbuscular e por fungos DSEFs em treze diferentes espécies nativas do cerrado *sensu stricto* e testar métodos laboratoriais para visualização de estruturas fúngicas em seu sistema radicular.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e espécies vegetais

As espécies foram coletadas na Floresta Nacional de Paraopeba-MG, situada nas coordenadas geográficas de 19°20'S de latitude e 44°20'W de longitude. As amostras foram coletadas em cerrado *sensu stricto*, em Cambissolo em julho de 2006.

Em três indivíduos, o sistema radicular de plântulas de 15 a 20cm de altura de *Alibertia edulis* L. C. Rich, *Aeschynomene paniculata* Willd. Ex Vogel, *Chamaescrista*

desvauxii (Collad.) Killip, *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench, *Coccocypselum* sp. P. Browne, *Eugenia dysenterica* DC., *Miconia albicans* (Sw.) Triana, *Myrsine guianensis* (Aubl.), *Palicourea* sp. (Aubl.), *Platypodium elegans* Vog., *Tapirira guianensis* Aubl., *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e *Zornia diphylla* (L.) Pers. foi coletado com solo numa profundidade de 10 cm. Em seguida, o solo foi retirado delicadamente em água corrente com manuseio individual de cada fragmento de raiz para sua imediata fixação em FAA 70 % (Johansen, 1940).

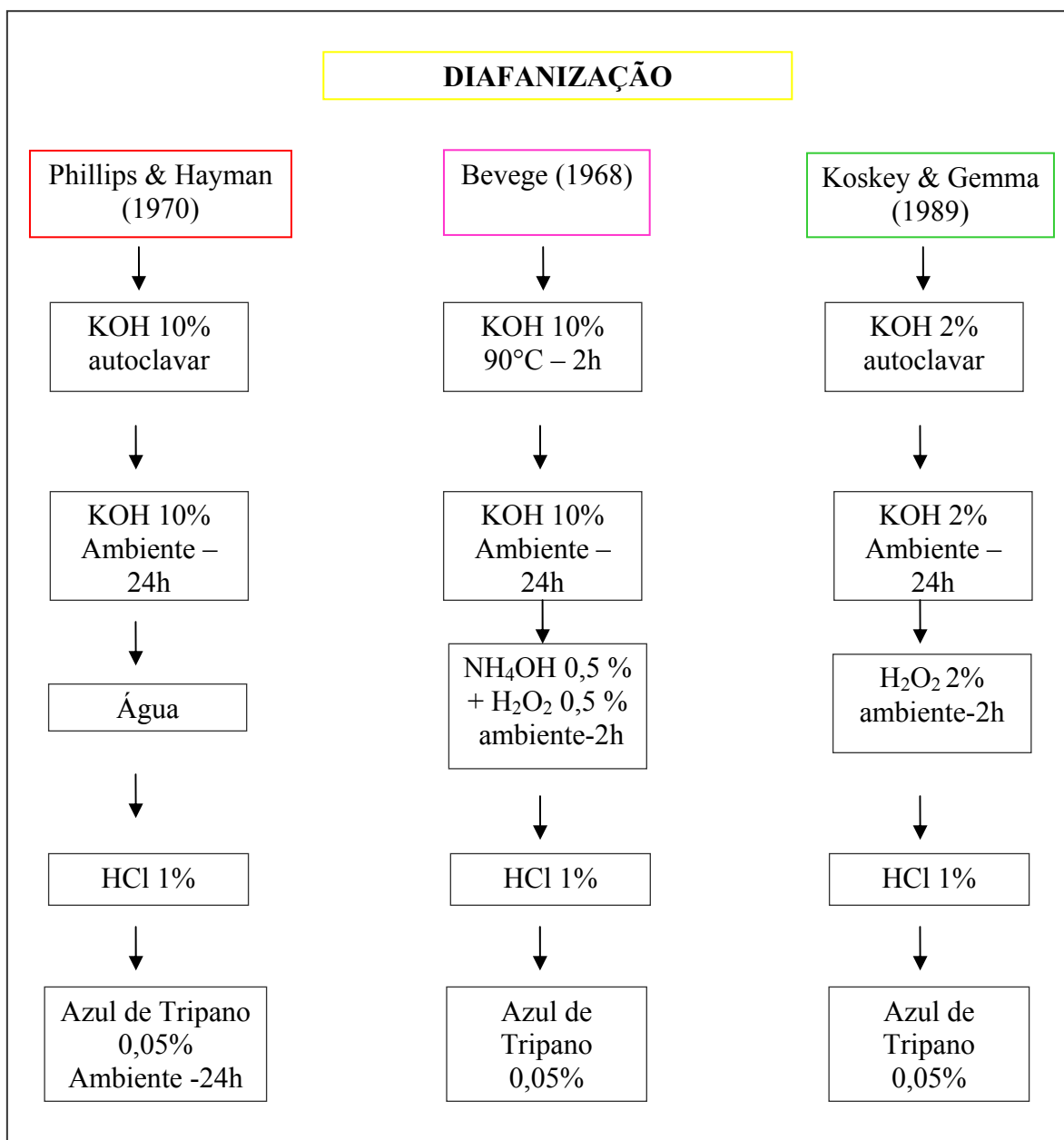
Preparação do material radicular

Para cada espécie, amostras de fragmentos de raízes foram submetidas a três métodos de diafanização. No método 1, foi realizada a descoloração dos fragmentos de raízes pela imersão em KOH 10 %, e autoclavagem a 121 °C por 20 min, seguida de submersão em uma nova solução de KOH 10 %, por 24 h, a temperatura ambiente, e posterior lavagem em água corrente (Phillips & Hayman, 1970). No método 2, os fragmentos foram imersos em KOH 10 % em banho-maria a 90 °C por 2 h, depois transferidos para uma nova solução de KOH 10 % por 24 h à temperatura ambiente, e, então, para uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio amoniacal (NH₄OH 0,5 % e H₂O₂ 0,5 % em água) por 2 h, também em temperatura ambiente (Bevege, 1968). No método 3, os fragmentos foram descorados conforme Koskey & Gemma (1989), modificando KOH 2,5 % por KOH 2 %. As amostras foram autoclavadas a 121 °C em KOH 2 %, por 20 min, com subsequente transferência para solução nova de KOH 2 % por 24 h à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, em seguida, essas amostras foram imersas em H₂O₂ (2 %) por 2 h.

Após a diafanização, as amostras de todos métodos foram neutralizadas em HCl 1% por 24 h (Phillips & Hayman, 1970). As amostras dos métodos 2 e 3 foram coradas com azul de tripano 0,05 % (1:1:1- ácido láctico, glicerol, água) em banho-maria a 70 °C por 15 min (Brundrett et al., 1996), enquanto as amostras do método 1 permaneceram à temperatura ambiente, por 24 h, em azul de tripano 0,05 % (Phillips & Hayman, 1970).

Para avaliar os métodos, segmentos de raízes finas foram coletados aleatoriamente e classificados em uma escala de avaliação de ausente, pouca, mediana e intensa para os

parâmetros de diafanização, fragmentação e coloração da raiz. O comportamento geral foi avaliado em análise de variância conduzido pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).



Esquema dos métodos de diafanização.

Amostras de fragmentos radiculares das espécies foram seccionadas em micrótomo rotativo semi-automático e coradas em azul de toluidina 0,05 % pH 4,7 (O'Brien et al., 1964), após desidratação alcoólica e inclusão em Historesina (Leica).

Determinação da frequência de colonização do sistema radicular

Vinte fragmentos radiculares selecionados foram montados em polivinil lacto glicerol (PVLG) (Koske & Tessier, 1983) na direção perpendicular ao eixo longitudinal da lâmina reticulada (1cm²). As estruturas típicas de fungos MA foram observadas no aumento de 400 vezes em microscópio de luz (OLYMPUS AX70), a cada intercessão de fragmento radicular. Para a categorização quanto à colonização, as espécies vegetais foram classificadas em muito alta, alta, média, baixa e ausente, quando apresentavam grau de colonização >80%, 79- 50 %, 49-20 %, 19-1 %, 0 %, respectivamente, segundo Carneiro et al. (1998).

RESULTADOS

O método 1 proporcionou boa diafanização dos segmentos de raízes das espécies *C. nictitans*, *C. desvauxii*, *P. elegans*, *Palicuria sp* e *Z. diphylla*, entretanto, observou-se fragmentação intensa em *C. nictitans*, *Palicuria sp.*, *T. guianensis*, *X. aromatica* e *Z. diphylla* (tabela 1). No método 2, também foi observada elevada fragmentação das raízes, com exceção de *P. elegans* e *C. desvauxii*. Apenas *A. paniculata* e *A. edulis* não foram totalmente diafanizadas pela utilização deste método (Tabela1). No método 3, os segmentos de raízes apresentaram-se com pouca ou nenhuma fragmentação com diafanização mediana, exceto em *Coccocypselum sp.*, *C. nictitans*, *C. desvauxii*, *P. elegans*, cuja diafanização foi pouca (Tabela 1).

A fragmentação foi o fator determinante para a seleção do método de diafanização das raízes, sendo o método 3 aquele que proporcionou menor fragmentação dos segmentos radiculares da maioria das espécies estudadas (P<5%) (Tabela 1).

Todas as espécies avaliadas apresentaram associação micorrízica evidenciada pela presença de vesículas, hifas e, ou arbúsculos de FMAs. A frequência média de colonização variou com a espécie de planta (Tabela 2). Em geral, a frequência de colonização por FMAs foi maior nas herbáceas do que nas espécies arbóreas (Tabela 2).

As espécies apresentaram em suas raízes FMAs com morfologia tipo *Paris* (Figura 1E-F) e *Arum* (Figura 1G-H), não havendo destaque para frequência de nenhuma forma.

A análise de cortes dos fragmentos radiculares proporcionou melhor visualização das estruturas fúngicas (Figura 1H) do que os fragmentos submetidos à diafanização (Figura G). Compostos fenólicos foram observados em cortes de fragmentos radiculares de *A. edulis* (Figura 1 I).

A. paniculata, *A. edulis*, *C. desvauxii*, *C. nictitans*, *Coccocypselum* sp., *E. dysenterica*, *M. albicans*, *M. guianensis*, *Palicouria* sp. e *P. elegans* encontravam-se colonizadas por DSEFs, evidenciados pela presença de microsclerócios e hifas típicas, coexistindo com FMAs em um mesmo fragmento radicular (Figura 1B-D). Não foi observada a presença de DSEFs em *X. aromatica*.

DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos resistem ao processo de diafanização com hidróxido de potássio e são corados por azul de tripano, mascarando as estruturas fúngicas, por possuírem estrutura química similar ao da melanina, presente nas paredes celulares de fungos (Brundrett et al., 1996). Apesar desses autores recomendarem o prolongamento do tempo de imersão em KOH para remoção dos pigmentos fenólicos da raiz, os mesmos ressaltam que alguns segmentos podem se fragmentar ou simplesmente suas paredes celulares não diafanizarem. A ausência de diafanização foi observada em *Coccocypselum* sp., *Myrsine guianensis*. e *X. aromatica* mesmo quando autoclavados a 121 °C por 20 min em KOH 10 % (método 1), enquanto as demais espécies apresentaram raízes muito fragmentadas quando diafanizadas por esse método (Tabela 1).

As únicas espécies que não tiveram seus fragmentos radiculares danificados em KOH 10 %, em banho-maria, foram *P. elegans* e *C. desvauxii*. Como uma hora em banho-maria a 60 °C equivale a 5 min em autoclave e a solução de KOH 10 % fragmentou totalmente as raízes das demais espécies nas duas condições (Brundrett et al., 1996), isso pode ser um indicativo de que a concentração de KOH é o fator crítico e não necessariamente o tempo de exposição.

Bevege (1968) sugeriu solução alcalina de H₂O₂ como eficientes para remoção de compostos fenólicos, com ressalva de que o tempo necessário para a remoção total nessa solução poder variar entre as amostras. A presença de compostos fenólicos foi observada

em cortes de *A. edulis* (Figura 1 I). Como raiz dessa espécie não diafanizou adequadamente pela utilização do segundo método, mas sim no terceiro, isso pode ser um indicativo de que a imersão por 2 h em solução alcalina de H₂O₂ não tenha sido suficiente.

A utilização de uma menor concentração de KOH por um período maior de tempo seguida de uma rápida submissão a H₂O₂ (método 3) proporcionou o melhor conjunto de resultados: pouca fragmentação e mediana diafanização na maioria das espécies (Tabela 2). A menor intensidade de injúrias confirma as observações de Koskey & Gemma (1989) que sugeriram a concentração de 2,5 % de KOH, para diminuir o risco de fragmentação das raízes. Contudo, a necessidade de pós-descoloração com H₂O₂ para retirada de compostos fenólicos pode afetar estruturas delicadas dos fungos, principalmente os arbúsculos (Koskey & Gemma, 1989). Isso justifica o menor número de arbúsculos nas raízes pós-diafanização (Figura 1G) em comparação com as raízes submetidas a corte (Figura 1H).

As raízes das espécies nativas de cerrado analisadas encontravam-se com alta taxa de micorrização. Isso confirma a ocorrência generalizada da colonização por FMAs, e corrobora os poucos levantamentos realizados nos solos de cerrado que mostram a ocorrência dos FMAs em grande número de plantas nativas (Carneiro et al., 1998; Alvarenga et al., 1999; Carrenho, et al., 2001); além de ser um indicativo de que a micorrização pode desempenhar um papel ecológico importante no desenvolvimento vegetal em ambientes como o cerrado (Siqueira, 2002).

A observação de estrutura fúngica nas treze espécies de plantas analisadas indica que os tipos, *Paris* e *Arum*, podem ser formados em cerrado, embora Smith & Smith (1997) tenham sugerido uma preferência pelo tipo *Paris* quando em condições naturais. Dickson (2004) demonstrou igual dependência para hospedeiro e fungo ao realizar uma série de combinações de 12 plantas e 6 fungos. Porém, não se pode concluir quanto a predominância morfológica dos FMAs nas raízes analisadas uma vez que as espécies do presente estudo podem estar colonizadas por diferentes espécies fúngicas e não foram realizadas análises quantitativas em experimentos controlados.

As plantas fornecem de 10 a 20 % de seus fotoassimilados para manutenção e funcionamento das estruturas micorrízicas (Jakobsen & Rosendahl, 1990). A competição entre fungos e sistema radicular pelos fotoassimilados é responsável pelo maior direcionamento desses para a raiz, o que muitas vezes pode ser observado pela relação peso

seco da raiz/parte aérea em plantas micorrizadas (Berta et al., 1990). O impacto de micorrização no crescimento da planta hospedeira varia conforme fatores edáficos, climáticos e principalmente, da capacidade fúngica de compensar a planta com nutrientes e água por seus fotoassimilados. Como o lento crescimento das espécies arbóreas de cerrado em relação às espécies herbáceas é baseado em estudos do comprimento da parte aérea (Rizzini, 1965; Paulilo et al., 1993), não se pode correlacionar esse fato com frequência de micorrização. Entretanto, outros fatores, como comunidade fúngica atuante e extensão de seu micélio no solo podem ser decisivos.

As condições edáficas e climáticas de cerrado *sensu stricto* ocasionam limitações ao crescimento e estabelecimento das espécies vegetais. A alta irradiância e demanda evaporativa da atmosfera resulta em forte controle de transpiração e diminuição de taxas fotossintéticas em espécies do cerrado por *feedback* (Franco & Lüttge, 2002). Apesar das arbóreas adultas possuírem sistemas subterrâneos que podem atingir o lençol freático, quando jovens, esses indivíduos têm que superar o estresse hídrico imposto pelos primeiros dois metros de profundidade de solo, semelhante às herbáceas (Carreira & Zaidan, 2003). Sendo que, algumas espécies herbáceas investem em estruturas de resistência (bulbos e xilopódios) (Fahn & Cutler, 1992) ou rápido ciclo de vida. Tais estratégias adaptativas requerem elevado custo de fotoassimilados (Dickson, 2000). A formação de micorrizas proporciona maior volume de solo explorado (Siqueira, 2002) podendo ser decisivo no estabelecimento e crescimento inicial de mudas de arbóreas e herbáceas por aumentar a disponibilidade de nutrientes e água, fundamentais na geração e transporte de fotoassimilados (Martins et al., 1999). A frequência de colonização micorrízica nos dois estratos vegetais foi mediana a muito alta, sugerindo sua importância no cerrado *sensu stricto*.

Entre as espécies estudadas, apenas *X. aromatica* não se encontrava colonizada por DSEFs. Embora existam opiniões conflitantes quanto à denominação adequada dessa associação, micorriza ou não, quando observados, os DSEFs coexistem com FMAs nas espécies estudadas (Figura 1B-D). Li & Guan (2007) também observaram a coexistência de FMAs e DSEFs em espécies de *Pedicularis* (Scrophulariaceae). Esta proximidade sugere a existência de íntima relação entre tais fungos, seja de cooperação ou de competição. Infelizmente, as estruturas dos DSEFs continuavam marrom claro mesmo após a coloração

com azul de tripano, o que, segundo Barrow & Aaltonen (2001), é explicado pela baixa concentração de quitina nas paredes fúngicas. Assim, não foi possível verificar a existência de uma dominância fúngica nas raízes das espécies estudadas.

CONCLUSÕES

1- O método 3, cujas raízes foram autoclavadas a 121°C em KOH 2 %, por 20 minutos, e, posteriormente, por duas vezes, imersa em H₂O₂ 2 % por 2 horas é o mais indicado para o estudo de micorrização das espécies nativas de cerrado *sensu stricto*.

2- Todas espécies estudadas encontravam-se colonizadas por FMAs no cerrado *strictu senso*.

3- É freqüente a coexistência de FMAs e DSEFs nas raízes das espécies nativas do cerrado *sensu stricto*.

3- Mais estudos são necessários para confirmar a maior taxa de micorrização em espécies herbáceas comparadas às arbóreas em condições do cerrado.

AGRADECIMENTOS

Ao técnico de nível superior Gilmar Edilberto Valente e ao Professor João Augusto Alves Meira Neto do Departamento de Biologia Vegetal da UFV pelo auxílio na coleta e identificação das espécies vegetais. Ao Professor Edenio Detmann do Departamento de Zootecnia da UFV pela orientação nas análises e interpretações estatísticas.

LITERATURA CITADA

ALVARENGA, M.I.N.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A.C. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de cerrado com diferentes usos. Ciênc. Agrotec., 23:617-625, 1999.

ARENS, K. As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. p 285-303. In Ferri, M. G. (Coord.), Simpósio sobre o Cerrado. São Paulo, EDUSP, 1963.

ARENS, K. As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. SIMPOSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo, 1971, p.254, 1971.

BARROW JR, AALTONEN RE. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11:199–205, 2001.

BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A.; SCANNERINI, S. (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytol.*, 114:207-215.

BEVEGE, D.I. (1968). A rapid technique for clearing tannis and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone spp.* and some records of infection in Australasian plants. *Trans Br Mycol Soc*, 51:808-810.

BRUNDRETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forest and agriculture. Gambera, Pirie, 1996, 374p.

CARNEIRO, M.; SIQUEIRA, J.; MOREIRA, F.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S. & JUNIOR, O. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *CERNE*, 4:129-145, 1998.

CARREIRA, R.C. & ZAIDAN, L.B.P. Estabelecimento e crescimento inicial de *Miconia albicans* (SW.) Triana e *Schizocentron elegans* Meissn., sob fotoperíodos controlados. *Hoehnea*, 30:155-161, 2003.

CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de três espécies de fitobiontes instaladas em área de mata ciliar revegetada. *Acta Bot. Bras.* 15(1): 115-124, 2001.

COUTINHO, L.M. O conceito do Cerrado. *Rev Bras Bot*, 1:17-23, 1978.

COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. In: Aldo Luiz Klein (Eds.) *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Ed. Unesp, Imprensa Oficial do Estado, p.77-92, 2002.

DICKSON, S. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytol*, 163:187-200, 2004.

DICKSON, W.C. *Integrative Plant Anatomy*. San Diego, Harcourt Academic Press, 2000, p. 295-337.

FAHN, A. & CUTLER, D. *Xerophytes*. Berlin, Gebruder Borntraeger. 1992, 180p.

FRANCO, A.C.; U. LÜTTGE. Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, 131: 356-365, 2002.

FROST, P.; MEDINA, E.; MENAUT, J.C.; SOLBRIG, O.; SWIFT, M.; WALKER, B. Responses of Savannas to Stress and Disturbance. *Bio. Inter.*, Special Issue 1o. IUBS, Paris, France, 1986.

HARIDASAN, M. 1992. Observations on soils, foliar nutrient concentration and floristic composition of cerrado and cerradão communities in central Brazil. In: P.A. FURLEY; J. PROCTOR; J.A. RATTER (eds.). *Nature and Dynamics of Forest-Savanna Boundaries*. London, Chapman & Hall Publishing, 2005, p.171-184.

HERRMAN, S.; OELMMULLER, R.; BUSCOT, F.. Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak micronutrients and *Piloderma croceum* influence on plant development and photosynthesis. J Plant Physiol, 161:509-17, 2004.

JOHANSEN, D.A. Plant Microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc. 1940, 523p.

JAKOBSEN, I. & ROSENDAHL, L. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. New Phytol., 115:77-83, 1990.

KOSKE, R.E. & TESTIER, B. A convenient permanent slide mounting medium. Mycol. Soc. of Am. Newsletter, 34:59, 1983.

KOSKEY, R.E. & GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. Mycol. Res., 92: 486-505, 1989.

LACHER, W. Ecofisiologia Vegetal. São Carlos, RiMa, 2004, 531p.

LI, A.-R. & GUAN, K.Y. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from northwest of Yunnan Province, China. Mycorrhiza, 17:103–109, 2007.

LINGFEI, L.; ANNA, Y.; ZHIWEI, Z. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. FEMS Microbiology Ecology. 54: 367–373, 2005.

MARTINS, C.R; MIRANDA, J.C.C. & MIRANDA, L.N. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de *Aristida setifolia* Kunth em áreas degradadas do cerrado. Pesq. Agropec. Bras, 34:665-674, 1999.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373, 1964.

PAULILO, M.T.S.; FELIPPE, G.M. & DALE, J.E. Crescimento inicial de *Qualea grandifolia*. *R. Bras. Bot.*, 16:37-46, 1993.

PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicularárbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc*, 55:158-160, 1970.

RIZZINI, C.T. A flora do cerrado. Análise florística das savannas centrais. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo, 1963. EDUSP, 1963, p.126-177.

SIMARD, S.W. & DURALL, D. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Can J Bot*, 82: 1140-1165, 2004.

SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo, 1963. EDUSP, 1963, p.126-177.

SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE; L.R.M. Frutas do Cerrado. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2001, 179p.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STUMER, S.L. Fungos Micorrízicos Arbusculares. *Biologia, Ciência e Desenvolvimento*, 25:12-21, 2002.

SMITH, F.A. & SMITH, S.E. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol*, 137:373-388, 1997.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3 ed., Porto Alegre, Artmed, 2004, p.316.

WARDLE, D.A. *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. San Diego, Princeton: Princeton University Press, 2002, 457 p.

Tabela 1 - Escores para diafanização (D), fragmentação (F) e coloração (C) para as diferentes espécies vegetais de cerrado avaliadas em função do método de diafanização de raízes.

Espécie	Método 1 ^a			Método 2 ^a			Método 3 ^a		
	D	F	C	D	F	C	D	F	C
<i>Aeschynomene paniculata</i>	+	+	++	0	+++	++	++	0	++
<i>Alibertia edulis</i>	+	+	+	+	+++	+	++	0	++
<i>Chamaescrista desvauxii</i>	++	+	++	++	+	++	+	+	++
<i>Chamaescrista nictitans</i>	++	+++	++	++	+++	++	+	+	++
<i>Coccocypselum sp.</i>	0	0	0	++	+++	++	+	+	++
<i>Eugenia dysenterica</i>	+	+	+	++	+++	+	++	0	++
<i>Miconia albicans</i>	+	+	+	++	+++	+	++	0	++
<i>Myrsine guianensis</i>	0	0	++	++	++	++	++	0	++
<i>Palicourea sp</i>	++	+++	++	++	+++	++	++	+	++
<i>Platipodium elegans</i>	++	+	++	++	+	++	+	+	++
<i>Tapirira guianensis</i>	+	+++	++	++	++	++	++	0	++
<i>Xylopia aromatica</i>	0	+++	++	+++	+++	++	++	0	++
<i>Zornia diphylla</i>	++	+++	++	++	+++	++	++	+	++

0- ausência; +- pouca; ++- mediana; +++-intensa (Carneiro *et al.*, 1998)

^a - Média dos fragmentos avaliados segundo a escala.

Tabela 2: Análise de frequência de colonização micorrízica (Fr), índice de frequência de colonização micorrízica, segundo Carneiro et al. (1998), e presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) em segmentos radiculares de espécies vegetais de Cerrado. nd= número de repetições insuficientes para avaliação.

Espécie	Família	Hábito	Fr (%)	IF	DSEF
<i>Aeschynomene paniculata</i>	Leguminosae	arbóreo	65,0	Alto	presente
<i>Alibertia edulis</i>	Rubiaceae	arbóreo	41,5	Médio	presente
<i>Chamaecrista desvauxii</i>	Leguminosae	herbáceo	81,0	muito alto	presente
<i>Chamaecrista nictitans</i>	Leguminosae	herbáceo	90,0	muito alto	presente
<i>Coccocypselum sp.</i>	Rubiaceae	herbáceo	86,0	muito alto	presente
<i>Eugenia dysenterica</i>	Myrtaceae	arbóreo	28,0	Médio	presente
<i>Miconia albicans</i>	Melastomataceae	arbóreo	39,9	Médio	presente
<i>Myrsine guianensis</i>	Myrsinaceae	arbóreo	76,0	Alto	presente
<i>Palicourea sp.</i>	Rubiaceae	arbóreo	56,5	Alto	presente
<i>Platipodium elegans</i>	Leguminosae	arbóreo	30,0	Médio	presente
<i>Tapirira guianensis</i>	Anacardiaceae	arbóreo	55,0	Alto	nd
<i>Xylopia aromatica</i>	Annonaceae	arbóreo	31,5	Médio	ausente
<i>Zornia diphylla</i>	Leguminosae	herbáceo	40,5	Médio	nd

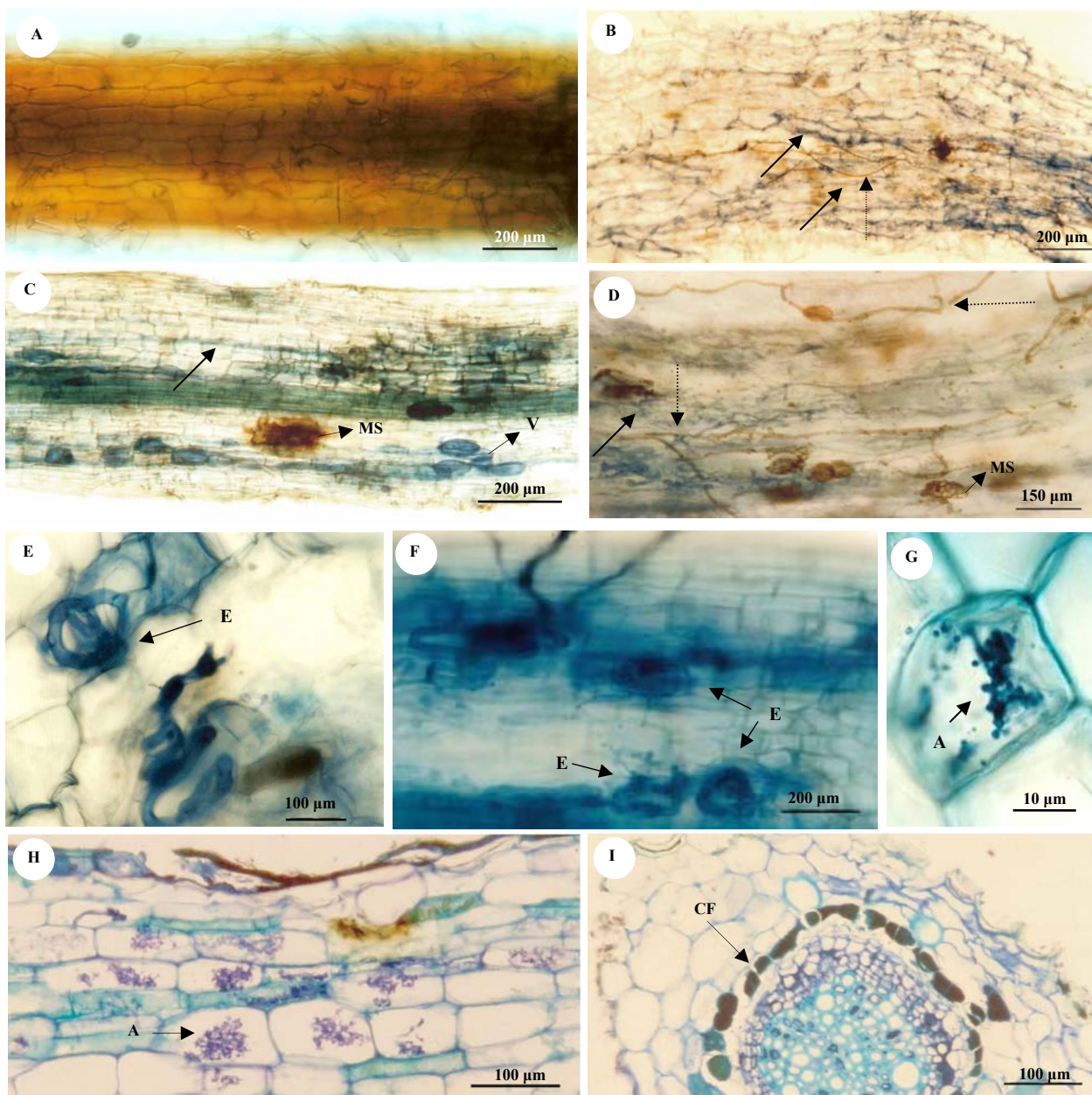


Figura 1: Caracterização de segmentos radiculares de espécies de cerrado. **Fotos A – G:** fragmentos submetidos a diafanização. **Fotos H – I:** cortes longitudinal (H) e transversal (I) corados com azul de toluidina. **A:** raiz de *Chamaescrista desvauxii* com região pigmentada. **B:** hifas de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (**setas cheias**) e fungos endofíticos do tipo *dark septate* (DSEFs) (**setas tracejadas**) na raiz de *Platipodium elegans*. **C:** raiz de *Alibertia edulis* com presença de microesclerócito (MS) e vesículas (V). **D:** hifas de FMAs e DSEFs em raiz de *Coccocypselum* sp. **E-F:** raiz de *Alibertia edulis*, apresentando enovelados (E) do tipo *Paris*. **G-H:** raiz de *Miconia albicans* (G) e *Xylopia aromática* (H), apresentando arbúsculo do tipo *Arum*. **I:** compostos fenólicos (CF) na raiz de *Alibertia edulis*.

Capítulo II

Mycorrhization and nutritional status of *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) in Cerrado

K.S.C. DETMANN¹, M.N. DELGADO¹, V.P.A. REBELLO¹, T.S. LEITE², M.C.M. KASUYA², A.A. AZEVEDO¹, A.M. ALMEIDA^{1*}

1-Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil; 2-Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed: amalmeida@ufv.br

Abstract

Proteaceae species present hairy roots extensively branched and are known as not mycorrhizal. However, a recent field survey found typical arbuscular mycorrhizal (AM) structure in roots of few Proteaceae species, although arbuscules were seldom found. These observations raise the doubt whether the mycorrhizal symbiosis in members of this family is functional or not. *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) was chosen for verifying the presence of AM fungi because of its wide distribution in the physiognomic forms of Brazilian Cerrado. Thereby, *R. montana* specimens were collected during dry and rainy seasons at three different edaphic conditions in Paraopeba, Minas Gerais State. Arbuscules, vesicles and intercellular hyphae were observed in the roots of all plants collected in both seasons and all edaphic conditions. AM colonization was correlated positively with content of P, Al, and Mg, and negatively with Ca, Mn and N in the soil. As Cerrado soils is acidic and have a high Al content, which can inhibit uptake of Ca and K by plants, the results suggest that AM fungi interfere on nutrient uptake and is an mechanism of *R. montana* to survive in Brazilian Cerrado conditions.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, Cerrado, mineral nutrition, Proteaceae, Seedlings

Introduction

The central plains of Brazil are occupied by a complex of seasonal savannas, known locally as *cerrado* (Franco et al. 2005). The *cerrados* of central Brazil comprises widely varying physiognomic forms of vegetation such as *cerradão*, *sensu stricto* cerrado, and *campo sujo*. The *sensu stricto* cerrado is savanna vegetation which is compound by two vegetal strata woody-shrubby and grassy-herb. On the other hand, the *cerradão* is typical forest vegetation (Eiten 1994). The determinant factors for *cerradão* formation are not totally clear yet. According to Goodland (1979), its occurrence would be related with a soil fertility gradient, being more evident on sites with higher nutrient availability.

Like others Neotropical savannas, *cerrado* is characterized by strong rainfall seasonality, coupled with constantly high diurnal air temperatures and dry superficial soil layers (Franco 2002, Franco et al. 2005). Moreover, nutrient deficiency, acidity and high aluminum saturation in these soils, represent an additional limiting factor for plant growth in this region (Handreck 1997, Franco et al. 2005). Conditions where photosynthetic capacity is high but N availability is low favor carbon storage and biomass partitioning to roots rather than leaves (Fichtner et al. 1995). At the plant level, roots: shoot biomass ratio of *cerrado* woody species is fairly large, and underground structures for storage or vegetative propagation are common (Rizzini and Heringer 1962).

Proteaceae is one of the most prominent flowering plant families in the southern hemisphere (Rebelo 1995), which commonly have proteoid roots without mycorrhizas (Lamont 2003). Nevertheless, in a recent field survey, it has been found typical arbuscular mycorrhiza (AM) in roots of few species of this family (Boulet and Lambers 2005, Pattinson and McGee 2004). Vesicles and internal hyphae were reported in roots of *Conospermum longifolium* Sm., *Telopea speciosissima* (Bellgard 1991), *Banksia ericifolia* L.f., *Brassica* sp. L. (G.S. Pattinson), and *Grevillea buxifolia* (Sm.) (Bellgard 1991). In contrast, arbuscules have a very low frequency (Miller et al. 1999, Johnson et al. 2003a), suggesting that the mycorrhizal colonization in Proteaceae roots is likely vestigial and that it might be a passive participant (Miller 2005). However, the true ecological role of the interaction between species of Proteaceae and AM fungi remains unexplored.

Pattinson and McGee (2004) proposed that the association between AM fungi and host plant should be transient in members of Proteaceae family. Colonization could enhance initial P uptake and enable seedlings survival, although the colonization could decline as the seedlings become mature, when they would begin to use other mineral uptake mechanisms, such as proteoid roots and no functional role in Proteaceae (Pattinson and McGee 2004).

Roupala montana Aubl. (Proteaceae) is an evergreen plant of shallow roots whose old foliage persists on tree until the emerging of new leaves (Franco 1998). This species is widely distributed in the different physiognomies of *cerrado* and produces large number of sucker roots, which area used as vegetative reproduction mechanism (Ratter and Dargie 1992, Hoffmann 1998). *R. montana* shows a decline in the maximum CO₂ assimilation rates and stomata conductance in the dry season, while leaf-to-air vapor pressure deficit increases substantially (Franco and Lüttge 2002). On the other hand, the ratio of intercellular to ambient of CO₂ partial pressure remains constant for this species, and the maximum CO₂ assimilation is positively correlated with N and P contents in plant (Franco 1998, Franco et al. 2005). This fact suggests that non-stomata components can limit photosynthesis (Franco and Lüttge 2002). Furthermore, anatomical evaluation of the root system revealed the presence of starch grains, suggesting that at least part of these photoassimilates is stored in the root system as a response to mineral nutrient limitation (Franco 1998, Franco et al. 2005).

P is particularly limiting in *cerrado* soils. The acidity and nutrient deficiency in *cerrado*'s soil provide the appropriated conditions to mycorrhizal development and/or formation of proteoid roots or mycorrhizas. It is expected that *R. montana*, such as another Proteaceae species, would increase the association with arbuscular mycorrhizal fungi maximizing the nutrients uptake and survive to this environmental stressed condition. In this context, the objectives of this work were to verify the presence AM association and to evaluate its correlation with nutritional and edaphic characteristics in *R. montana* (Proteaceae) growing naturally in Brazilian *cerrado*.

Material and Methods

Root sampling and site description

This study was carried out at a protect area located at municipal district of Paraopeba, State of Minas Gerais, Brazil (latitude 19°20'S and longitude 44°20'W) during July 2006 (dry season) and February 2007 (rainy season). The Paraopeba climate has a remarkable variation across region in average annual temperature (from 19° to 22°C), annual deficit hidric (from 60 to 120 mm), and annual precipitation (from 1100 to 1450 mm) and there is a strong dry season during the winter, approximately from April to September (Ratter et al. 1997).

Three *R. montana* seedlings samples were collected in three different areas which correspondent to different physiognomies of *cerrado*: *cerrado sensu stricto*, dense *cerrado sensu stricto*, and dystrophic *cerradão* (Neri 2007). Soils are predominantly oxisols, but variation toward entisols is observed as topography changes plateau to valleys (Neri 2007). Soil and root was performed during dry (July of 2006) and rainy (February of 2007) seasons.

Seedlings were collected using a trowel and a shovel to dig until reaching the adequate depth for obtaining the majority of the root system (generally near to 10 cm). After that, seedling roots were washed, fixed in a FAA solution (formaldehyde:acetic acid:ethanol, 5:90:5, v/v/v), and stored in ethanol 70 %. All leaf back petioles were oven-dried (60°C/72 hours) and stored under room temperature for further chemical analysis.

Preparation of root material and analysis

Colonization of AM fungi was estimated according to the method described by Phillips and Hayman (1970), after root samples have been cut into 1 cm pieces, cleared and stained according to the method proposed by Koskey and Gemma (1989) and modified by Detmann et al. (2007). After mixing, 20 pieces of fine roots were taken randomly, mounted in lactoglycerol on a microscopic slide and analyzed for the presence or absence of FMA structures the data obtained were used to calculate AM colonization frequency.

Roots samples were also submitted to ethyl alcohol dehydrating series and embedding in resin Hystoresin Leica sectioned in rotary microtome (Serie 4050 Micros). Transversal and longitudinal sections were stained with 0.05% Toluidine blue (w/v), pH 4.7 (O'Brien et al. 1964). Light microscopy observations and documentation were carried out an Olympus Ax 70 microscope.

Soil and leaf sampling and analysis

A composite sample per area, containing 3 soil samples taken around the roots of each plant, was analyzed regarding pH, N, K, Ca, Mg, Al, Zn, and Mn contents according to methods of EMBRAPA (1997). In addition, a composite sample per area, containing all leaf samples of each plant, was acid digested (AOAC, 1990) and analyzed regarding contents of P (phosphomolibdate method; Silva and Queiroz 2002), Ca, Mg, Al (atomic absorption spectrophotometry), and K (flame spectrophotometry). N contents in the leaves were evaluated using Kjeldhal method (AOAC 1990).

Statistics

The relationship between soil chemical characteristics and percentage of mycorrhizal colonization were evaluated through a partial Pearson correlation analysis according to Steel et al. (1997) and Cruz and Regazzi (2001). Correlation between percentage of mycorrhizal colonization or chemical characteristics of the soil and nutrient content in the plant was evaluated according to the Pearson linear correlation method (Steel et al. 1997). Each variable pair was evaluated through a multivariate model of analysis of variance contained season and area effects (Johnson and Wichern 1998). Correlation coefficients were estimated from residual (co)variance matrix. It was considered 0.05 as critical limit for type I error. The statistical procedures were done using the Statistical Analysis System (SAS).

Results

The soil pH varied from 4.17 to 5.08 in dry season, and from 4.10 to 4.85 in rainy season (Table 1). *Cerrado* soils are acid ($\text{pH} < 5.1$) and present high Al contents. The P and Ca levels are below 8 mg/dm^3 and 0.3 cmol of charges/dm, respectively (Table 1). The analysis of the soil collected around the roots of *R. montana* in the *cerrado* in rainy season indicated lower pH and P, Mg, Zn contents and higher K, Ca, and Al contents compared to dry season (Table 1).

The higher contents of N and P were found in *cerradão* in both seasons (Table 1). In addition, the contents of K, Ca, and Mg in *stricto sensu cerrado* were higher compared to *cerradão* during both dry and rainy seasons, except for Ca in rainy season (Table 1). The Zn and Mn contents in *cerradão* soil were higher than in *stricto sensu cerrado* (Table 1). The Al content in *cerradão* was higher than observed in *stricto sensu cerrado* in rainy season (Table 1).

Table 1. Chemical characteristics of the soil according to season and area effects

Season	Area ^a	Soil Characteristics								
		pH	N	P	K	Zn	Mn	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³
			g/kg ¹		mg/dm ³			cmol _c /dm ³		
Dry	1	4.2	2.35	0.8	14.5	0.50	6.60	0.06	0.07	1.18
	2	5.0	1.38	0.6	83.0	0.54	3.40	0.04	0.11	1.15
	3	5.1	1.62	0.5	64.0	2.00	9.10	0.15	0.52	1.10
	Mean	4.8	1.78	0.63	53.8	1.01	6.37	0.08	0.23	1.14
Rainy	1	4.1	2.35	0.5	26.0	0.20	17.45	0.15	0.05	2.80
	2	4.9	1.50	0.1	53.0	0.70	2.35	0.10	0.05	2.75
	3	4.7	1.46	0.2	125.0	0.40	10.80	0.30	0.50	2.00
	Mean	4.6	1.77	0.27	68.0	0.43	10.20	0.18	0.20	2.52
SEM		0.01	0.04	0.07	1.97	0.09	0.84	0.02	0.02	0.02

^aThe areas are dystrophic *cerradão* (1), *cerrado sensu stricto* (2), and dense *cerrado sensu stricto* (3).

The mycorrhization frequencies in *R. montana* varied from 52 to 72 % (Table 2), with higher frequencies being observed in dry season (Table 2). The leaf nutrient levels, g/kg, in varied between 6 and 10 for N, 0,41 and 0,56 for P, 1,37 and 0,385 for Ca, 3,04 and 5,74 for K, and 1,13 and 1,17 for Mg (Table 2). In a general way, the plants collected during rainy season presented higher leaf contents of N, K, Ca, and Mg (Table 2). Although the Al leaf contents have found to be similar for dry and rainy seasons, it can be observed the contents of this element in *sensu stricto cerrado* were around 68% lower during rainy season when compared to dry season (Table 2).

All plants collected were colonized by AM fungi, showing arbuscules, vesicles, or intercellular hyphae (Table 2; Fig. 1A-F), but proteoid roots were not observed. Arbuscules of both *Arum*- and *Paris*-type were observed in the roots of *R. montana* (Fig. 1E-F). Independent of presence or absence of trichomes, all roots were colonized by mycorrhizal fungi (Fig. 1A). Sometimes, trichome was used as entering point of AM fungi (Fig. 1B).

Table 2. Mycorrhization occurrence (Fr) and chemical characteristics of the plants according to season and area effects.

Season	Area ^a	Plant Characteristics						
		Fr ^b	N ^b	P ^c	K ^c	Ca ^c	Mg ^c	Al ^c
		%	g/kg					
Dry	1	56.8	10.03	0.562	4.512	1.668	1.126	0.368
	2	76.0	6.37	0.426	4.868	3.852	1.300	0.407
	3	70.7	9.13	0.405	3.038	1.372	1.654	0.732
	Mean	67,8	8.51	0,464	4.139	2.297	1.360	0.502
Rainy	1	52,5	11.80	0.540	5.740	3.040	1.430	0.435
	2	54,7	8.53	0.413	5.690	1.947	1.153	0.541
	3	72,9	7.75	0.450	5.465	2.615	1.600	0.495
	Mean	60,0	9.36	0.468	5.632	2.534	1.394	0.490
SEM		2,722	0.22	0,82	0.000	0,000	0.000	0.136

^a/ The areas are dystrophic *cerradão* (1), *cerrado sensu stricto* (2), and dense *cerrado sensu stricto* (3).

Roots of *R. montana* present thick epidermic cell wall, developed cortex with parenchyma cells with irregular shape (Fig. 1C). Dark color material, probably phenolic compounds, was detected in parenchyma cells (Fig. 1D) and crystals of calcium oxalate were observed inside idioblast cells (Fig. 1C).

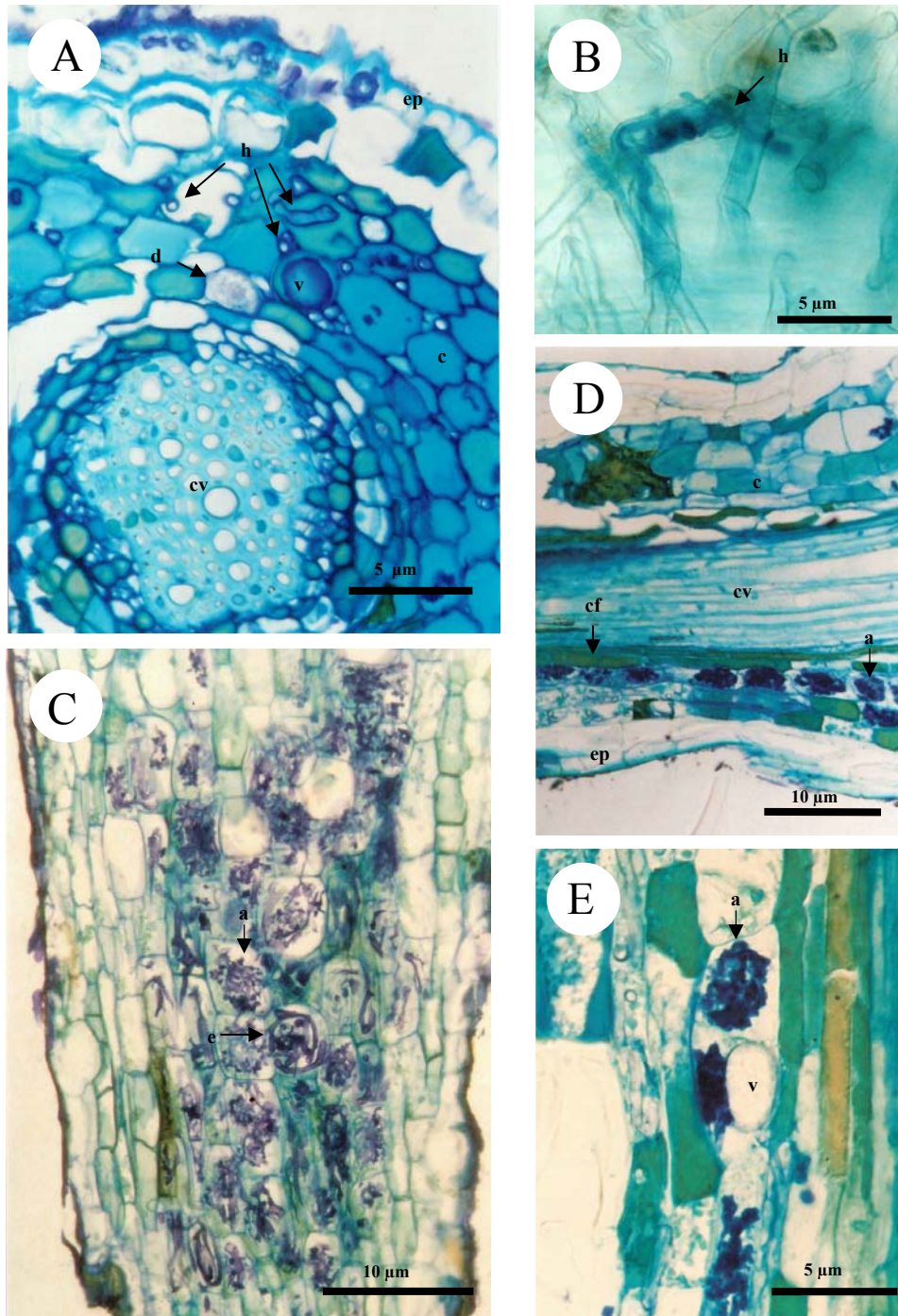


Figure 1: Microscope photographs of roots of *Roupala montana*. **A:** root transversal section with Toluidine blue staining showing (**ep**) thick epidermic cell wall, (**cv**) central vascular tissues (**h**) mycorrhiza hyphae, (**d**) druses, and (**v**) vesicle in the (**c**) cortical cells. **B:** trichome with penetration point in cleared root staining Trypan blue. **C-E:** roots longitudinal sections stained with Toluidine blue. **C:** *Paris*-type mycorrhizal colonization showing (**e**) intercellular coiled hyphae in cortical cells and (**a**) arbuscules. **D:** (**a**) Arbuscules and (**cf**) dark color content, probably phenolic compounds in parenchyma cells. **E:** *Arum*-type mycorrhizal colonization showing (**a**) arbuscule and (**v**) vesicle in cortical cells

AM colonization was positively correlated with P, Al, and Mg, and negatively with Ca, Mn, and N in the soil ($P < 0.05$) (Table 3). P, K, and Ca concentrations in the leaves of *R. montana* increased with increasing in AM colonization ($P < 0.05$) (Table 4). N was the solely mineral nutrient analyzed correlated between soil and chemical characteristics of plant (Table 5).

Table 3. Partial linear correlation between chemical characteristics of the soil and the occurrence of colonization by AM fungi

Soil Characteristics	Partial Correlation	P-Value ^a
pH	-0.438	0.103
P	0.942	<0.001
K	-0.260	0.350
Ca	-0.526	0.044
Mg	0.999	<0.001
Al	0.624	0.013
Zn	-0.030	0.915
Mn	-0.999	<0.001
N	-0.663	0.037

a/ $H_0: \rho = 0$.

Table 4. Adjusted linear correlation between chemical characteristics of the plant and the occurrence of colonization by AM fungi

Plant Characteristics	Correlation ^a	P-Value ^b
N	-0.019	0.480
P	0.614	0.030
K	0.913	<0.001
Ca	0.672	0.017
Mg	0.201	0.289
Al	-0.389	0.134

a/ The partial correlation coefficients were adjusted for season and area effects.

b/ $H_0: \rho = 0$.

Table 5. Adjusted linear correlation between chemical characteristics of plant and soil

Variable	Correlation ^a	P-Value ^b
N	0.646	0.022
P	0.125	0.366
K	0.034	0.463
Ca	-0.002	0.500
Mg	0.371	0.146
Al	-0.234	0.258

a/ The partial correlation coefficients were adjusted for season and area effects.

b/ H₀: $\rho = 0$.

Discussion

The soils of *cerrado sensu stricto*, dense *cerrado sensu stricto*, and dystrophic *cerradão* at municipal district of Paraopeba, State of Minas Gerais are acid ($\text{pH} < 5,1$) (Ribeiro et al. 1999), can be considered very low when compared to values reported by Costa and Araújo (2001) in *sensu stricto cerrado* at Reserva do Panga, Uberlândia, MG (2.86 mg/dm^3 in dystrophic *cerradão* and $1,64 \text{ mg/dm}^3$ in *stricto sensu cerrado*).

The higher concentrations of N, P, and Al, and smaller concentrations of Ca, Mg, and K in the *cerradão* soil compared with *cerrado stricto sensu* soil were also observed by Costa and Araújo (2001) in Reserve of Panga Uberlândia, MG, and by Néri (2007), in Paraopeba, MG. In this way, it can be affirmed that soil in *cerradão* is less fertile than in *cerrado strictu sensu*. However, Kimmins and Krumlik (1974) have discussed an alternative hypothesis, where a poor soil has the probability to sustain a forest production based on exploration of all subjects. In this context, a little pool of nutrients with a high systemic flow rate in an ecosystem could have a higher capacity to sustain a high vegetal productivity compared to a big pool of nutrients, but with a low systemic flow rate. Silva (1993) found in cerrado soils of Triângulo Mineiro higher quantity of non-mobile nutrients in cerrado plants compared to *cerradão* and campo sujo plants. Thus, it must be evaluated together the cycling rate of available nutrients, the pool of nutrients in vegetal mass, and the

chemical reserves in the soil for confirming the fertility gradient hypothesis in cerrado soil, which was proposed by Goodland (1979).

Changes in nutrient availability in soil affect growth and biomass partitioning of *cerrado* woody plants (Franco 2002). N concentration in *R. montana* were similar to the observed by Miranda et al. (1997) in a study of 40 woody *cerrado* species. Miranda et al. (1997) reported that N levels (% of dry matter) in mature leaves were between 0.7% and 1.0% for 33% of this species. The values of P, K, Ca, and Mg content in *R. montana* collected in Paraopeba are in agreement with the values observed by Medeiros and Haridasan (1985). Medeiros and Haridasan (1985) reported that leaf nutrient levels in 8 species in *cerrado* varied between 0.05% and 0.07% for P, 0.14% and 0.80% for Ca, 0.28 and 0.87% for K, and 0.07% and 0.28% for Mg. These leaf nutrient levels are within the range of values reported for sclerophyllous leaves on extremely oligotrophic soils of the upper Rio Negro, Venezuela (Medina et al. 1990; Reich et al. 1995). Future work in the area it studies may provide evidence that *R. montana* became leaves are sclerophyllous no were evaluate in the conditions analyzed.

Proteaceae family was presented since about 100 million years ago and may have been some of the first plants with true non mycorrhizal roots capable of excluding mycorrhizal fungi (Brundrett 2002). Observation of a typical arbuscular mycorrhiza (AM) in the roots of *R. montana*, in both seasons and in different phytosociologies of Brazilian *cerrado*, suggests that this species never lost its entirely capacity for mycorrhizal formation. Furthermore, *Arum* and *Paris*-type arbuscules demonstrate colonization by more than one species of AM fungi.

The absence of proteoid roots in seedlings of *R. montana* in the investigated conditions, indicates that AM association is very important for this species, since other members of this family present proteoid roots, which is hairy rootlets that increase the surface area that greatly enhances uptake of nutrients and water (Purnell 1960, Lamont 2003). However, this consideration should be carefully analyzed, since proteoid roots of *H. verrucosa* (Proteaceae) presents AM colonization (Boulet and Lambers 2005).

The benefit of mycorrhization for the plants is more significant on phosphorous uptake (Lambert et al. 1979). Therefore, the positive effect on P contents in the plant according to increasing in AM colonization in *R. montana* root growing in *cerrado* (Table

5) can be due to its low soil contents (Table 1) and fixation with Al oxides on the surface of clay minerals (Kochian et al. 2004).

The positive correlation between soil P content and AM colonization (Table 3) may be a result of the competition between fungi community and the host plant for available P in soil (Pattinson 2004). Phosphorous concentrations to meet the needs of the cultivated plant, in experimental condition, with basal nutrient solution is in the range of 15-80 mg/dm³ (Fernandes 2006) and *cerrado* soil present as low P concentrations, varying from 0.1 to 0.8 mg dm³ (Table 2).

The infection was low at very low P availabilities (Table 3). It might be early increased in response to added P as observed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) at increasing P additions (0-2.8 mg P dm⁻³) (Abbott et al. 1984, Koide and Li 1990). AM fungi association interferes positively on P contents in *R. montana* plants in an independent way from the soil P content (Table 4 and 5), suggesting that this species control the infection until the level where this association become a mutualistic symbiosis, and the benefit to plant host had been guarantee even as in limited P supply (Koide and Li 1990).

One important question for elucidating the effect of AM on *R. montana* is whether the host plant can regulate fungal colonization of roots in relation to nutrient status of the soil (Erikson 2001). There are several models of mycorrhizal formation (Allen 1991). Firstly the plant may release signal substances, possibly phosphatases, that stimulate fungal colonization as a result of P deficiency in plant. Secondly, the fungi may invade any plant indiscriminately suggested that the relationship between the host and both mutualistic and parasitic fungi is similar, and that the normal behaviour is that the plant rejects any fungi discerning between mutualistic and parasitic fungi (Allen 1991). However, sometimes the rejection fails and mycorrhiza becomes parasitic (Allen 1991). Contrary to this model, the colonization in *R. montana* among several studies (Menge et al. 1978; Koide and Li 1990; Duke et al. 1994), can be reduce when phosphorus level in the soil is either very low or very high, and the benefits of mycorrhizal associations are small. According to Menge et al. (1978) the most important factor for colonization, infection and spore production of the fungi (e.g. *Glomus fasciculatus*) is the concentration of P within the plant and not the P content in the soil.

In soils containing elevated concentrations of toxic metals, mycorrhizas often increase the metal resistance of host plants (Clark and Zeto 2000). This fact could support the positive correlation between *R. montana* mycorrhization and Al contents in the soil. The mechanisms that conferring metal resistance are unclear. Kelly et al (2005) justified the increase in Al resistance by decreased in mobility of this element to aerial part of plant caused by metal chelating in the mycorrhizosphere, metal binding to hyphal cell walls, or by intracellular sequestration in fungal tissues.

The positive correlation between AM colonization and Ca, P, and K contents in the leaves in *R. montana* confirmed increased plant nutrient uptake by mycorrhizal fungi. Mendoza and Borie (1998) explain that the association of AM fungi with plant roots alters plant-soil interactions through the expansion of the surface area of the root for absorption, as well as through the mobilization of nutrients from otherwise unavailable sources. AM mycorrhization effects on plant growth can result directly alterations in carbon allocation and nutrient physiology of the host plant. It can result in colonization or new physiological capacity brought to the symbiosis by AMF. At least, those indirect changes can enhance the host resistance to edaphic stress by increasing availability of nutrients to host plants (Smith and Read 1997).

Despite the fact of nitrogen be another limiting element in *cerrado* soils, AM colonization and N contents in the leaves presented no correlation (Table 5). However, P and N have synergic interaction (Shuman 1994) and N is mobile in plant suggesting the needed of studies of the indirect effects of the elements.

Many calcium oxalate crystal formation as druses were observed in *R. montana* roots despite the fact that *cerrado*'s soils presents low contents of this element (Menezes and Araújo 1963). Druses formation can guarantee a good cell function and keep calcium in low contents in cell cytoplasm because it has a role in membrane of plant cells or a secondary messenger in a lot of metabolic processes (Evans et al. 1991, Franceschi and Nakata 2005). Silva (2005) observed that mycorrhizal roots of eucalypt growing upon controlled conditions form many calcium oxalate crystal compared to non-mycorrhizal plants, suggesting that AM fungi can be responsible for this uptake. On the other hand, it is not possible to correlate the presence of druses with mycorrhization in *R. montana*, because all individuals of *R. montana* collected in Paropeba were colonized by mycorrhiza fungi.

It was observed the presence of arbuscules of *Arum* and *Paris* type in the roots of *R. montana* as observed by Boulet and Lambers (2005) in *H. verrucosa*. On the other hand, in roots of other Proteaceae species such as *Banksia ericifolia* L.f., *Brassica sp.* L. (G.S. Pattinson), *Grevillea buxifolia* (Sm.) it was only observed intra-cortical septate hyphae and vesicles (Bellgard 1991). Arbuscules have a very low frequency or are completely absent in non mycorrhizal families (Miller et al. 1999; Johnson et al. 2003a). These observations suggest that the mycorrhizal colonization in roots of these family plants is just vestigial of their ancestrals and that the fungus might be a passive participant in the association (Miller 2005). These observations raise the question of whether a functional mycorrhizal symbiosis really exists in individuals of these non mycorrhizal families (Miller 2005).

Typical arbuscules were only observed in root fragments cut after previous inclusion in resin, but not using clearing technique (Phillips and Hayman 1970). Arbuscules are formed by repeated dichotomous branchings and reductions in hyphal width, starting from an initial trunk hyphae (5-10 μm in diameter) and ending in a proliferation of fine branch hyphae ($< 1 \mu\text{m}$ in diameter) (Brundett et al. 1996). The delicate branch hypha are the first structures to be affected by prolonged clearing times with KOH or pos-clearing with H_2O_2 (Koskey and Gemma 1989, Detmann et al. 2007). The technique used by other authors (Miller et al. 1999; Johnson et al. 2003a; Miller 2005) was the one with long KOH or H_2O_2 exposure, suggesting that the presence or absence of arbuscules in other Proteaceae species must be analyzed again.

Despite the importance of AM fungi in plant physiology and nutrition, only few field studies have being described the association between arbuscular mycorrhizal fungi and Brazilian *cerrado* plants (Spain and Miranda 1996; Martins et al. 1999). The results obtained in this study and in other recent surveys (Pattinson and McGee 2004, Boulet and Lambers 2005) confirmed AM fungi occurrence in Proteaceae species.

The relationship between Proteaceae and mycorrhizal fungi is complex and demands further studies toward interpretation of the AM fungi infection and its relationship with host plant, such as plant growth, water uptake and seedlings performance. This is the first evidence of occurrence of AM fungi affecting nutrients uptake positively in a Proteaceae growing in natural environment. We can suggest that *cerrado* edaphic conditions lead to a great mycorrhization of *R. montana* seedlings.

Acknowledgements

CNPq, FAPEMIG and PESCO for the financial support. Prof. João A. A. Meira-Neto and Gilmar E. Valente for helping in plant material collecting and identification.

References

Abbott LK, Robson AD, De Boer G (1984) The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *New Phytol* 97: 437–446

Allen MF (1991). *The ecology of mycorrhizae*. – Cambridge Univ. Press.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. (1990) *Official methods of analysis*. 15 ed. Arlington: AOAC International

Bellgard SE (1991) Mycorrhizal associations of plant species in the Hawkesbury Sandstone vegetation. *Aust J Bot* 39:357–364

Boulet FM, Lambers H (2005) Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi colonization in cluster roots of *Hakea verrucosa* F. Muell (Proteaceae), and its effect on growth and nutrient acquisition in ultramafic soil. *Plant Soil* 269:357-367

Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154: 275–30

Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) *Working with mycorrhizas in forest and agriculture*. Gambera, Pirie

Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plant Nutr* 23:867–902

Costa AA, Araújo G.M (2001) Comparação da vegetação arbórea de cerradão e cerrado na Reserva do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. *Act Bot Bras* 15: 63-72

Cruz CD, Regazzi AJ (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Editora UFV, 2001. 390p

Detmann KSC, Delgado MN, Rebello VPA, Leite TS, Kasuya MCM, Azevedo AA, Almeida AM (2007) Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo *dark septate* em espécies nativas de cerrado. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* (submitted)

Duke SE, Jackson RB, Caldwell MM (1994) Local reduction of mycorrhizal arbuscule frequency in enriched soil microsites. *Can J Bot* 72: 998–1001

EITEN G (1994) Vegetação do cerrado. In: Pinto, M. N. (eds.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Editora Universidade de Brasília, Brasília, p.17-73.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. (1997) Manual de métodos de análises de solo. 2ª ed, Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

Eriksson A (2001) Arbuscular mycorrhiza in relation to management history, soil nutrients and plant species diversity. *Plant Ecology* 155:129–137

Evans DE, Briars SA, Willians LE (1991) Active calcium transport by plant cell membranes. *J Exp Bot.* 42:285-303

Fernandes MS (ed) (2006) Nutrição mineral de plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa: Editora UFV

Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* 56:41-71

Franco AC (1998) Seasonal patterns of gas exchange, water relations and growth of *Roupala montana*, an evergreen savanna species. *Plant Ecol* 136:69-76

Franco AC Ecophysiology of woody plants (2002). – In: Oliveira PS, Marquis RJ (2ed): The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neo-Tropical Savanna. Columbia University Press, Irvington.

Franco AC, Lüttge U (2002) Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia* 131: 356-365

Franco AC, Bustamante M, Caldas LS, Goldstein G, Meinzer FC, Kozovits AR, Rundel P, Coradin VTR (2005) Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water déficit. *Trees* 19:326-335

Goodland, R. and M. G. Ferri. (1979) *Ecologia do Cerrado*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo

Handreck KA (1997) Phosphorus requirements of Australian native plants. *Aust J Soil Res* 35: 241–289

Hoffmann WA. 1998. Post-burn reproduction of woody plants in a neotropical savanna: The relative importance of sexual and vegetative reproduction. *Ap Ecol* 35:422–433

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. (2005) Mapa de Climas. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/clima/viewer.htm>> . Acesso em: 12 maio 2007

Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth, RE, Grime, JP, YOUNG PW, Read DJ (2003) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytol* 161: 503–515

Johnson RA, Wichern DW (1998) Applied multivariate statistical analysis. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 816p

Kelly CN, Morton, JB, Cumming JR (2005) Variation in aluminum resistance among arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycorrhiza* 15:193–201

Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV (1992) Interactive effects of Al³⁺, H⁺, and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol* 99:1461–1468

Koide BRT, Li M (1990) On host regulation of the vesicular—arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 114:59-74

Koskey RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486-505

Lambert DH, Baker DE, Cole HJr. (1979) The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper and other elements. *Soil Sci Soc Am J* 43:976-980

Lamont BB (2003) Structure, ecology and physiology of root clusters—a review. *Plant Soil* 248:1-

Martins CR, Miranda JCC, Miranda LN (1999) Contribution of native arbuscular mycorrhizal fungi in the establishment of *Aristida setifolia* Kunth in degraded areas in the cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 665–674

Medeiros RA, Haridasan M (1985) Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminium accumulating and nonaccumulating species of the cerrado region of central Brazil. *Plant Soil* 88:433–436

Medina E, Silva JF (1990) Savannas of northern South America: A steady state regulated by water-fire interactions on background of low nutrient availability. *J Biogeogr* 17:403-413.

Menezes WC, Araújo, WA (1963) Ensaio de adubação do algodoeiro na estação de Experimentação de Sete Lagoas. Pp 25-44. In I Reunião de Brasileira do Cerrado, Sete lagoas, Ministério da Agricultura, Serv Inform Agric

Menge JA, Steirle D, Bagyaraj DJ, Johnson E.LV, Leonard RT (1978) Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol* 80:575–578

Miranda AC, Miranda HS, Lloyd J, Grace J, Francey RJ, McIntyre JA, Meir P, Riggan P, Lockwood R, Brass J (1997) Fluxes of carbon, water and energy over Brazilian cerrado: An analysis using eddy covariance and stable isotopes. *Plant Cell Environ* 20:315-328

Miller RM (2005) The nonmycorrhizal root – a strategy for survival in nutrient-impooverished soils. *New Phytol* 165: 655–658

Miller RM, Smith CR, Jastrow JD, Bever JD (1999) Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *Am J Bot* 86: 547–553

Neri AV (2007) Análise de gradiente pedológico de cerrado em Paraopeba, Minas Gerais. (2007) Dissertação (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373

Pattinson GS, McGee PA (2004) Influence of colonisation by an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth of seedlings of *Banksia ericifolia* (Proteaceae) *Mycorrhiza* 14:119–125

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-160

Purnell HM (1960) Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Aust J Bot* 8:38–50

Ratter JA, Dargie TCD (1992) An analysis of the floristic composition of 26 cerrado areas in Brazil. *Edinburgh. J Bot* 49: 235–250

Ratter JA, Ribeiro JF and Bridgewater S (1997) The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Bot.* 80: 223-230

Rebello, T (1995) *Proteas: A field guide to the proteas of Southern Africa*. Fernwood Press, Vlaeberg, South Africa.

Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V (1999) Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação. CFSEMG, Viçosa. 1999, 357p.

Silva DJ, Queiroz AC (2002) *Análise de Alimentos. Métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa : Editora UFV

Silva MA (2005) Interação entre monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e *Eucalyptus grandis* (2005) Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa

Spain JL, Miranda JC (1996) *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Giasporaceae (Glomales) from the Cerrado Region of Brazil. *Mycotaxon* 60:129–136

Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA (1997) *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1997. 666p.

CONCLUSÕES

1- Há a necessidade da retirada de compostos secundários das raízes através de tratamentos químicos para o estudo de micorrização em espécies nativas de cerrado *sensu stricto*.

2- As estruturas arbusculares formadas pelos fungos micorrízicos dentro das raízes são melhor observadas quando submetidas à desidratação alcoólica, inclusão em resina, seccionamento e coloração em azul de Toluidina, em comparação com o tratamento clássico de clareamento em hidróxido de potássio e ou peróxido de hidrogênio.

3- A presença de FMAs nas raízes das espécies herbáceas e arbóreas nativas do cerrado *sensu stricto* é freqüente.

4- *Roupala montana* (Proteaceae) associa-se com fungos micorrízicos arbusculares no cerrado *stricto sensu*, *stricto sensu* denso e *cerradão* distrófico.

5- Fungos micorrízicos arbusculares interferem positivamente na concentração de P, K, e Ca nas folhas de *Roupala montana* crescidas naturalmente em condições de Cerrado.