

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

QUANTIFICAÇÃO DE MICÉLIO EXTRARRADICULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAS CÍTRICAS E ENDÓFITOS. I. MÉTODO EMPREGADO⁽¹⁾

R. MELLONI⁽²⁾ & E. J. B. N. CARDOSO⁽³⁾

RESUMO

Otimização de métodos de extração e avaliação de micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) constituem os principais passos para um estudo mais profundo da interação fungo micorrízico arbuscular (FMA) e hospedeiro, já que a absorção e translocação dos nutrientes do substrato ao hospedeiro são realizadas, respectivamente, por tais estruturas fúngicas. Métodos de extração de micélio extrarradicular de FMAs propostos por diversos autores foram reavaliados e mesclados, originando um método exclusivo e de fácil execução, juntamente com a calibração de métodos para avaliação e quantificação de MEA (fluorescência induzida com a hidrólise do diacetato de fluoresceína e redução de iodonitrotetrazólio), em substrato arenoso.

Termos de indexação: corante, FDA, INT.

SUMMARY: *QUANTIFICATION OF EXTRARADICULAR MYCELIUM OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON CITRUS. I. METHODS*

Extraction and evaluation of active (AEM) and total (TEM) extraradicular mycelium is the first step in a comprehensive study of the interaction between host plant and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), since these hyphae are responsible for nutrient absorption and translocation from the soil to the host. Extraction methods for extraradicular mycelium in the literature were reviewed and reevaluated, and modifications were made, resulting in a new, simple technique. The evaluation and quantification method of AEM was tested using induced fluorescence following fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis and iodinitrotetrazolium (INT) reduction in sandy soil.

Index terms: FDA hydrolysis, INT, reduction stain.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor. Trabalho realizado com auxílio da FAPESP. Recebido para publicação em junho de 1997 e aprovado em setembro de 1998.

⁽²⁾ Mestre em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP. Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba (SP). Bolsista do CNPq.

⁽³⁾ Professora Titular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ/USP. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Dentre as estruturas do fungo micorrízico arbuscular (FMA) na planta hospedeira, o micélio extrarradicular é o que apresenta a maior extensão e biomassa, em comparação com esporos, vesículas ou arbúsculos, concentrando, talvez, a maior quantidade de carboidratos destinados ao fungo. Considerando o papel do micélio extrarradicular na eficiência da associação, pode-se inferir que a sua quantificação é altamente desejável para obter um conhecimento mais completo de todo o sistema simbiótico. As formas de extração de micélio extrarradicular de um sistema solo-planta micorrizada já foram bastante discutidas na literatura internacional; entretanto, são poucos os trabalhos relativos à parte micelial de FMAs, talvez pela dificuldade de extração e, ou, identificação. A quantificação de micélio extrarradicular total (MET) tende a não ser suficiente em estudos de absorção de nutrientes, uma vez que somente as hifas ativas seriam capazes de absorvê-los e translocá-los à planta (Beever & Burns, 1980; Cooper & Tinker, 1981; Sylvia, 1992; Bago et al., 1998).

Dentre os métodos diretos de quantificação de micélio extrarradicular ativo (MEA) de FMAs (Sylvia, 1992), destacam-se os que se baseiam no uso de membrana de filtração, tais como os métodos de fluorescência induzida com diacetato de fluoresceína (Ames et al., 1982; Roser et al., 1982; Ingham & Klein, 1984; Schubert et al., 1987; Hamel et al., 1990; Sylvia, 1992; Melloni et al., 1996; Nogueira, 1997; Gomes, 1997), de redução de iodotetrazólio (Sylvia, 1988; Hamel et al., 1990; Sylvia, 1992; Cardoso Filho, 1994; Kabir et al., 1997) e de imunofluorescência (Wilson et al., 1983; Kough et al., 1983; Sylvia, 1992). Tais métodos são classificados como enzimáticos, pelo fato de atuarem em complexos enzimáticos presentes somente em células metabolicamente ativas. O diacetato de fluoresceína (FDA) é um indicador de esterases, enzimas envolvidas na hidrólise de ésteres e que hidrolisam e acumulam a fluoresceína, fluorescente quando excitada com luz ultravioleta. Já o iodotetrazólio (INT) é um indicador de desidrogenases que são enzimas presentes no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória, e pelas quais é reduzido, formando um composto avermelhado, a formazana.

O método de imunofluorescência exige a produção de um antissoro específico a uma espécie de FMA, o qual pode ser posteriormente usado em técnica de anticorpo fluorescente, para a distinção de espécies de FMAs e de outros microrganismos do solo. É um método de execução relativamente difícil, uma vez que exige um material fúngico puro a ser utilizado como antígeno, e a complicação se torna ainda maior pela impossibilidade de se cultivarem FMAs na ausência de hospedeiro vivo.

Em vista de toda a problemática metodológica, o presente trabalho teve por objetivos otimizar e propor um método de extração de micélio extrarradicular de FMAs e calibrar métodos de quantificação de MEA, como os de FDA e INT, em substrato arenoso. De acordo com observações de Cardoso Filho (1994), a extração do micélio extrarradicular de substrato argiloso é bem mais complicada, com perdas de hifas fragmentadas durante a decantação da suspensão e problemas de avaliação em membranas de filtração, uma vez que micropartículas se aderem às hifas e mancham as membranas, dificultando a visualização, mesmo com aplicação de técnicas de limpeza recomendadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de substrato arenoso com propágulos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (*Glomus intraradices*, *G. etunicatum* ou *G. clarum*) foram utilizadas para estudos de extração e quantificação de MEA e MET.

Extração de micélio extrarradicular de FMAs

Compararam-se os métodos de extração propostos por Bethlenfalvay & Ames (1987), Schubert et al. (1987), Sylvia (1988) e Cardoso Filho (1994), com subamostras variando de 1 a 10 g. Essas subamostras foram peneiradas em malha de 0,71 e 0,25 μm , após preparo de suspensão em água de torneira, com volumes de 500 ou 1.500 mL, para quebra de aglomerados do substrato. O filtrado foi submetido a uma agitação vigorosa em liquidificador (na menor velocidade) por um tempo de 15 ou 30 s, abrangendo todos os métodos analisados. Após a agitação, diferentemente dos outros autores, manteve-se ou não em repouso por dois minutos, antes da retirada de alíquota (25, 100, 500 ou 1.500 mL), procurando encontrar a quantidade ideal de micélio para contagem, sem problemas de visualização na membrana de filtração por partículas de argila.

A alíquota encontrada foi submetida a novo peneiramento, utilizando peneira de malha 44 μm , sendo o material retido submetido ou não à precipitação de impurezas, empregando soluções de sacarose de concentração variando de 50 a 70%, em tubos de centrífuga ou em repouso por 1 min em copo béquer. Avaliou-se a necessidade ou não desta "limpeza" de micélio com solução de sacarose, bem como a possibilidade da ocorrência de alguma alteração na viabilidade micelial. Nessa fase, o sobrenadante foi retirado e novamente submetido à última peneira, seguido de lavagem em água de torneira e transferência do retido para um frasco de cerca de 15 mL de capacidade, utilizando água destilada, até um volume final de 10 ou 11 mL, calibrado nos respectivos frascos.

Coloração de micélio extrarradicular de FMAs

Empregando diacetato de fluoresceína (FDA)

O método foi baseado em Ingham & Klein (1984), Schubert et al. (1987) e Sylvia (1992), empregando solução de FDA, preparada dissolvendo-se 5 mg de FDA em 1 mL de acetona e completando-se a 100 mL com solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 em balão volumétrico. Essa solução tampão foi preparada misturando-se 50 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de KH₂PO₄ (6,80 g em 500 mL de água destilada) com aproximadamente 50 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (2,00 g em 500 mL de água destilada) até pH 7,4, autoclavada por 20 min a 1 atm de pressão e mantida sob refrigeração para melhor conservação. A solução de FDA foi feita no momento da coloração, utilizando-se a solução tampão sempre à temperatura ambiente.

Para a coloração, retiraram-se dos frascos de 15 mL alíquotas de 1, 3, 5 ou 10 mL da suspensão de micélio e transferiram-se para outros frascos, onde receberam o mesmo volume de solução de FDA, mantendo-se sempre a proporção de 1 mL de suspensão de micélio para 1 mL de solução corante, conforme o método original proposto. O período de incubação foi de 5, 10, 15 ou 30 min, à temperatura ambiente. Seguiu-se uma filtração a vácuo em membrana de triacetato de celulose, quadriculada (linhas horizontais e verticais distanciadas de 3 mm), de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, utilizando a solução tampão de fosfato para transferência da suspensão de micélio do frasco à membrana. Esta foi seca ao ar e colocada entre duas lâminas de vidro de 25 cm², que continham algumas gotas de óleo de amêndoa, formando um “sanduíche de lâminas”, antes da demarcação dos campos a serem avaliados dentro do prazo de aproximadamente 1 hora, em microscópio de fluorescência (Olympus System Microscope Model BX40), em luz ultravioleta (UV) e filtro WB.

Empregando iodonitrotetrazólio (INT)

O método foi baseado em Sylvia (1992) e Cardoso Filho (1994), empregando solução predefinida pelos primeiros autores, misturando-se volumes iguais de solução com 1 mg de INT por mL, 3 mg de NADH por mL e TRIS 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4. A solução de INT recebeu gotas de etanol 98% para melhor dissolução, antes da mistura com as outras soluções em agitador de tubos, cuja quantidade foi suficiente para a coloração das amostras disponíveis no mesmo dia. Retiraram-se alíquotas da suspensão de micélio do frasco de 15 mL, com volumes de 3, 5 ou 10 mL e transferiram-se para outros frascos, onde receberam a mistura corante com INT em volumes de 0,5; 1,0 ou 1,5 mL. Os frascos foram agitados e incubados a 28°C por períodos de 6, 8 ou 10 horas, evitando ou não a possível interferência de luz na reação,

cobrindo os frascos com papel alumínio. Após a incubação, procedeu-se ou não à coloração de contraste dos micélios inativos, adicionando aos frascos solução de azul de tripano 0,05% em diferentes volumes (0,5; 1,0; 1,5 ou 5,0 mL) e tempos de incubação (5, 10, 15 ou 20 min), à temperatura ambiente. Seguiu-se uma filtração a vácuo em membrana de triacetato de celulose, conforme indicado para o método anterior, antes da demarcação dos campos a serem avaliados em microscópio sob luz comum. Verificou-se não ser necessária a contagem no mesmo dia da coloração, já que ela se mantém viável por mais dias, embora as membranas possam ressecar e exigir a adição de gotas de óleo de amêndoa.

Avaliação das hifas na membrana

Acoplou-se na ocular do microscópio um dispositivo (descrito na literatura internacional como “eye piece whipple disc”, ocular reticulada) com área de 100 mm² (no aumento de 10 vezes), composto de 10 linhas verticais e 10 horizontais. A área correspondente ao reticulado era sobreposta a cada campo da membrana, num total de 64 campos (8 x 8), conforme proposto por Cardoso Filho (1994), para manter o erro de contagem inferior a 20% com uma precisão de 95% de probabilidade. Em cada campo, avaliou-se o número de interseções de hifas com as linhas horizontais do reticulado e aplicou-se a equação de Newman (1966), corrigindo o valor obtido de acordo com o teor de água presente no substrato e os volumes das alíquotas utilizadas.

Para o método da fluorescência induzida (FDA), foi necessária dupla contagem de uma mesma membrana, quando da avaliação de micélio ativo e total, uma vez que esse último é dificilmente visualizado sob luz UV. O mesmo não se aplica ao método da redução do iodonitrotetrazólio (INT), já que o micélio ativo e o total são avaliados sob luz comum numa única contagem.

Após a contagem do número de interseções entre hifas e linhas horizontais do reticulado em todos os campos demarcados da membrana e de posse da quantidade de amostra utilizada e das diluições sugeridas, o comprimento de MEA ou MET foi obtido pela seguinte equação simplificada, baseada em Newman (1966):

$$C = 0,21387 \cdot n / 10 - U$$

em que

C = comprimento de micélio extrarradicular; em m g⁻¹ de substrato seco.

n = número de interseções de hifas com as linhas horizontais do reticulado.

U = quantidade de água presente em 10 g de substrato úmido, em gramas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de micélio extrarradicular

O método desenvolvido por Bethlenfalvay & Ames (1987) proporcionou uma concentração exagerada de partículas de argila na membrana de filtração, prejudicando a passagem da luz e a contagem de micélio extrarradicular de FMAs. Isto pode ser explicado pela pequena quantidade de amostra de substrato recomendada (1,0 a 1,5 g) e pelo volume reduzido da suspensão em liqüidificador (50 mL). Em Schubert et al. (1987), as amostras, também de tamanho reduzido (2,5 g), após passarem pela fase de peneiramento, eram submetidas à “limpeza” de micélio por meio de centrifugações sucessivas em soluções de sacarose. Verificou-se baixa quantidade de micélio extrarradicular nas membranas de filtração, apesar da facilidade de visualização dos micélios e inexistência de partículas de argila. Ambos os métodos foram descartados, o primeiro pela dificuldade de se visualizarem os micélios na membrana e o segundo pela baixa quantidade de micélio e pela exigência de centrifugações que aumentavam o tempo de extração.

Os métodos de Sylvia (1988) e Cardoso Filho (1994) foram mesclados para otimização do novo método proposto, e a amostra de 10 g foi considerada suficiente para a contagem de micélio na membrana, após ensaios com várias quantidades pelo segundo autor. A quantidade de água de torneira indicada por Cardoso Filho (1994) para a suspensão de micélio (1.500 mL) promoveu melhor homogeneização da amostra em liqüidificador, juntamente com o tempo de agitação de 30 s, superior ao proposto por Sylvia (1988) de 15 s. Como este último autor recomendava a retirada de alíquota de 25 mL do liqüidificador, antes da transferência da suspensão para a membrana de filtração e esta fornecia baixa quantidade de micélio e grande quantidade de impurezas, Cardoso Filho (1994) empregou todo o volume da suspensão de micélio presente no liqüidificador em peneira de 44 μm , mas procedia à “limpeza” em solução de sacarose. Então, a retirada de uma alíquota com volume superior ao sugerido pelo primeiro autor (100 ou 500 mL), após certo tempo de repouso no liqüidificador (2 min), poderia ser suficiente para evitar essa fase de “limpeza” e economizar tempo e reagentes, os quais, juntamente com a facilidade de execução, foram os parâmetros considerados para a escolha do método mais adequado. A alíquota de 500 mL foi considerada ideal por garantir quantidade suficiente de micélio na membrana e por apresentar pequena quantidade de impurezas, enquanto a alíquota de 100 mL forneceu menor quantidade de micélio e poderia comprometer a contagem.

O método otimizado de extração de micélio extrarradicular foi, portanto, obtido com os seguintes

procedimentos: (a) pesagem de 10 g de substrato arenoso com os propágulos de FMAs; (b) preparo de suspensão misturando a amostra de substrato com 1.500 mL de água de torneira; (c) peneiramento em malhas de 0,71 e 0,25 μm ; (d) agitação em liqüidificador por 30 s na menor velocidade; (e) repouso da suspensão por 2 min; (f) retirada de alíquota de 500 mL; (g) peneiramento em malha de 44 μm , e (h) transferência do retido na peneira com 11 mL de água destilada para frasco de 15 mL de capacidade.

O uso de liqüidificador evitou a presença de aglomerados de hifas que dificultavam e subestimavam a contagem, enquanto o tempo de repouso da suspensão de micélio (2 min) não comprometeu a representatividade da amostra, pela pouca variação visual encontrada na contagem (Melloni & Cardoso, 1998). Em centrifugações, as perdas de representatividade da amostra poderiam ser maiores pelo fato de as partículas de argila, submetidas a altas rotações, poderem arrastar para o fundo do tubo hifas de FMAs, além de ser o volume do sobrenadante por retirar subjetivo e não padronizado. Quanto à perda de atividade do micélio extrarradicular pelo emprego de liqüidificador, não se verificou tal interferência, visto que as hifas foram submetidas à coloração e avaliação no mesmo dia da extração.

Coloração de micélio extrarradicular

Para a coloração do micélio, do frasco de 15 mL foram retiradas duas alíquotas de 5 mL cada e transferidas para dois recipientes semelhantes, as quais foram submetidas posteriormente à coloração com FDA e INT. Quando da transferência do retido da peneira de 44 μm para o frasco de 15 mL, o volume de 11 mL de suspensão promoveu melhor partição futura da amostra, uma vez que se encontrou dificuldade em retirar duas alíquotas de 5 mL cada com auxílio de pipeta comum, para possível comparação dos métodos de atividade de micélio extrarradicular. A resposta da homogeneização dos resultados seria refletida na quantidade de MET, a qual não poderia diferir para os dois métodos, embora a de MEA pudesse variar com o método empregado (Melloni & Cardoso, 1998). A retirada de duas alíquotas de mesmo volume de suspensão de micélio do frasco de 15 mL garantiu que a diferença entre os métodos de quantificação de MEA era somente devida à técnica de coloração empregada e não à possível variação da quantidade de micélio numa mesma suspensão.

Emprego de FDA

Para a coloração com FDA, o método utilizou 5 mL de suspensão de micélio com 5 mL de solução FDA e incubação por 5 min à temperatura ambiente. Todos os volumes de alíquotas de suspensão de micélio, quando associadas à solução de FDA na proporção 1 para 1, em qualquer período de

incubação, garantiram boa visualização dos micélios ativos, mas o volume de 5 mL de suspensão de micélio garantiu quantidade suficiente de micélio extrarradicular na membrana, descartando-se então volumes maiores pela dificuldade de contagem e avaliação. Por não se verificar diferença visual dos períodos de incubação da amostra com solução de FDA, decidiu-se que o tempo de 5 min seria suficiente e contribuiria para reduzir a fase de coloração e todo o processo de quantificação de MEA, concordando com os dados apresentados por Schubert et al. (1987) e Sylvia (1992).

A esterilização prévia da solução tampão de fosfato e a sua conservação em refrigerador contribuiu para a redução do período de coloração do micélio. Sua utilização foi indicada no momento do preparo da solução de FDA, sempre à temperatura ambiente, para garantir o sucesso de coloração e não dar origem a precipitados fluorescentes.

Emprego de INT

Para coloração com INT, o método utilizou 5 mL de suspensão de micélio com 1,5 mL de solução com INT e incubação por 8 h à temperatura de 28°C. Alíquotas de 5 mL retiradas do frasco de 15 mL proporcionaram quantidade aceitável de micélio na membrana e, para esse volume, a adição de 1,5 mL da mistura corante com INT garantiu melhor coloração e distinção das hifas ativas (coradas de vermelho), quando associado ao período de incubação de 8 h a 28°C, indiferentemente à presença de luz. Volumes menores de solução corante e tempos diferentes de incubação promoveram coloração deficiente e foram descartados. A mistura corante foi feita de acordo com Sylvia (1988) no momento da utilização ou no dia anterior, mantida sob refrigeração, sem que se misturassem as três soluções previamente, para evitar problemas de coloração.

A coloração de contraste de micélios inativos com solução de azul de tripano, proposta por Sylvia (1992), provocou interferência visual na coloração de micélio ativo (vermelho), dificultando sua diferenciação, já que adquiria uma coloração arroxeada e dificilmente se diferenciava das hifas inativas, coradas de azul. Por isso e por tornar a contagem mais exaustiva, essa coloração de contraste foi descartada, conforme também descrito por Cardoso Filho (1994), o qual propôs a distinção dos micélios ativos dos inativos pela coloração natural das hifas inativas, realçadas pelo óleo de amêndoa adicionado à membrana de filtração.

Contagem e avaliação de micélio extrarradicular

O número de campos demarcados para contagem na membrana (64 campos), proposto por Cardoso Filho (1994), mostrou-se ideal pela abrangência e racionalização de contagem em microscópio, sendo então utilizado no método otimizado proposto. O

microscópio de epifluorescência garantiu boa visualização dos micélios em ambas as contagens para MEA e MET (FDA e INT) e apresentou extrema facilidade de manuseio, principalmente no que se referiu ao acoplamento do reticulado em uma das oculares e à utilização de luz de vários comprimentos de onda e contrastes de fase, quando necessário.

Ainda quanto à avaliação, poderia surgir a seguinte questão: Qual o método de avaliação de MEA que indicaria a realidade do sistema planta-endófito? Resultado interessante que mostra um comportamento diferenciado dos métodos de avaliação de MEA de FMAs foi encontrado quando diferentes espécies cítricas e FMAs foram submetidas a doses crescentes de P (Melloni & Cardoso, 1998).

CONCLUSÕES

1. A técnica otimizada de extração de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares, indicada para substratos arenosos, garantiu rapidez e isolamento de micélios mais limpos de impurezas nas membranas de contagem, permitindo a sua utilização em estudos mais complexos do endófito durante a simbiose.

2. O método da redução de iodonitrotetrazólio (INT) exigiu menor tempo de avaliação em microscópio, quando comparado ao método da fluorescência induzida com a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), mas apresentou maior dificuldade na distinção visual dos micélios corados de vermelho (ativos) daqueles de coloração natural (inativos), o que não ocorreu no segundo método pela facilidade de diferenciação dos micélios ativos (fluorescentes) em luz ultravioleta.

LITERATURA CITADA

- AMES, R.N.; INGHAM, E.R. & REID, C.P.P. Ultraviolet-induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infections: an alternative to clearing and staining methods for assessing infections. *Can. J. Microbiol.*, 28:351-355, 1982.
- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR, C.; GOULET, A. & PICHÉ, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 139:375-388, 1998.
- BEEVER, R.E. & BURNS, D.J.W. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. In: WOOLHOUSE, H.W., ed. *Advances in Botanical Research*, 8. London, Academic Press, 1980. 286p.
- BETHLENFALVAY, G.J. & AMES, R.N. Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51:834-837, 1987.

- CARDOSO FILHO, J.A. Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus etunicatum* e da sua atividade, em simbiose com milho. Piracicaba, ESALQ/USP, 1994. 121p. (Tese de Mestrado)
- COOPER, K.M. & TINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas - IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorus. *New Phytol.*, 88:327-339, 1981.
- GOMES, V.F.F. Desenvolvimento de fungos micorrízicos arbusculares em três espécies de porta-enxertos cítricos sob níveis de fósforo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. 89p. (Tese de Doutorado)
- HAMEL, C.; FYLES, H. & SMITH, D.L. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytol.*, 115:297-302, 1990.
- INGHAM, E.R. & KLEIN, D.A. Soil fungi: relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.*, 16:273-278, 1984.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P.; FYLES, J.W.; HAMEL, C. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil*, 192:285-293, 1997.
- KOUGH, J.; MALAJCZUK, N. & LINDERMAN, R.G. Use of the indirect immunofluorescent technique to study the vesicular-arbuscular fungus *Glomus epigaeum* and other *Glomus* species. *New Phytol.*, 94:57-62, 1983.
- MELLONI, R. & CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:59-67, 1999.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F. & CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de limão cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, 1996. Trabalhos. Campinas, USP/SLCS/SBCS/CEA/SBM, 1996. (CD-ROM)
- NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.*, 3:139-145, 1966.
- NOGUEIRA, M.A. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja submetida a doses de fósforo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. 92p. (Tese de Mestrado)
- ROSER, D.J.; KEANE, P.J. & PITTAWAY, P.A. Fluorescent staining of fungi from soil and plant tissues with ethidium bromide. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 79:321-329, 1982.
- SCHUBERT, A.; MARZACHÍ, C.; MAZZITELLI, M.; CRAVERO, M.C. & BONFANTE-FASOLO, P. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenck. *New Phytol.*, 107:183-190, 1987.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 20:39-43, 1988.
- SYLVIA, D.M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods Microbiol.*, 24:54-65, 1992.
- WILSON, J.M.; TRINICK, M.J. & PARKER, C.A. The identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi using immunofluorescence. *Soil Biol. Biochem.*, 15:439-445, 1983.