

Gladstone Alves da Silva

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS EM
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
(GLOMEROMYCOTA)**

Recife

2004

Gladstone Alves da Silva

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS EM
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
(GLOMEROMYCOTA)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Comissão de Orientação:

Dr^a. Leonor Costa Maia (UFPE)
Orientadora

Dr^a. Paola Bonfante (UNITO-Turim)
Co-orientadora

Recife

2004

FICHA DE APROVAÇÃO

Tese Defendida e Aprovada pela Banca Examinadora

Leonor Costa Maia (Orientadora)
(Dept° de Micologia - UFPE)

Marcus Vinícius Alves
(Dept° de Botânica - UFPE)

Neiva Tinti de Oliveira
(Dept° de Micologia - UFPE)

Sandra Farto Botelho Trufem
(Instituto de Botânica de São Paulo)

Sidney Stürmer
(Dept° de Ciências Naturais - FURB)

Aprovada em 19 / 02 / 2004

“A taxonomia não é uma mera atividade acadêmica. O sistema de classificação é de imensa importância prática e representa a soma do conhecimento micológico. Ela é tão importante quanto a inteira ciência da micologia”.

Luttrell, E.S. 1958. *Mycologia* 50: 942-944.

Aos meus pais, José Arnô (*In memoriam*)
e Edileuza, à minha irmã Glaucione e ao
meu sobrinho Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Em especial à minha orientadora Leonor Costa Maia (quem admiro pessoal e profissionalmente) pela orientação excepcional em todos os trabalhos que já realizei, pela sua amizade, paciência, por acreditar e confiar, sempre me apoiando em todos os momentos da minha caminhada científica.

À CAPES, pela concessão de Bolsa de Doutorado, a qual me auxiliou durante toda a tese e me proporcionou a realização de parte dos trabalhos no exterior.

À Prof^a. Paola Bonfante, por todo apoio desprendido enquanto estive fazendo o Doutorado-sanduíche em seu laboratório, na Universidade de Turim.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Turim, em especial a Ana Maria, Andrea, Antonella, Claude, Elena, Erica, Francesco, Laura, Luisa, Marta, Sandra, Sara, Silvia, Simona, Stefano, Tonia, Valeria e Vanessa, por tantos momentos de alegria, apoio e ajuda durante a execução do meu projeto.

À Prof^a. Sandra Trufem, pelo apoio e por suas valiosas sugestões ao meu trabalho.

A todos os membros da banca examinadora, por suas valiosas sugestões ao meu trabalho.

À Prof^a. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante, por suas sugestões, apoio e amizade.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, por tantos momentos de alegria, descontração, apoio e ajuda na minha formação.

Ao colega Bruno, pela ajuda em um dos capítulos da minha tese.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Micorrizas, por todo apoio que sempre demonstraram e todas as sugestões ao meu trabalho.

À minha mãe Edileuza e minha irmã Glaucione, pelo apoio, paciência, compreensão e carinho.

Aos professores e funcionários do Dept° de Micologia, pelo apoio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pela contribuição inestimável à minha formação profissional.

E por fim, aos que tenham contribuído de alguma forma na realização do meu trabalho e na minha formação profissional.

SUMÁRIO	Pág.
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1 - Revisão de literatura	03
CAPÍTULO 2 - Glomeromycota: novos pontos em filogenia a partir de caracteres morfológicos	32
CAPÍTULO 3 - Análise filogenética de Glomeromycota a partir de seqüências parciais de LSU rDNA	71
CAPÍTULO 4 - Implicações filogenéticas da amplificação de genes mitocôndriais em espécies de Glomeromycota: uma primeira abordagem	87
CAPÍTULO 5 - Resolução de conflitos na identificação de espécies de <i>Gigaspora</i> Gerd. & Trappe (Glomeromycota) a partir de primers espécie-específicos e análises filogenéticas de seqüências de rDNA	103
CAPÍTULO 6 - Chaves para identificação e tabelas comparativas entre espécies de Gigasporaceae - Glomeromycota	125
CONCLUSÕES GERAIS	155
ANEXOS	

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares formam associação simbiótica com a maioria das plantas. A partir de dados de SSU rDNA, esses fungos foram recentemente agrupados em um novo filo (Glomeromycota); no entanto, ainda existem lacunas acerca da sua classificação. Os objetivos desse trabalho foram: a) determinar as relações evolutivas em Glomeromycota a partir de dados morfológicos e moleculares, construindo árvores filogenéticas; b) propor novas hipóteses nas relações filogenéticas do grupo, bem como a utilização de outros genes, além do rDNA, na sua avaliação cladística; c) contribuir para o diagnóstico de espécies em *Gigaspora*; d) desenvolver chaves para identificação de espécies em *Scutellospora*. Sequências parciais de LSU rDNA, bem como dados morfológicos foram usados na filogênese de Glomeromycota. As árvores obtidas indicaram que: o filo é monofilético, Paraglomeraceae é um grupo basal, Acaulosporaceae e Gigasporaceae estão unidos em um mesmo clado e Glomeraceae é polifilético, como descrito em trabalhos anteriores. Entretanto, apesar dos resultados suportarem a maioria dos dados mostrados por outros autores, outras espécies precisam ser avaliadas para determinação de grupos ainda não resolvidos no filo. Também foram analisadas sequências de possíveis genes mitocondriais para avaliação filogenética de *Gigaspora* e ao menos uma das sequências se mostrou filogenética-informativa. Para facilitar o processo de identificação das espécies em *Scutellospora*, chaves dicotômicas foram construídas a partir de dados morfológicos. Além disso, um primer espécie-específico foi desenhado para *G. albida*, pois esta espécie tem sido, morfológicamente, confundida com outras (*G. margarita* e *G. rosea*), do mesmo gênero.

Palavras-chave: Glomeromycota; rDNA; filogenia; micorriza arbuscular; taxonomia; primer.

ABSTRACT

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form symbiotic association with most plants. From data of SSU rDNA, these fungi were recently grouped in a new phylum (Glomeromycota); however much is still unclear in the classification of the group. Thus, the objectives of this work were: (a) to determine the evolutive relations in Glomeromycota using morphological and molecular data, and constructing phylogenetic trees; (b) suggest new hypothesis regarding the phylogenetic relations of the group, as well as the utilization of other genes, besides the rDNA, in the cladistic evaluation; (c) contribute for the diagnostic of species in *Gigaspora*; (d) to build keys for identification of species in *Scutellospora*. Partial sequences of LSU rDNA and morphological data were used in the phylogenesis of Glomeromycota. The trees obtained indicated that: the phylum is monophyletic, Acaulosporaceae and Gigasporaceae are united in the same clade, and Glomeraceae is poliphyletic, as previously described. However, although the results support most of the data shown by other researchers, other species should be evaluated for determination of groups still not understood in the phylum. Sequences of possible mitochondrial genes for phylogenetic evaluation of *Gigaspora* were also analyzed and at least one of them was phylogenetic-informative. In order to help the identification of *Scutellospora* species, dichotomic keys using morphological data were constructed. A species-specific primer was also designed for *G. albida*, because this species has been morphologically confused with others (*G. margarita* and *G. rosea*) of the same genera.

Key-words: Glomeromycota; rDNA; phylogeny; arbuscular mycorrhiza; taxonomy; primer.

INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos, entre os quais os arbusculares, são capazes de aumentar a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas (Cooper & Tinker, 1978), desempenhando importante papel no equilíbrio dos ecossistemas terrestres, atuando na definição de nichos ecológicos e na determinação da composição das comunidades vegetais (Francis & Read, 1995).

A história taxonômica dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é relativamente recente e a primeira revisão de Endogonaceae (Endogonales, Zygomycetes), grupo onde se incluíam esses fungos, foi publicada antes de suas relações simbióticas serem entendidas (Thaxter, 1922). Gerdemann & Trappe (1974), apesar de estabelecerem novas bases para a classificação do grupo, mantiveram-no em Endogonaceae. Morton (1990) considerou que fossem de origem monofilética e, pela simbiose obrigatória e formação de arbúsculos, agrupou-os em Glomales (Morton & Benny, 1990). Entretanto, estudos moleculares recentes têm oferecido subsídios para mudanças significativas na classificação dos FMA (Redecker et al., 2000a; 2000b; Morton & Redecker, 2001; Schwarzott et al., 2001) o que culminou com a proposta de Schüßler et al. (2001) de colocá-los em novo filo: Glomeromycota.

A identificação dos FMA é baseada, sobretudo, em caracteres subcelulares, considerando principalmente as camadas da parede do esporo, que foram extensivamente descritas por Walker (1983). Além das camadas também são utilizadas algumas propriedades da parede, tais como espessura, pigmentação, ornamentação e reações histoquímicas que podem ser observadas em esporos quebrados (Bentivenga & Morton, 1994). O grupo apresenta mais de 160 espécies e a identificação, ao nível específico, requer bastante experiência do pesquisador para realizá-la corretamente (Bentivenga & Morton, 1994). Assim, é de interesse que novas metodologias, para facilitar a identificação, sejam incorporadas para estudo taxonômico do grupo.

Os objetivos desse trabalho foram; a) determinar as relações evolutivas em Glomeromycota a partir de dados morfológicos e moleculares, construindo árvores filogenéticas; b) propor novas hipóteses nas relações filogenéticas do grupo, bem como a utilização de outros genes, além do rDNA, na sua avaliação cladística; c) contribuir para o diagnóstico de espécies em *Gigaspora*; d) desenvolver chaves para identificação de espécies em Gigasporaceae.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

Geralmente considera-se que o sistema taxonômico tem duas funções: a primeira é prover um índice para espécies e a segunda, mostrar as relações filogenéticas entre elas. A taxonomia é a ciência da síntese, sua função é reunir dados de várias ciências (morfologia, citologia, fisiologia, genética, bioquímica, etc.) e integrá-los em um sistema útil e dinâmico. Na medida em que novos dados vão sendo produzidos (morfologia, bioquímica, etc.), são incorporados nos sistemas, muitas vezes mudando-os radicalmente. Assim, o sistema de classificação representa hipóteses, e essas, como todas as outras, são importantes, não só para indicar as relações entre os dados existentes, mas para apontar futuras linhas de pesquisas (Luttrell, 1958).

1. História da classificação dos FMA

1.1. *Classificação dos FMA: um ponto de vista morfológico*

O termo micorriza foi usado pela primeira vez por Frank, em 1885; entretanto, em 1845 Tulasne & Tulasne já haviam descrito o primeiro gênero (*Glomus* Tul. & Tul.) de fungos micorrízicos arbusculares. De início com apenas duas espécies (*G. macrocarpum* e *G. microcarpum*), *Glomus* é hoje o gênero com maior diversidade específica entre os FMA. *Sclerocystis* Berk. & Broome viria a ser descrito apenas 28 anos depois de *Glomus* (Berkeley & Broome, 1873), e a primeira revisão de Endogonaceae, grupo onde se incluía os FMA, foi publicada só em 1922, por Thaxter (Tab. 1). Endogonaceae compreendia quatro gêneros (*Endogone* Link ex Fries, *Glaziella* Berk., *Sclerocystis* e *Sphaerocreas* Saccardo & Ellis), sendo os membros de *Glomus* transferidos para *Endogone* (Thaxter, 1922). Dessa forma, os FMA englobavam apenas *Endogone* e *Sclerocystis* até 1974, quando Gerdemann & Trappe dividiram *Endogone* em quatro gêneros (*Endogone* sensu stricto, *Gigaspora* Gerd. & Trappe

emend. Walker & Sanders, *Glomus* e *Modicella* Kanouse); três desses gêneros existiam no passado, enquanto *Gigaspora* foi descrito como novo nessa ocasião. Além disso, foi criado o gênero *Acaulospora* Gerd. & Trappe, com os FMA sendo considerados em quatro gêneros (Tab. 1). Apesar da manutenção dos FMA ainda em Endogonaceae, este trabalho foi um marco na taxonomia e sistemática do grupo, não só pela recolocação e descrição de novos gêneros, mas por moldar as bases para identificação e classificação desses fungos, as quais ainda hoje são utilizadas.

A partir de Gerdemann & Trappe (1974), uma sucessão de trabalhos em taxonomia e classificação de FMA foram publicados. Ames & Schneider (1979) descreveram o gênero *Entrophospora* Ames & Schneider; Walker (1983) estabeleceu os tradicionais conceitos para a identificação desses fungos a partir dos diversos tipos de “parede” e Berch & Koske (1986), Morton (1986), Walker (1986b) e Spain et al. (1989) descreveram novos tipos de “parede”. Esses trabalhos mudaram profundamente o modo de identificação e a descrição de novas espécies.

Gigaspora reunia dois grupos: um com esporos apresentando camadas de paredes internas e estrutura especializada para a germinação (placa germinativa), e outro cujos esporos não apresentavam tais características. Assim, Walker & Sanders (1986) dividiram o gênero, mantendo *Gigaspora* e descrevendo *Scutellospora* Walker & Sanders com base na presença de placa germinativa e parede interna. Apesar da descrição dos dois novos gêneros (*Entrophospora* e *Scutellospora*) e dos avanços taxonômicos, os FMA continuaram sendo agrupados em Endogonaceae. Em 1989, Pirozynski e Dalpé, com base em registros fósseis, separaram *Glomus* e *Sclerocystis* em uma nova família (Glomaceae), mantendo os demais gêneros em Endogonaceae (Tab. 1) até que Morton (1990), em trabalho filogenético pioneiro para os FMA, estabeleceu que esses fungos formavam um grupo monofilético e que suas relações filogenéticas com outros membros de Endogonales eram obscuras (Fig. 1).

Tabela 1. Histórico dos principais sistemas de classificação dos FMA, considerando filo, classe, ordem, subordem, família e gênero.

Thaxter (1922)	Gerdemann & Trappe (1974)	Pirozynski & Dalpé (1989)	Morton & Benny (1990)	Cavalier-Smith (1998)	Morton & Redecker (2001)	Schüßler et al. (2001)
-	Eumycota	Amastigomycota	Amastigomycota	Archemycota	Zygomycota	Glomeromycota
Fungi	Zygomycetes	Zygomycetes	Zygomycetes	Glomomycetes	Zygomycetes	Glomeromycetes
Mucorales	Mucorales	Endogonales	Glomales	Glomales	Glomales	Archaeosporales
Endogonaceae	Endogonaceae	Endogonaceae	Gigasporineae	Gigasporineae	Gigasporineae	Archaeosporaceae
<i>Endogone</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i>	Gigasporaceae	Gigasporaceae	Gigasporaceae	<i>Archaeospora</i>
<i>Glaziella</i>	<i>Endogone</i>	<i>Endogone</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigaspora</i>	Geosiphonaceae
<i>Sclerocystis</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Geosiphon</i>
<i>Sphaerocreas</i>	<i>Glaziella</i>	<i>Gigaspora</i>	Glomineae	Glomineae	Glomineae	Diversisporales
	<i>Glomus</i>	<i>Scutellospora</i>	Acaulosporaceae	Acaulosporaceae	Acaulosporaceae	Acaulosporaceae
	<i>Modicella</i>	Glomaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Sclerocystis</i>	<i>Glomus</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Entrophospora</i>
		<i>Sclerocystis</i>	Glomaceae	Glomaceae	Archaeosporaceae	Diversisporaceae
			<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i>	<i>Archaeospora</i>	<i>Diversispora?</i>
			<i>Sclerocystis</i>	<i>Sclerocystis</i>	Glomaceae	Gigasporaceae
					<i>Glomus</i>	<i>Gigaspora</i>
					Paraglomaceae	<i>Scutellospora</i>
					<i>Paraglomus</i>	Glomerales
						Glomeraceae
						<i>Glomus</i>
						Paraglomerales
						Paraglomeraceae
						<i>Paraglomus</i>

* Os gêneros em negrito representam aqueles que continham espécies de FMA

Morton & Benny (1990) criaram a ordem Glomales para os FMA, distribuindo-os em três famílias (Acaulosporaceae, Gigasporaceae e Glomaceae) e seis gêneros (Tab. 1). De acordo com esses autores Gigasporaceae estaria separada, formando uma subordem (Gigasporineae), enquanto Acaulosporaceae e Glomaceae eram agrupados em Glomineae. Almeida & Schenck (1990), em revisão de *Sclerocystis*, também propuseram mudanças significativas para o grupo, determinando que todas as espécies do gênero, exceto *S. coremioides*, pertenceriam a *Glomus*, fechando assim um ciclo de mudanças na classificação apenas a partir de observações morfológicas.

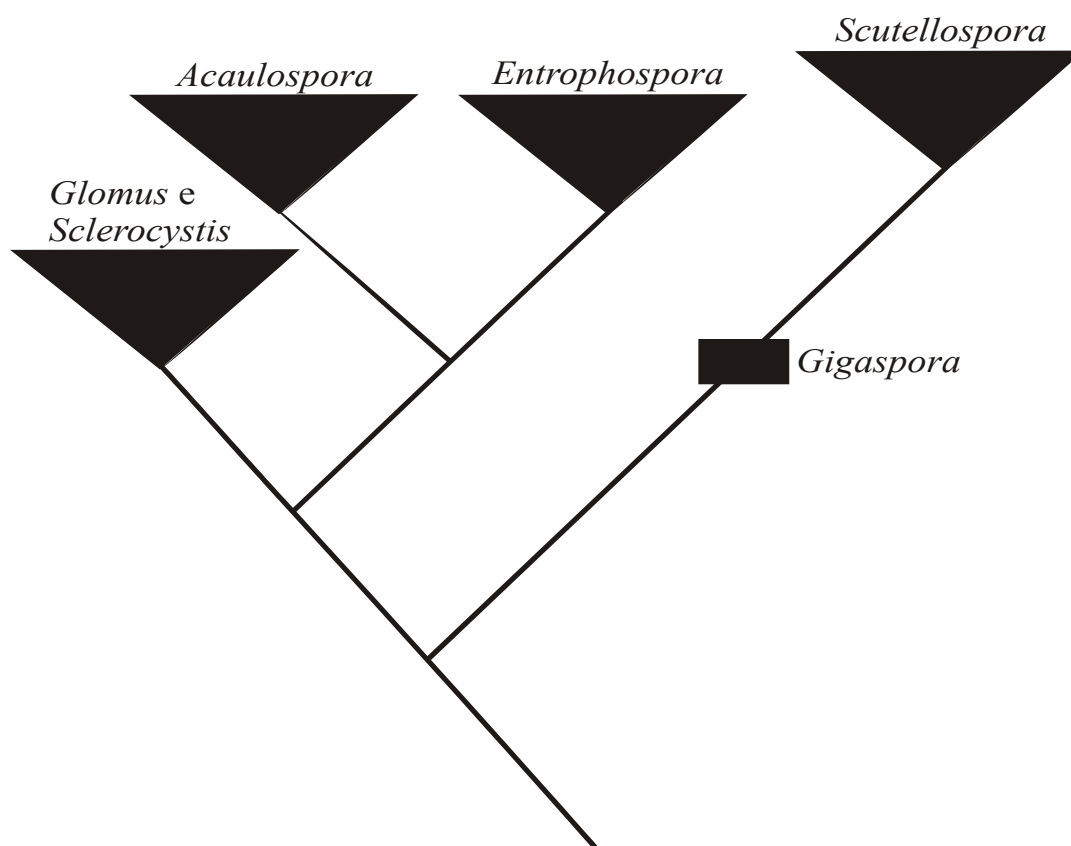


Figura 1. Árvore filogenética representando as relações em Glomales (Morton, 1990).

1.2. Evidências e iniciativas para mudanças na classificação: A bioquímica e a biologia molecular como ferramenta

A descrição de uma ordem (Glomales) para os FMA foi criticada por Walker (1992), que questionou o fato de que um único caráter (habilidade para formar micorriza arbuscular) pudesse definir validamente uma ordem, visto que o hábito ectomicorrízico evoluiu várias vezes e é encontrado em fungos de três classes. Desse modo, também seria possível que o arbúsculo tivesse aparecido em processos evolutivos mais de uma vez. Walker (1992) também questionou o monofiletismo de *Glomus*, com base nos dados de sinanomorfia entre *Glomus leptotichum* e *Acaulospora gerdemannii*, citando a problemática de outras espécies do gênero como *G. lacteum* e *G. scintillans*, que parecem ter mais afinidades com Gigasporaceae do que com Glomaceae, e *Glomus tenue*, que possui polissacarídeos estruturais diferentes daqueles encontrados em outras espécies do gênero. Ainda segundo o autor, fatores tais como modo de germinação e tipos distintos de oclusão do esporo, deveriam ser observados e incluídos em análises filogenéticas de *Glomus*. Entretanto, o destaque do trabalho de Walker (1992) seria a sugestão do uso de dados moleculares na análise filogenética dos FMA.

Em trabalho pioneiro utilizando seqüências de rDNA como ferramenta para classificação de FMA, Simon et al. (1993) observaram diferentes tendências para o grupo em relação às análises morfológicas: Glomales seria realmente monofilético, porém Acaulosporaceae estaria mais próxima de Gigasporaceae do que de Glomaceae; *Scutellospora* seria basal em relação a *Gigaspora* e não o contrário, como observado por Morton (1990) e Glomaceae poderia ser subdividida quando mais espécies fossem analisadas. Contudo, Gianinazzi-Pearson et al. (1994) encontraram β (1 \rightarrow 3) glucanos apenas na parede de espécies de Acaulosporaceae e Glomaceae e reforçaram a hipótese de Morton (1990) a respeito da proximidade filogenética dessas famílias.

Além disso, dados de ontogênese dos esporos (Franke & Morton, 1994; Bentivenga & Morton, 1995; Morton, 1995) indicavam que *Gigaspora* seria basal em relação a *Scutellospora*, como previamente estabelecido com dados morfológicos (Morton, 1990), pois no processo de formação do esporo existiam etapas (formação das “paredes germinativas”) que só ocorriam numa fase posterior e apenas em *Scutellospora*. Esse fato também seria confirmado por Bentivenga & Morton (1996), a partir de análise filogenética com uso do perfil de ácidos graxos.

Graham et al. (1995) observaram a presença do ácido graxo 16:1 ω 7 *cis* apenas em *G. leptotichum* (*A. leptoticha*) e *G. occultum* e chamaram a atenção para o fato de que esporos apenas dessas espécies, dentre todas examinadas, não coram com azul de Trypan. Também observaram a presença do ácido graxo 20:0 iso apenas em *G. claroideum* e *G. etunicatum*.

Schüßler et al. (1994) sugeriram que *Geosiphon pyriforme* (Geosiphonales), fungo não micorrízico que vive em endossimbiose com *Nostoc* (cianobactéria), considerado entre os Zygomycetes, seria relacionado com Glomales devido a semelhanças morfológicas com *Glomus*. Mais tarde essas evidências foram comprovadas através do sequenciamento de SSU rDNA (Gehrig et al., 1996), sendo sugerido que *G. pyriforme* seria uma espécie basal em Glomales. Por outro lado, a partir de análises de seqüências de SSU rDNA, Sawaki et al. (1998) relataram que *A. gerdemanii*/*G. leptotichum* (*A. leptoticha*) ocuparia uma posição basal, separada de todo o grupo, em Glomales. Essa espécie também apresentava características morfológicas quase únicas; assim, dados de morfologia associados a dados moleculares indicavam que uma nova família deveria ser estabelecida.

Morton (1996) iniciou os trabalhos que associariam a ontogênese da parede à descrição de espécies em *Glomus*. Porém, apenas no ano seguinte a ontogenia do esporo seria associada à filogênese e inferidas considerações acerca do polifiletismo no gênero (Stürmer & Morton,

1997). Esses autores relataram que *G. clarum* e *G. etunicatum* apresentavam apenas uma camada de parede nos estádios mais juvenis, enquanto *G. claroideum* e *G. intraradices* formavam duas camadas durante o mesmo estágio de formação. Dessa forma foi considerada, em *Glomus*, a possível existência de dois grupos de espécies com diferentes ancestrais. Apesar da proposição quanto ao polifiletismo em *Glomus*, Stürmer & Morton (1997) não fizeram considerações acerca da similaridade entre *G. claroideum* e *G. etunicatum* quanto ao perfil de ácidos graxos (Graham et al., 1995), já que essas duas espécies apresentam número de camadas diferentes nos estádios iniciais de formação do esporo.

Ainda trabalhando com análise ontogenética, Stürmer & Morton (1999) observaram a formação da parede em espécies de Acaulosporaceae, sugerindo padrão semelhante ao encontrado em *Scutellospora* (Gigasporaceae), porém acrescentaram que as camadas de parede germinativa não são estruturas homólogas nas duas famílias. A formação do esporo a partir de um sáculo esporífero (Acaulosporaceae) e célula esporogênica bulbosa (Gigasporaceae), presença de uma camada evanescente e uma fina camada interna, a camada laminada, na “parede estrutural” do esporo (“spore wall” *sensu* Morton) e camada “beaded” na “parede germinativa do esporo” apenas em Acaulosporaceae foram os argumentos usados para que essas estruturas fossem consideradas análogas.

As evidências mencionadas colocaram em dúvida as relações filogenéticas descritas por Morton (1990) para os FMA. Porém nem mesmo os dados de seqüências de rDNA (Simon et al., 1993) se mostravam plenamente confiáveis, considerando que dados de ácidos graxos (Graham et al., 1995; Bentivenga & Morton, 1996), bioquímica da parede (Gianinazzi-Pearson et al., 1994) e ontogênese dos esporos (Franke & Morton, 1994; Bentivenga & Morton, 1995; Morton, 1995), não pareciam confirmar esses resultados.

1.3. *Atual posição dos FMA: o novo filo*

Com base em estudos, que também incluíam sequenciamento de rDNA, Cavalier-Smith (1998) dividiu Zygomycota em quatro classes, dentre essas a Glomomycetes, que passou a agrupar Glomales e Endogonales; porém o autor a considerou como provavelmente parafilética. Não houve mudanças relevantes na classificação dos FMA neste trabalho, apenas a criação da classe (Tab. 1).

Recentes modificações na classificação dos FMA, reforçando o sugerido por Almeida & Schenck (1990), foram propostas por Redecker et al. (2000a). A partir de seqüências do SSU rDNA, esses pesquisadores transferiram *S. coremioides* (único representante de *Sclerocystis*) para *Glomus*, considerando a sua similaridade com outras espécies desse gênero. Mais tarde, em análise de filogênese a partir de SSU rDNA, Redecker et al. (2000b) determinaram que *G. brasilianum*, *G. occultum*, *A. gerdemanii*/*G. leptotichum* e *A. trappei* formavam dois grupos separados dos outros FMA, ocupando posição basal em relação aos outros membros de Glomales. Além disso, esses autores também observaram que *Geosiphon pyriforme* agrupava-se perfeitamente em Glomales, porém também estaria em um grupo basal separado. A hipótese de que *A. gerdemanii*/*G. leptotichum* estaria em ramos basais em Glomales já havia sido considerada anteriormente (Sawaki et al., 1998), bem como a inclusão de *G. pyriforme* em Glomales havia sido sugerida (Schüßler et al., 1994; Gehrig et al., 1996). A partir desses trabalhos Morton & Redecker (2001) propuseram mudanças mais profundas na classificação dos FMA, criando duas novas famílias e gêneros: Archaeosporaceae (*Archaeospora* Morton & Redecker) e Paraglomaceae (*Paraglomus* Morton & Redecker), com as espécies *Archaeospora leptoticha*, para abrigar *Glomus leptotichum* e *Acaulospora gerdemanii*, e *Archaeospora trappei* substituindo *Acaulospora trappei*, enquanto *Paraglomus occultum* e *P. brasilianum* abrigaram *Glomus occultum* e *G. brasilianum* (Fig. 2 e Tab. 1). *Geosiphon pyriforme*, antes em

Zygomycetes, também passou a ser considerado na classificação do grupo, porém sem definição exata quanto ao posicionamento.

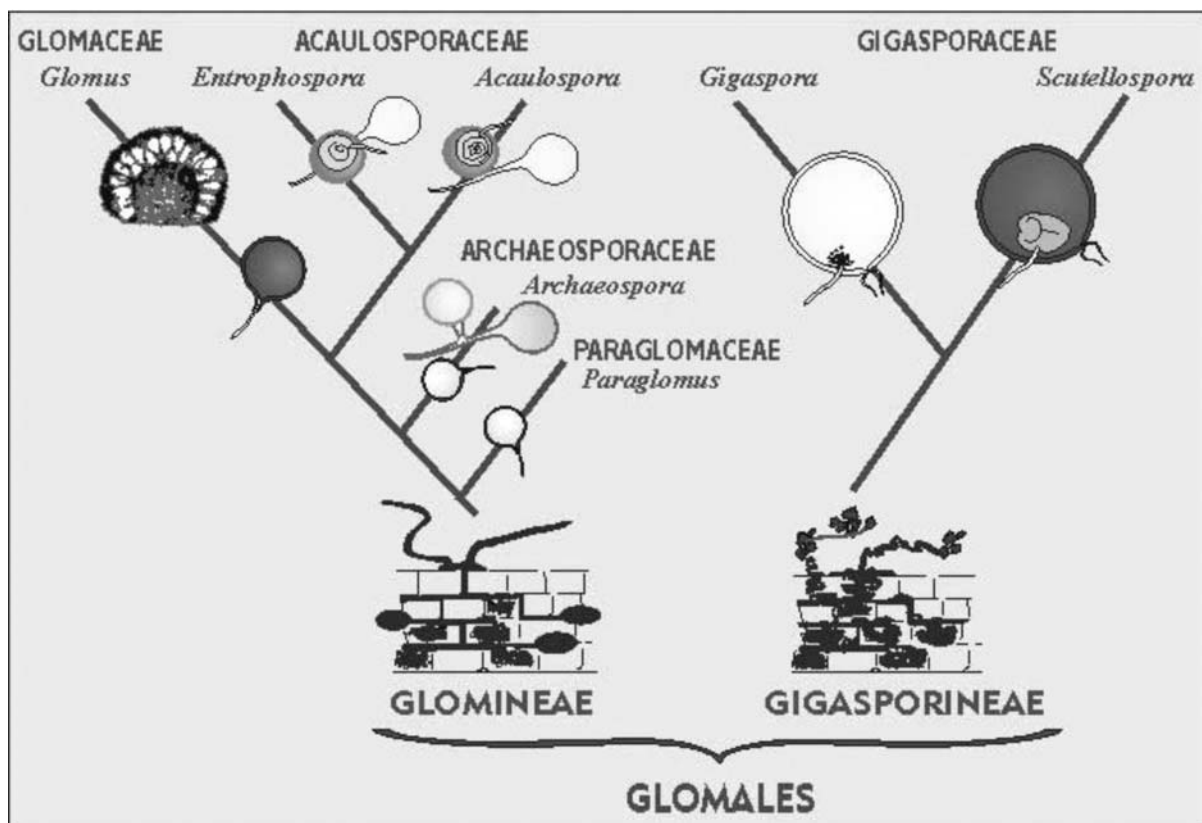


Figura 2. Árvore filogenética representando as relações em Glomales (Morton & Redecker, 2001).

Com base em dados do SSU rDNA, Schwarzott et al. (2001) fizeram observações que viriam a ser cruciais para a atual classificação dos FMA. Inferiram que, mesmo após o trabalho de Morton & Redecker (2001), *Glomus* continuava a ser polifilético; que os FMA, junto com *G. pyriforme*, formavam um grupo monofilético e as relações de Glomales com outros grupos de fungos não seriam suficientes para mantê-los nem em Zygomycota, nem em qualquer outro grupo. Utilizando essas informações, Schüßler et al. (2001) elevaram Glomales à categoria de filo (Glomeromycota), dividido em quatro ordens (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales e

Paraglomerales) e seis famílias (Tab. 1 e Fig. 3). Outros pontos importantes do trabalho foram a criação de uma família para *G. pyriforme* (Geosiphonaceae), o estabelecimento de que Gigasporaceae e Acaulosporaceae estariam próximas, e a criação da família Diversisporaceae, agrupada em Diversisporales juntamente com Acaulosporaceae e Gigasporaceae.

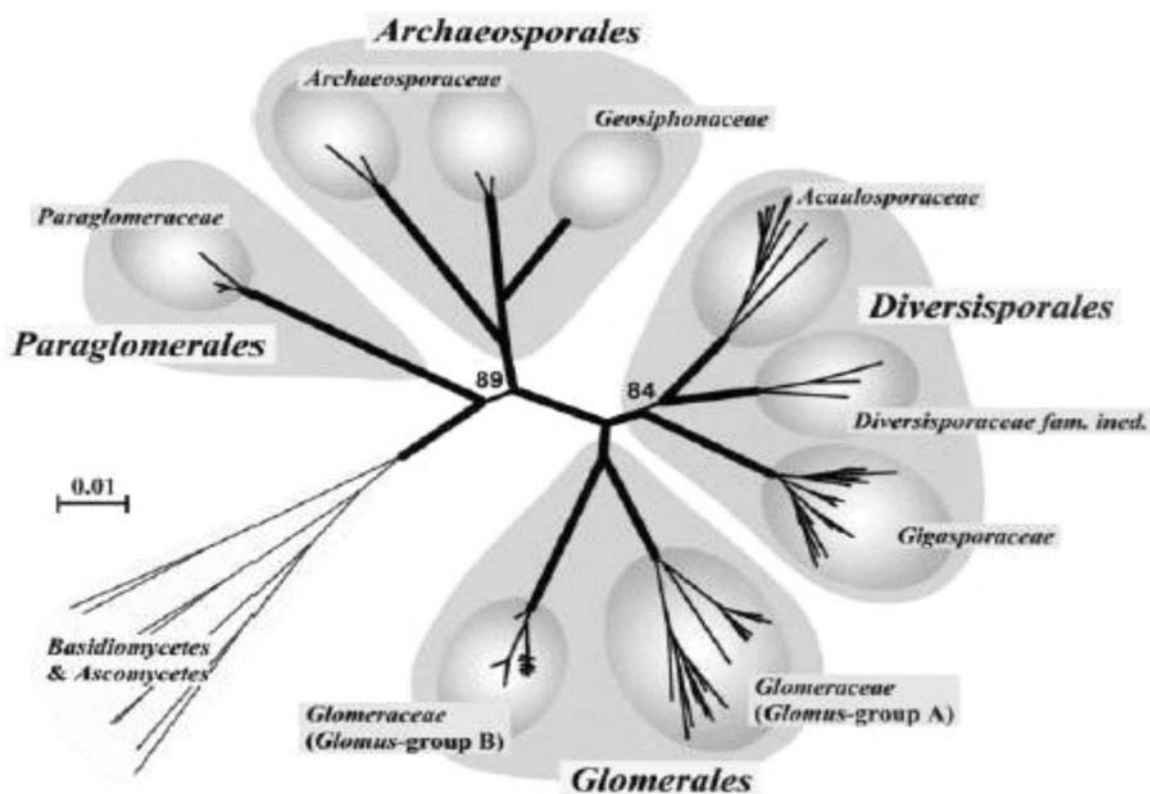


Figura 3. Árvore filogenética representando as relações em Glomeromycota (Schüßler et al., 2001).

2. Interpretação evolutiva e aspectos futuros na classificação de Glomeromycota

As técnicas moleculares aplicadas à classificação dos FMA vieram para ficar. Entretanto, como tantas outras (bioquímica, morfologia, ultraestrutura, etc.), são apenas ferramentas de auxílio à sistemática. Além de ajudar no agrupamento das espécies, a análise filogenética de

seqüências pode ter importante papel na reinterpretação de homologia em caracteres morfológicos, bem como na avaliação de quais componentes bioquímicos seriam importantes na classificação do grupo.

A partir dos dados moleculares seria possível uma reconsideração sobre as observações de analogia das “paredes germinativas” do esporo e estruturas especializadas na germinação (“orb” e placa germinativa) em Acaulosporaceae e Gigasporaceae (*Scutellospora*) (Morton, 1990; Stürmer & Morton, 1999). Uma vez que as duas famílias encontram-se no mesmo grupo com elevados valores de suporte, essas estruturas poderiam ser consideradas homólogas. Além disso, algumas considerações tais como: ausência de camada evanescente e fina camada, interna à camada laminada na “parede estrutural” esporo, ausência de camada “beaded” na “parede germinativa” do esporo em Gigasporaceae e presença dessas estruturas em Acaulosporaceae foram usadas por Stürmer & Morton (1999) para mantê-las como análogas. Porém, *Scutellospora biornata* apresenta uma camada “beaded”, enquanto uma fina camada, interna à laminada, foi observada em *S. cerradensis*, *S. heterogama*, *S. pellucida* e *S. rubra* (Morton 2003 <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>). Além disso, Walker et al. (1998) descreveram a presença de uma camada evanescente em *S. spinosissima*. Se não bastassem todas essas indicações, Kramadibrata et al. (2000) encontraram uma placa germinativa em espiral, semelhante ao “orb” das Acaulosporaceae, em *S. projecturata*.

A perda de caracteres em Gigasporaceae, colocando *Scutellospora* como grupo basal em relação a *Gigaspora*, pode ser considerada, contrariando o proposto por alguns autores (Bentivenga & Morton, 1995; 1996; Franke & Morton, 1994; Morton, 1990; 1995), que mencionaram que o ancestral da família teria características mais relacionadas a *Gigaspora* do que a *Scutellospora*.

Novas considerações acerca de grupos recém-criados também deverão ocorrer. De acordo com Schüßler et al. (2001), Diversisporaceae seria composta por *G. spurcum*, *G. versiforme* e *G. etunicatum*; entretanto, um outro isolado deste último foi agrupado com *G. claroideum*, *G. luteum*, *G. microaggregatum*, *G. lamellosum* e *G. viscosum* em outro clado (Schwarzott et al., 2001). A posição de *G. etunicatum* parece incerta, porém a presença do ácido graxo 20:0 iso apenas neste fungo e em *G. claroideum* (Graham et al., 1995) parece confirmar que *G. etunicatum* não pertence a Diversisporaceae. Apesar dos avanços alcançados na interpretação filogenética em Glomeromycota, muitas lacunas ainda existem, como é o caso dos dois grupos dentro de Glomerales que ainda não estão completamente definidos (*Glomus* grupo A e B), bem como a falta da descrição de *Diversispora* (Schüßler et al., 2001).

Atualmente novos conceitos estão sendo considerados na reconstrução filogenética e a necessidade de análise de outros genes parece ser ponto de partida para essa nova etapa (Moncalvo et al., 2000; Philippe et al., 2000). Genes mitocondriais apresentam uma alternativa na filogenia molecular e alguns trabalhos já demonstram a utilidade dos mesmos em fungos (Moncalvo et al., 2000; Yokoyama et al., 2001; Binder & Hibbett, 2002). Entretanto, é preciso descobrir quais genes podem ser utilizados satisfatoriamente na filogênese, visto que regiões como a ITS podem ser inadequadas para esclarecer relações filogenéticas, ao menos dentro de Gigasporaceae (Lanfranco et al., 2001). Além disso, analisando isolados de *Glomus mosseae*, *G. coronatum* e *G. constrictum* por LSU rDNA, Clapp et al. (2001) observaram variações nas seqüências dentro do mesmo isolado, determinando que esta variação obscureceu a resolução do LSU rDNA ao nível de espécie. Rodriguez et al. (2001) relataram que *E. infrequens* apresenta seqüências de LSU rDNA que agrupam-se tanto em Gigasporaceae quanto em Glomeraceae. É importante observar que *A. myriocarpa*, *E. infrequens* e *E. schenkii* não apresentam estrutura de “paredes germinativas”, sendo ainda, a última, muito similar a *Archaeospora trappei*. Essas

indicações reforçam observações morfológicas feitas por Morton (2003 <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>), sendo as espécies citadas possíveis representantes de Archaeosporaceae. Morton (2003 <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>) também menciona que, ao menos em *A. myriocarpa* e *E. schenkii*, existem os mesmos problemas de coloração com azul de Trypan encontrados em representantes de *Archaeospora*.

Todas essas observações são de interesse na determinação do futuro da pesquisa filogenética em Glomeromycota. No entanto, a análise de maior número de espécies e a utilização de outros genes filogenético-informativos são necessários para o estabelecimento de novos grupos e a consolidação da atual classificação.

3. A origem das plantas terrestres e o registro fóssil dos FMA

De acordo com Kenrick & Crane (1997), as primeiras plantas colonizaram o ambiente terrestre por volta de 480 milhões de anos atrás. Entretanto, o relato de arbúsculos em fósseis de mais de 400 milhões de anos (Remy et al., 1994) indicaria a presença da simbiose micorrízica nas primeiras plantas vasculares, demonstrando que os FMA formam a mais antiga simbiose entre essas plantas e fungos (Redecker et al., 2000c) e que estes organismos ajudaram os seus hospedeiros a colonizar o novo ambiente (Redecker, 2002). Além dessas indicações, a ampla distribuição dos FMA em plantas vasculares (Trappe, 1987) e o provável cenário ambiental há mais de 400 milhões de anos, fortalecem essa teoria. A atmosfera do Siluriano seria rica em oxigênio; entretanto, a disponibilidade do fósforo depende da ausência desse elemento no ambiente e assim os ambientes terrestres seriam pobres nesse componente, essencial para a sobrevivência das plantas (Gryndler, 1992). Ainda segundo o autor, as plantas daquela época não possuíam sistemas radiculares ou outros órgãos adaptados à baixa disponibilidade de fósforo,

sendo possivelmente necessário o auxílio de outro organismo capaz de captar e até mesmo distribuir o elemento para as plantas.

O registro fóssil em fungos é escasso e poucos dados podem ser disponibilizados para uma reconstrução adequada da história desses organismos (Redecker, 2002). Pirozynski & Dalpé (1989) elaboraram uma revisão com os principais registros fósseis de FMA e inferiram que esses fungos poderiam ter surgido desde o Cambriano. Remy et al. (1994) descreveram a presença de arbúsculos em plantas do Siluriano (400 milhões de anos atrás) e Taylor et al. (1995), utilizando caracteres de hifas, clamidósporos e arbúsculos encontrados em fósseis de *Aglaophyton major*, descreveram o gênero *Glomites* (*Glomites rhyniensis*). Esses autores relataram que, a partir de semelhanças morfológicas, esse fungo estaria relacionado a Glomaceae. Entretanto Phipps & Taylor (1996), em análise de fósseis de *Antarcticycas* do Triássico, relataram, pela primeira vez, a presença de estruturas fúngicas possivelmente relacionadas a Gigasporaceae e descreveram a espécie *Gigasporites myriamycetes*. O registro fóssil mais antigo de um FMA data do Ordoviciano, cerca de 460 milhões de anos (Redecker et al., 2000c); na ocasião os autores se basearam na semelhança de esporos e hifas encontrados, com aqueles de *Glomus*. Esses fósseis descritos por Redecker et al. (2000c) são os mais antigos encontrados para fungos.

Apesar da escassez de fósseis de FMA, outro método pode ser usado para decifrar o surgimento dos principais ramos em Glomeromycota. O uso de “relógio molecular” a partir de SSU rDNA mostrou-se muito eficiente (Simon et al., 1993; Redecker et al., 2000c). Simon et al. (1993), antes mesmo de relatos de fósseis relacionados a *Gigaspora*, já haviam descrito que Gigasporaceae e Acaulosporaceae apareceram mais tarde e divergiram dos outros membros de Glomeromycota por volta de 250 milhões de anos atrás, dentro do Triássico. Assim, os dados desses autores vão de encontro aos de Phipps & Taylor (1996). No entanto, a utilização de “relógio molecular” na determinação do aparecimento de Glomeromycota tem se mostrado

controversa. Os dados de Simon et al. (1993) apontam para uma origem de mais de 400 milhões de anos e esses resultados também são confirmados por Redecker et al. (2000c), que indicam uma origem de mais de 460 milhões de anos; porém, de acordo com Heckman et al. (2001), a associação micorrízica teve início há cerca de 800 milhões de anos. Outros estudos sobre fósseis de FMA são necessários para desvendar o passado do grupo e melhor calibrar os dados de “relógio molecular” em estudos futuros, confirmando ou estabelecendo novas hipóteses evolutivas para esses fungos e seus hospedeiros.

4. Ferramentas usadas na identificação de FMA

4.1. Métodos morfológicos na identificação

Grandes avanços na taxonomia de FMA foram obtidos após a revisão taxonômica de Endogonaceae realizada por Gerdemann & Trappe (1974). Esses autores não apenas organizaram a distribuição dos gêneros na família, como estabeleceram bases para identificação e descrição das espécies. Para identificação dos FMA eram usados, principalmente, caracteres como diâmetro da hifa de sustentação do esporo, formação de esporocarpos, presença de perídio, espessura da parede do esporo, cor e diâmetro do esporo, presença de paredes internas no esporo, entre outros. Porém, Walker (1983) revolucionaria a taxonomia de FMA, após observações cuidadosas e criteriosas dos diferentes “tipos de parede” nesses fungos (Fig. 4). Esse autor elaborou método sistemático e aparentemente simples para a identificação das espécies, nomeando e representando graficamente cada “tipo de parede”. A partir de então as novas descrições, nesse grupo, seguiram essa metodologia; entretanto, na medida em que novas espécies eram encontradas, “tipos de parede” não descritos por Walker (1983) eram relatados (Berch & Koske, 1986; Morton, 1986b; Walker, 1986; Spain et al., 1989).

Atualmente a identificação dos FMA se baseia, sobretudo, nos padrões descritos em Walker (1983). Morton (1988) fez uma extensa revisão sobre os conceitos e caracteres usados na identificação e suas considerações estão resumidas na tabela 2. Entretanto, apesar dos avanços na taxonomia dos FMA, um grande problema encontrado é que muitas espécies foram descritas antes da formulação desses conceitos (conceitos taxonômicos tradicionais) e a necessidade de trabalhos de redescrição é indiscutível, principalmente para diminuir as dificuldades na identificação (Walker, 1992).

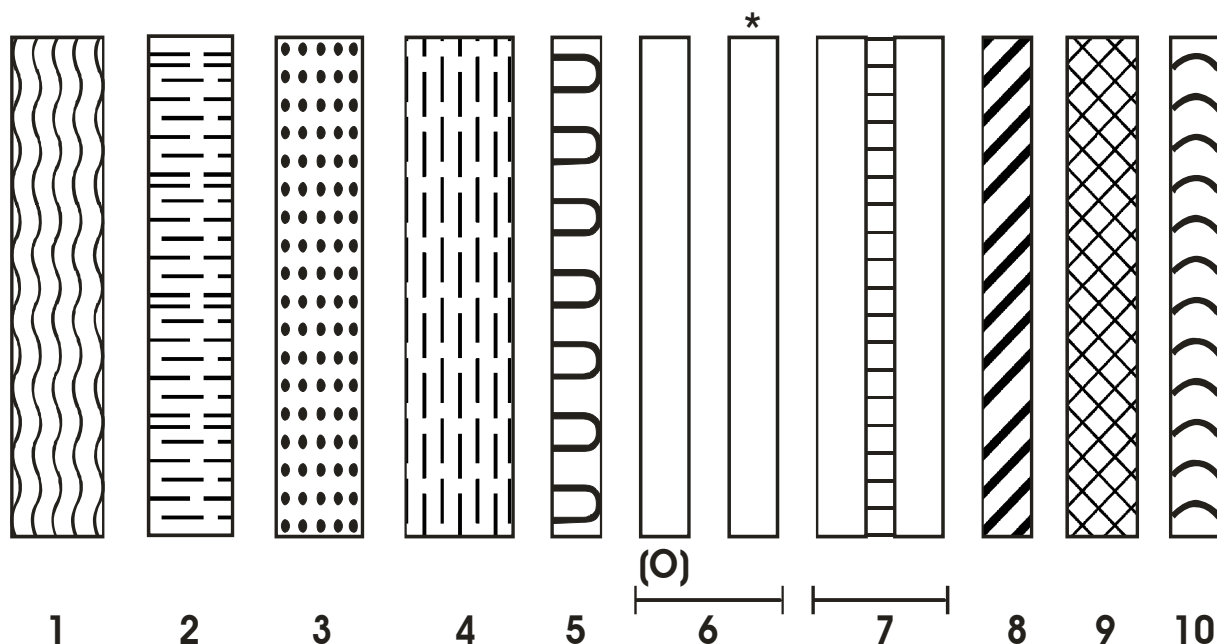


Figura 4. Representação gráfica dos “tipos de parede” de FMA (Walker, 1983; Koske, 1986; Morton, 1986; Walker, 1986; Spain et al., 1989). 1- Perídio; 2- parede expansiva; 3- parede evanescente; 4- parede laminada; 5- parede germinativa; 6- duas paredes unitárias; 7- duas paredes unitárias unidas por uma camada cimentante; 8- parede membranosa; 9- parede coriácea; 10- parede amorfa. (O)- superfície ornamentada; *- difícil de ver.

Apesar dos conceitos estabelecidos por Walker (1983) serem úteis do ponto de vista taxonômico, eles não são adequados num enfoque filogenético, pois não mostram as relações entre as espécies de FMA a partir da formação das camadas de parede do esporo. Assim, um

novo padrão na descrição de espécies, baseado na ontogênese do esporo foi proposto (Franke & Morton, 1994; Bentivenga & Morton, 1995; Morton, 1995; Stürmer & Morton, 1997; 1999), levando em consideração dados com valores filogenéticos e não meramente fenéticos, como até então. De acordo com esse novo padrão a parede do esporo estaria dividida em apenas dois grupos principais: “parede estrutural” e “parede germinativa” do esporo e cada um desses grupos estaria subdividido em camadas (Fig. 5). Apesar de parecer mais complexo, o método que utiliza dados ontogenéticos, sem dúvida, é mais coerente e lógico.

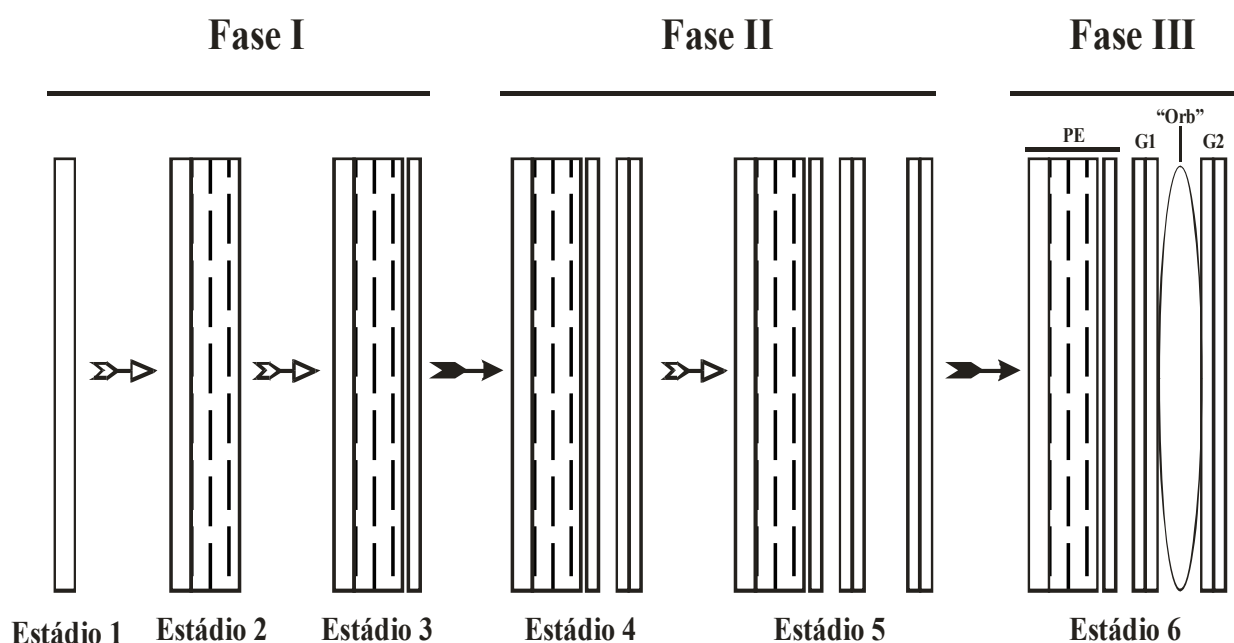


Figura 5. Representação esquemática do padrão de desenvolvimento em esporos de *Acaulospora* (Stürmer & Morton, 1999). As fases estão relacionadas com a formação dos principais grupos de parede (“estrutural” e “germinativa”) do esporo e de estruturas especializadas na germinação (“orb” ou placa germinativa). Fase I: formação da “parede estrutural”; Fase II: formação das “paredes germinativas”; fase III: surgimento de estrutura especializada na germinação. Cada estágio representa o surgimento de novas camadas ou grupos de camadas de parede dentro de uma fase. Setas brancas indicam transição entre os estádios; setas pretas indicam transição entre as fases. PE= “parede estrutural” do esporo; G1= “parede germinativa” 1; G2= “parede germinativa” 2.

Além da morfologia do esporo, as estruturas vegetativas dos FMA podem ser usadas na identificação de famílias e de certos gêneros. Abbott (1982) discutiu em detalhe as diferentes conformações das estruturas somáticas em FMA; no entanto, esse método de identificação não é freqüentemente usado pelos taxonomistas, pois apesar de apresentar uma noção de qual fungo está colonizando a raiz da planta, é menos prático que os tradicionais.

Tabela 2. Principais características usadas na identificação de FMA. Modificado de Morton (1988)

Categorias	Características a serem observadas
Organização do esporo	Agregação de esporos nas raízes Agregação de esporos em esporocarpos
Morfologia do esporocarpo	Arranjo dos esporos Diâmetro, forma e cor dos esporocarpos Textura da superfície do esporocarpo Perídio do esporocarpo “Glebal hifa” do esporocarpo Substâncias liberadas do esporocarpo
Morfologia do esporo	Diâmetro, forma e cor Densidade do esporo
Estrutura da parede do esporo	Tipo e número de paredes Espessura da parede Ornamentação da parede Grupos de parede Posição das paredes Reação ao reagente de Melzer
Morfologia da hifa de sustentação e célula esporogênica	Número de hifas por esporo Cor e forma Número de paredes Espessura Característica do pedicelo
Oclusão do esporo	Tipo de oclusão
Morfologia do sáculo esporífero	Diâmetro, forma e cor Paredes do sáculo
Características não morfológicas	Características bioquímicas Características imunológicas Características genéticas

4.2. Identificação de FMA a partir de métodos não morfológicos

O esporo é praticamente a única estrutura que contém as características necessárias à identificação dos FMA em nível de espécie, porém este deve encontrar-se em bom estado para a correta avaliação dessas características (Morton, 1993). Contudo, a identificação dos FMA ao nível específico requer bastante experiência do pesquisador para realizá-la corretamente (Bentivenga & Morton, 1994). Assim, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os FMA a partir de métodos que exijam menos experiência do taxonomista, envolvendo análises moleculares ou bioquímicas. Outra razão para a busca de métodos alternativos de identificação é a necessidade de se identificar corretamente, não só o fungo que está na rizosfera, mas o que está colonizando o hospedeiro.

Dentre os métodos utilizados, pode-se destacar o uso de perfis de ácidos graxos, que apareceu como uma das alternativas promissoras; entretanto, os dados coletados se mostraram mais aplicáveis na filogênese do que na identificação dos fungos (Sancholle & Dalpé, 1993; Graham et al., 1995; Bentivenga & Morton, 1996). Pesquisadores também têm usado isoenzimas (Hepper et al., 1986; 1988) e análises de DNA através de perfis eletroforéticos, comparação de seqüências e construção de primers espécie-específicos na identificação desses fungos (Wyss & Bonfante, 1993; Helgason et al., 1998; Lanfranco et al., 2001).

Wyss & Bonfante (1993) amplificaram o DNA genômico de algumas espécies de FMA através de RAPD e observaram que os padrões de banda obtidos apresentaram variação entre isolados de uma mesma espécie. O RAPD parece ser uma boa técnica para separação de isolados, mas não é apropriada para observações de relações filogenéticas ou para aplicações taxonômicas ao nível interespecífico. Lanfranco et al. (1995) isolaram bandas espécie-específicas para *G. mosseae* em análise de RAPD e desenharam primers a partir desses fragmentos. Com esses

primers, os autores foram aptos a amplificar o DNA de vários isolados dessa espécie, inclusive a partir de raízes micorrizadas.

Vários autores, usando a comparação de seqüências ITS, têm desenvolvido primers capazes de identificar espécies de FMA a partir da amplificação de DNA extraído dos esporos ou de raízes colonizadas. Lanfranco et al. (1999), a partir dessas seqüências, desenvolveram primers específicos para *G. margarita* e *G. decipiens*; os primers para *G. rosea* foram desenhados por Lanfranco et al. (2001) e usados na resolução de problemas de identificação morfológica dessa espécie, sendo observado que dois isolados identificados como *G. margarita* eram na verdade *G. rosea*. Primers funcionais para *G. mosseae* e *G. monosporum* (Millner et al., 1998), *G. etunicatum* (Millner et al., 2001a), *G. occultum* e *G. brasilianum* (Millner et al., 2001b) também foram desenvolvidos seguindo essa metodologia. Esta abordagem molecular de identificação apresenta excelentes resultados, porém o número de espécies para as quais primers espécie-específicos foram desenhados ainda é baixo e não permite abordagem ecológica da diversidade de FMA. Trabalhos nessa área são importantes e necessários para resolver conflitos na identificação morfológica.

Em análises da diversidade de FMA em comunidades vegetais vários pesquisadores têm usado uma comparação direta de seqüências parciais do SSU rDNA de fungos colonizando as raízes, com aquelas referidas no GenBank, além de também usarem análises de RFLP para comparação do perfil de cada grupo (Helgason et al., 1998; Daniell et al., 2001; Husband et al., 2002a; 2002b). Essa técnica tem apresentado bons resultados; o problema é que geralmente é possível chegar, no máximo, a identificar os gêneros de FMA presentes nas raízes, pois os padrões apresentados nas análises de RFLP e as comparações de seqüências permitem apenas uma aproximação da possível espécie sem, no entanto, identificação exata. Entretanto, Redecker (2000) desenhou primers específicos para determinados grupos de FMA e a partir de análises de

RFLP dos fragmentos obtidos com esses primers, o autor distinguiu a maioria das espécies dentro de cada grupo (exceto para Gigasporaceae) a partir do DNA extraído dos esporos ou de raízes colonizadas.

Assim, a taxonomia molecular de FMA tem evoluído bastante nos últimos anos e a sua utilização na identificação de espécies de difícil diagnóstico morfológico é de grande valor. O uso das técnicas moleculares também é importante na determinação dos fungos que estão participando ativamente da simbiose em determinada comunidade vegetal. Entretanto, não é possível avaliar a comunidade de FMA apenas por métodos moleculares. No momento, as ferramentas moleculares ainda não permitem o reconhecimento de espécies com segurança; além disso, estima-se que existam mais de 2500 espécies de FMA (Morton et al., 1995), sendo que apenas cerca de 157 são conhecidas (Kirk et al., 2001). Como nomear e inferir padrão molecular para espécies não conhecidas? A descrição de novos táxons utiliza critérios essencialmente morfológicos e dessa forma é imprescindível que as espécies de Glomeromycota sejam analisadas morfológicamente em estudos de diversidade. O uso de técnicas moleculares na identificação é válido, desde que associado às técnicas morfológicas tradicionalmente usadas.

REFERÊNCIAS

- Abbott, L.K. 1982. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian Journal of Botany* 30: 485-499.
- Almeida, R.T.; Schenck, N.C. 1990. A revision of the genus *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales). *Mycologia* 82: 703-714.
- Ames, R.N.; Schneider, R.W. 1979. *Entrophospora*, a new genus in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 8: 347-352.

- Bentivenga, S.P.; Morton, J.B. 1994. Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. Pp. 283-308 In: Mycorrhizae and Plant Health. Ed. Pflieger, F. L.; Linderman, R. G. APS Press. St. Paul.
- Bentivenga, S.P.; Morton, J.B. 1995. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 719-731.
- Bentivenga, S.P.; Morton, J.B. 1996. Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 5659–5662.
- Berch, S.M.; Koske, R.E. 1986. *Glomus pansihalos*, a new species in the Endogonaceae, Zygomycetes. *Mycologia* 78: 832-836.
- Berkeley, M.J.; Broome. 1873. Fungi of Ceylon. *Journal of the Linnaean Society* 14: 137.
- Binder, M.; Hibbett, D.S. 2002. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76–90.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73: 203-266.
- Cooper, K.M.; Tinker, P.B. 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist* 81: 43-52.
- Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H.; Young, J.P.W. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209.
- Francis, R.; Read, D.J. 1995. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Canadian Journal of Botany* 73 (Supp.1): 1301-1309.

- Frank, B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durchunterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 3: 128-145.
- Franke, M.; Morton, J.B. 1994. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. *Canadian Journal of Botany* 72: 122-134.
- Gehrig, H.; Scüssler, A.; Kluge, M. 1996. *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43: 71-81.
- Gerdemann, J.W.; Trappe, J.M. 1974. The Endogonaceae of the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* 5: 1-76.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Lemoine, M-C.; Arnould, C.; Gollotte, A.; Morton, J.B. 1994. Localization of β (1-3) glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales. *Mycologia* 86: 478-485.
- Graham, J.H.; Hodge, N.C.; Morton J.B. 1995. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 58-64.
- Gryndler, M. 1992. The ecological role of mycorrhizal symbiosis and the origin of the land plants. *Ceská Mykologie* 46: 93-98.
- Heckman, D.S.; Geiser, D.M.; Eidell, B.R.; Stauffer, R.L.; Kardos, N.L.; Hedges, S.B. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293: 1129–1133.

- Helgason, T.; Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H.; Young, J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 384: 431.
- Hepper, C.M.; Sen, R.; Azcon-Aguilar, C.; Grace, C. 1988. Variation in certain isozymes amongst different geographic isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum*, and *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry*. 20: 51-59.
- Hepper, C.M.; Sen, R.; Maskall, C.S. 1986. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytologist* 102: 529-539.
- Husband, R.; Herre, E.A.; Young, J.P.W. 2002a. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 131-136.
- Husband, R.; Herre, E.A.; Turner, S.L.; Gallery, R.; Young, J.P.W. 2002b. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* 11: 2669-2678.
- Kenrick, P.; Crane, P. R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C.; Stalpers, J.A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th edition. CAB International, Oxon.
- Kramadibrata, K.; Walker, C.; Schwarzott, D.; Schüßler, A. 2000. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Annals of Botany* 86: 21-27.
- Lanfranco L.; Wyss, P.; Marzachi, C.; Bonfante, P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology* 4: 61-68.

- Lanfranco, L.; Delpero, M.; Bonfante, P. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8: 37–45.
- Lanfranco, L.; Bianciotto, V.; Lumini, E.; Souza, M.; Morton, J.B.; Bonfante, P. 2001. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytologist* 152:169-179.
- Luttrell, E.S. 1958. The function of taxonomy in Mycology. *Mycologia* 50: 942-944.
- Millner, P.D.; Mulbry, W.W.; Reynolds, S.L.; Patterson, C.A. 1998. A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 8:19–27.
- Millner, P.D.; Mulbry, W.W.; Reynolds, S.L. 2001a. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. *Mycorrhiza* 10:259–265.
- Millner, P.D.; Mulbry, W.W.; Reynolds, S.L. 2001b. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of two ancient endomycorrhizal fungi, *Glomus occultum* and *Glomus brasilianum*. *FEMS Microbiology Letters* 196: 165-170.
- Moncalvo, J.M.; Drehmel, D.; Vilgalys, R. 2000. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 48-63.
- Morton, J.B. 1986. Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminum low pH soils in West Virginia. *Mycologia* 78: 641-648.
- Morton, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Morton, J.B. 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207.

- Morton, J.B. 1993. Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* 2: 97-109.
- Morton, J.B. 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87: 127–137.
- Morton, J.B. 1996. Redescription of *Glomus caledonium* based on correspondence of spore morphological characters in type specimens and a living reference culture. *Mycorrhiza* 6: 161–166.
- Morton, J.B.; Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Morton, J.B.; Bentivenga, S.P.; Bever, J. 1995. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 25-32.
- Morton, J.B.; Redecker, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Philippe, H.; Germot, A.; Moreira, D. 2000. The new phylogeny of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 10: 596–601.
- Phipps, J.; Taylor, T.N. 1996. Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* 88: 707-714.
- Pirozynski, K.A.; Dalpé, Y. 1989. Geological history of the Glomaceae, with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7: 1–36.

- Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73–80.
- Redecker, D.; Morton, J.B.; Bruns, T.D. 2000a. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92: 282-285.
- Redecker, D.; Morton, J.B.; Bruns, T.D. 2000b. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14: 276–284.
- Redecker, D.; Kodner, R.; Graham, L.E. 2000c. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921.
- Redecker D. 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Research in Microbiology* 153: 125–130.
- Remy, W.; Taylor, T.N.; Hass, H.; Kerp, H. 1994. Four hundredmillion-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 11841-11843.
- Rodriguez, A.; Dougall, T.; Dodd, J.C.; Clapp, J.P. 2001. The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytologist* 152: 159–167.
- Sancholle, M.; Dalpé, Y. 1993. Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* 49: 187-193.
- Sawaki, H.; Sugawara, K.; Saito, M. 1998. Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* 39: 477-480.
- Schüßler, A.; Mollenhauer, D.; Schnepf, E.; Kluge, M. 1994. *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Botanica Acta* 107: 36-45.

- Schüßler, A.; Schwarzott, D.; Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schwarzott, D.; Walker, C.; Schüßler, A. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is non-monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197.
- Simon, L.; Bousquet, J.; Lévesque, R.C.; Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Spain, J.L.; Sieverding, E.; Schenck, N.C. 1989. *Gigaspora ramisporophora*: A new species with novel sporophores from Brazil. *Mycotaxon* 34: 667-677.
- Stürmer, S.L.; Morton, J.B. 1997. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 89: 72-81.
- Stürmer, S.L.; Morton, J.B. 1999. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 91: 849-857.
- Taylor T.N.; Remy W.; Hass H.; Kerp H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from early Devonian. *Mycologia* 87: 560-563.
- Thaxter, R. 1922. A revision of the Endogonaceae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 57: 291-351.
- Tulasne, L.R.; Tulasne, C. 1845. Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cognito act. *Giornale Botanico Italiano* 2: 55-63.
- Walker, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall concepts in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455.
- Walker, C. 1986a. Problems in taxonomy of mycorrhizal fungi. In: *Mycorrhizae: physiology and genetics*. I ESM, Dijon, 1985 - INRA, Paris.

- Walker, C. 1986b. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: II. A fifth morphological wall type in endogonaceous spores. *Mycotaxon* 25: 95-99.
- Walker, C.; Sanders, F.E. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. and Trappe. *Mycotaxon* 27: 169-182.
- Walker, C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897.
- Walker, C.; Cuenca, G.; Sánchez, F. 1998. *Scutellospora spinosissima* sp. nov., a newly described glomalean fungus from acidic, low nutrient plant communities in Venezuela. *Annals of Botany* 82: 721-725.
- Wyss, P.; Bonfante, P. 1993. Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycological Research* 97: 1351-1357.
- Yokoyama, K; Wang, L.; Miyaji, M.; Nishimura K. 2001. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters* 200: 241-246.

CAPÍTULO 2

Glomeromycota: novos pontos em filogenia a partir de caracteres morfológicos

Artigo a ser enviado ao periódico Mycorrhiza

Gladstone Alves da Silva · Leonor Costa Maia

Glomeromycota: novos pontos em filogenia a partir de caracteres morfológicos

G.A. Silva · L.C. Maia

Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson
Chaves, s/n. 50670-420 Recife, PE, Brasil. Fone: +55 81 32718865. Fax: +55 81 32718482.

e-mail: leonorcmaia@hotmail.com

Resumo Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam a mais antiga associação entre plantas terrestres e fungos encontrada na natureza e contribuem na definição e manutenção de comunidades vegetais. A classificação dos FMA tem sofrido grandes modificações e recentemente esses organismos foram agrupados em um novo filo (Glomeromycota), sendo dados de seqüências de rDNA considerados como base para essa nova classificação. Os objetivos desse trabalho foram demonstrar os problemas com as primeiras análises morfológicas do grupo, propor alternativas de critérios morfológicos atendendo a novos padrões evolutivos, relacionar as árvores obtidas entre si e com aquelas geradas a partir de dados moleculares, contribuindo para melhor conhecimento das relações em Glomeromycota. As árvores filogenéticas foram geradas a partir de análises de máxima parcimônia e “neighbor joining” de dados morfológicos, usando critérios anteriormente descritos e novas considerações evolutivas para o grupo. Seis árvores foram construídas e em todas Glomeromycota emergiu como grupo monofilético, *Glomus* formou um grupo polifilético e Gigasporaceae e Acaulosporaceae estiveram unidas no mesmo clado. Usando critérios evolutivos aqui descritos, foi observada a formação de um grupo basal para Paraglomerales e Archaeosporales em análises de “neighbor joining”. Os resultados suportam considerações feitas a partir de análises filogenéticas de seqüências, indicando que muitas das mudanças sugeridas a partir desses dados são válidas, e que no futuro novos arranjos taxonômicos deverão ser propostos para Glomeromycota.

Palavras-chave: micorriza arbuscular, FMA, filogênese, sistemática, cladística

Abstract The arbuscular mycorrhizal fungi form the oldest symbiotic association between plants and fungi on earth, contributing for definition and maintenance of plant communities. Classification of AMF has changed and more recently these fungi were grouped in a new phylum (Glomeromycota), based on data from rDNA sequences. The aims of this work were to shown the problems with the first morphological analysis of the group, suggest alternatives of morphological criteria considering the new evolutive patterns and, show the relationships between the obtained trees and those generated using on molecular data, contributing for better understanding the relations in Glomeromycota. Phylogenetic trees were generated from analysis of maximum parsimony and neighbor joining of morphological data, using criteria already known and new evolutive considerations for the group. Six trees were built and in all of them Glomeromycota appears as a monophyletic group and *Glomus* formed a poliphyletic group, while Gigasporaceae and Acaulosporaceae were together in the same clade. Using evolutionary criteria here described, the formation of a basal group was observed for Paraglomeraceae and Archaeosporales in analysis of neighbor joining. The results support considerations based on phylogenetic analysis of sequences, indicating that many of the changes suggested from these data are valid and that in the future new taxonomic arrangements should be proposed for Glomeromycota.

Key-words: arbuscular mycorrhiza, AMF, phylogenesis, systematic, cladistic.

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam associação simbiótica com a maioria das espécies vegetais e têm grande importância agrônômica e ecológica, por aumentar a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas (Smith e Read 1997). O registro fóssil mais antigo de um FMA data do Ordoviciano, há cerca de 460 milhões de anos (Redecker et al. 2000c) e o relato de arbúsculos em fósseis vegetais de mais de 400 milhões de anos (Remy et al. 1994), indicaria a presença da simbiose micorrízica nas primeiras plantas vasculares. Assim, acredita-se que os FMA formam a mais antiga simbiose entre plantas terrestres e fungos (Redecker et al. 2000c) e que esses organismos ajudaram as plantas a colonizar o ambiente terrestre (Redecker 2002), contribuindo na definição e manutenção de comunidades vegetais nos diversos biomas (Francis e Read 1995).

Um dos principais trabalhos de filogênese para os FMA, a partir de dados morfológicos, foi realizado por Morton (1990) e gerou dados para que esses fungos fossem considerados um grupo monofilético, sendo agrupados na ordem Glomales (Morton e Benny 1990). Entretanto, para Walker (1992) a evidência de monofilia em Glomales não possuía bases fortes, pois estava relacionada apenas a um caráter (arbúsculo), que poderia ter evoluído várias vezes como um fenômeno de convergência.

Num trabalho pioneiro em filogênese molecular de Glomales (Simon et al. 1993) foi apresentada análise filogenética do grupo com base em estimativas de relógio molecular, sendo sugerido que Glomales seria realmente uma ordem monofilética, porém Acaulosporaceae estaria mais próxima de Gigasporaceae do que de Glomaceae, contrariando os resultados de Morton (1990) quanto à proximidade entre essas famílias. Outros trabalhos com enfoque na filogênese molecular dos FMA foram realizados (Redecker et al. 2000a, b; Morton e Redecker 2001; Schwarzott et al. 2001), sendo proposto num deles que os FMA constituem um filo - Glomeromycota (Schüßler et al. 2001).

O trabalho de Morton (1990) constituiu a única avaliação filogenética para o grupo a partir de dados morfológicos e considerando número razoável de espécies, porém neste trabalho não foram utilizados programas de filogênese. As considerações evolutivas de alguns caracteres morfológicos em Glomeromycota têm se modificado ao longo da última década e novas avaliações são necessárias tanto para suporte da atual classificação, quanto para detecção de novos pontos de discussão.

Neste estudo os objetivos foram: construir árvores filogenéticas usando os mesmos critérios usados por Morton (1990), demonstrando os problemas com as primeiras análises morfológicas; propor alternativas de critérios morfológicos atendendo a novos padrões evolutivos; relacionar as árvores obtidas entre si e com aquelas geradas a partir de dados moleculares, mostrando se os dados morfológicos corroboram as atuais afirmações acerca das relações em Glomeromycota.

Materiais e métodos

Foram consideradas apenas as espécies tratadas por Morton (1990) e aquelas com descrição disponível no INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>), para melhor padronização descritiva dos táxons.

Dois conjuntos de caracteres foram usados: o primeiro tomando por base os critérios morfológicos propostos por Morton (1990) e o segundo, incluindo novas considerações evolutivas, presentes em descrições mais recentes (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>).

Conjunto de caracteres I

Foram consideradas 57 espécies (incluindo algumas atualmente em sinónimas) (Tab. 1) e usados vinte e sete caracteres (Tab. 2), sendo mantidas as considerações feitas por Morton (1990) acerca da polaridade dos estados. Duas matrizes foram geradas, a primeira praticamente idêntica à de Morton (1990) e tratada aqui como matriz 1 (Tab. 3). Na segunda

matriz (matriz 2), os caracteres não comparáveis em determinados táxons (referentes a estruturas que não existem em algumas das espécies estudadas) não influenciaram nas análises, e foram indicados na matriz 2 pelo símbolo “?” (Tab. 4). Entretanto, foram tratados como estados plesiomórficos na matriz 1. O caráter seis na matriz original de Morton (1990) indicava que *G. rubiforme* e *G. coremioides* formariam agregados de esporos; estas espécies claramente formam esporocarpos e assim foram tratadas nesse trabalho.

Conjunto de caracteres II

Foram consideradas 83 espécies (dois sinanórficos) (Tab. 1) e usados vinte e seis caracteres (Tab. 5), tomando por base novas considerações para a polarização de parte dos mesmos. Na matriz de dados gerada (matriz 3, Tab. 6), assim como na matriz 2, os caracteres não comparáveis em determinados táxons, não tiveram efeito nas análises dos mesmos.

Análise filogenética

Para a análise filogenética e construção de árvores foi utilizado o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Os dados gerados nas matrizes foram computados a partir de pesquisa heurística de máxima parcimônia (MP) (método de Wagner) e neighbor joining (NJ), sendo geradas, respectivamente, 10000 e 1000 árvores. Os índices de consistência (IC) e retenção (IR), para as análises de MP também foram calculados pelo programa. Na análise de NJ para o conjunto de caracteres I, foram geradas pouco mais de 300 árvores. A árvore consenso foi obtida a partir de Majority-rule, para as análises de MP, e de estrito consenso, para as de NJ. Glomeromycota foi tratado aqui como grupo monofilético e um grupo externo artificial, possuindo os estados plesiomórficos de todos os caracteres, foi usado para enraizar as árvores.

Resultados

Análise do conjunto de caracteres I (matriz 1)

A partir da árvore gerada por MP foram observados três grupos dentro de Glomeromycota (Fig. 1). No clado onde se encontrou *Paraglomus occultum* também foi agrupado *Glomus*

tortuosum, com suporte de 100% das árvores obtidas na análise. Acaulosporaceae foi agrupada com Gigasporaceae para formar Diversisporales, o que também foi suportado por 100% das árvores. Glomerales foi formado pelas outras espécies de *Glomus*, *Acaulospora myriocarpa* e *Archaeospora leptoticha*, porém, com apenas 57% de suporte.

Na família Gigasporaceae existiu clara definição para *Scutellospora* como grupo (100% das árvores), entretanto *Gigaspora* não formou um clado agrupando os seus representantes.

Embora todos os grupos para Acaulosporaceae tenham apresentado suporte de 100% das árvores, as relações filogenéticas entre *Acaulospora* e *Entrophospora* (Acaulosporaceae) não pareceram claras. Duas espécies ficaram claramente separadas de *Acaulospora*: *E. infrequens* ocupou posição basal e *E. schenkii* formou um ramo separado das outras espécies de *Acaulospora*, enquanto outra espécie (*E. colombiana*) encontrou-se, na árvore, relacionada com *A. lacunosa* e *A. dilatata* em um dos dois cladogramas que agruparam as espécies desse gênero.

As relações em Glomerales foram mais complexas, apresentando dois ramos principais, um deles com *G. etunicatum*, isolado do resto do grupo. O outro ramo, dividido em dois, apresentou um clado agrupando 11 espécies, todas de *Glomus* (Gl A), e outro clado relacionando espécies de *Glomus* e outros gêneros (Gl B). Esses dois grupos apresentaram suporte de 57% e 76%, respectivamente. Não foi possível estabelecer um grupo separado para Archaeosporales; contudo, os dois sinônimos de *A. leptoticha* foram agrupados relativamente próximos.

Na análise de NJ todos os grupos de Glomeromycota foram suportados pelo total de árvores geradas (Fig. 2). *Paraglomus occultum* e *G. tortuosum* formaram o grupo mais basal da árvore (Paraglomerales); logo depois emerge *G. etunicatum* isoladamente.

Com relação a Diversisporales a topologia dos ramos foi praticamente idêntica àquela observada na análise de MP. Entretanto, *Gigaspora* (Gigasporaceae) apareceu como grupo

separado e algumas espécies isoladas de *Scutellospora* e *Acaulospora* ocuparam diferentes posições na árvore.

O grupo relativo a Glomerales também assumiu uma topologia semelhante à da árvore gerada por MP; entretanto, algumas espécies ocuparam posições diferentes nos ramos. Dois clados foram observados, um deles agrupando espécies de *Glomus*, *Acaulospora* e *Archaeospora* (Gl A) e outro formado por 17 espécies de *Glomus* (Gl B).

Análise do conjunto de caracteres I (matriz 2)

Três grupos foram observados em Glomeromycota nas análises de MP (Fig. 3). O primeiro (Glomeraceae A) teve 85% de suporte e apresentou 11 espécies de *Glomus*, esse clado agrupou as mesmas espécies observadas em Gl A nas análises de MP (Fig. 1).

O segundo clado foi representado por Diversisporales e Paraglomerales, suportado por apenas 52% das árvores. Paraglomerales foi representado por *P. occultum* e *G. tortuosum*. Diversisporales apresentou Acaulosporaceae e Gigasporaceae, suportadas por 100% das árvores. Essas famílias agruparam-se com topologia praticamente idêntica àquela observada nas análises de MP da matriz 1 (Fig. 1).

Glomeraceae B foi suportado por 80%, apresentou dois ramos, um formado por *G. etunicatum* e outro possuindo espécies de *Glomus* e outros gêneros. É importante salientar que esse último clado foi formado pelas mesmas espécies observadas em Gl B nas análises de MP da matriz 1 (Fig. 1).

Nas análises de NJ (Fig. 4) a topologia da árvore foi muito similar àquela observada na árvore gerada por NJ a partir da matriz 1 (Fig. 2). As relações observadas para Paraglomerales, Diversisporales e o posicionamento de *G. etunicatum* foram praticamente idênticos às observadas na figura 2.

Maiores diferenças foram encontradas em Glomerales, sobretudo com relação à posição de *G. clarum*, *G. diaphanum*, *G. intraradices* e *G. manihotis*. Nas análises de NJ da

matriz 1 esses fungos posicionam-se no clado Gl B (Fig. 2), e nas análises de NJ da matriz 2 em Gl A (Fig. 4).

Análise do conjunto de caracteres II

A avaliação filogenética de MP das 83 espécies (incluindo dois sinanórfos) a partir de novos critérios originou uma árvore (Fig. 5) diferente daquela de Morton (1990). Foram observados quatro grupos distintos. O primeiro, compondo Paraglomerales, foi representado pelas espécies que atualmente compõem o grupo (*P. brasilianum* e *P. occultum*) e suportado por 97% das árvores. Glomerales foi suportado por 79% das árvores e apresentou 31 espécies de *Glomus* (*sensu* Morton). Esse clado se dividiu em dois ramos, um contendo apenas *G. tortuosum* e o outro, suportado por 100% das árvores obtidas, foi subdividido em dois cladogramas (Gl A e Gl B) agrupando o restante das espécies. Um outro grupo (denominado de G1) foi formado apenas por *G. eburneum*, *G. spurcum*, *G. viscosum* e os morfotipos glomóides de *A. leptoticha* e *A. gerdemannii* e apresentou 88% de suporte.

Os morfotipos acaulosporóides de Archaeosporales junto com *A. myriocarpa*, *E. infrequens* e *E. schenkii*, se posicionaram basalmente aos cladogramas que compõem Acaulosporaceae e Gigasporaceae. A primeira família foi suportada por 99% das árvores, com dois ramos principais; em um deles *A. colossica* emerge isoladamente, enquanto o outro comporta o restante das espécies da família. Gigasporaceae foi suportada pelo total de árvores geradas; entretanto, não houve definição de *Scutellospora* como grupo monofilético, enquanto todas as espécies de *Gigaspora* agruparam-se em um mesmo clado.

Na análise de NJ uma configuração diferente foi observada. *Paraglomus brasilianum* e *P. occultum* (Paraglomerales) formaram um grupo basal em Glomeromycota, seguido por *A. myriocarpa* e os morfotipos acaulosporóides de *A. leptoticha* e *A. gerdemannii* (Archaeosporales). Outro grupo (G1) foi composto por *G. eburneum*, *G. spurcum*, *G. tortuosum*, *G. viscosum* e os morfotipos glomóides de *A. leptoticha* e *A. gerdemannii*. Quanto

à composição de espécies, com exceção de *G. tortuosum*, esse clado é idêntico ao G1 observado nas análises de MP para o conjunto de caracteres II.

Archaeospora trappei e *E. schenkii* emergiram em um clado separado, relacionado com Acaulosporaceae e Gigasporaceae (Diversisporales). Em Acaulosporaceae dois ramos foram formados como visto nas análises de MP da matriz 3 (Fig. 5), e em Gigasporaceae uma clara definição dos gêneros foi observada, com *Gigaspora* e *Scutellospora* agrupando-se separadamente.

Glomerales apresentou dois ramos, um deles apenas com espécies de *Glomus*, que foi subdividido em G1 A e G1 B, e outro com espécies desse gênero e *E. infrequens* (G1 C).

Discussão

Critérios evolutivos e polarização

Algumas modificações nos critérios apresentados por Morton (1990) foram consideradas para a análise e elaboração do conjunto de caracteres II. De acordo com os novos padrões, determinados em trabalhos recentes (Morton e Redecker 2001; Schüßler et al. 2001), alguns caracteres teriam sido polarizados de maneira confusa por Morton (1990). Um exemplo disso seria o estado de baixa intensidade de coloração ao azul de Trypan, apresentado por esse autor como sendo apomórfico, porém atualmente considerado plesiomórfico (Morton e Redecker 2001) devido à presença do mesmo em espécies de grupos basais nas árvores filogenéticas geradas a partir de seqüências nucleotídicas. A presença de células auxiliares (caráter 3, Tab. 2) foi considerada por Morton (1990) dentro de uma série evolutiva que envolvia a presença de arbúsculos e vesículas (apenas arbúsculos → arbúsculos e vesículas → arbúsculos e células auxiliares). Entretanto, considerando que as células auxiliares não são estruturas homólogas às vesículas, a sua presença ou ausência foi colocada aqui como um caráter à parte e a polarização para ornamentação foi invertida.

Ainda acerca das estruturas somáticas desses fungos, um novo caráter foi incluso na avaliação da filogênese do grupo. As hifas intraradiculares podem apresentar superfície lisa ou com projeções ou rugosidades; esse último estado é observado apenas em Gigasporaceae e está sendo considerado como apomórfico dado que, de acordo com dados moleculares, o grupo emergiu tardiamente, em relação a outros grupos, no processo evolutivo em Glomeromycota (Simon et al., 1993). Além disso, estruturas vegetativas semelhantes às encontradas nas atuais espécies de Gigasporaceae foram relatadas pela primeira vez em fósseis do Triássico (Phipps e Taylor 1996), enquanto aquelas relativas a outros grupos em Glomeromycota foram registradas muito antes disso, no Devoniano (Taylor et al. 1995).

As camadas de parede (*sensu* Morton), em Glomeromycota, são de fundamental importância na distinção entre espécies e foram usadas como caráter de destaque na filogênese do grupo. Trabalhos detalhados acerca da ontogênese do esporo (Bentivenga e Morton 1995; Morton 1995; Franke e Morton 1994; Sturmer e Morton 1997; Sturmer e Morton 1999) indicam que em Gigasporaceae e Acaulosporaceae as camadas que constituem a “parede estrutural” (= “spore wall” *sensu* Morton) do esporo seguem um padrão evolutivo mais ou menos comum a todas as espécies dentro das respectivas famílias, com pequenas exceções (*A. myriocarpa*, *E. infrequens* e *E. schenkii*). Em Archaeosporaceae e sobretudo em Glomeraceae, essas camadas apresentam padrões muito diferenciados, o que poderia indicar a natureza polifilética dessa família ou mesmo a falta de elementos (espécies ainda não identificadas) que possam contribuir para organizar um modelo evolutivo, especificamente para esta estrutura. De acordo com Morton et al. (1995), apenas em *Glomus* o número potencial de espécies pode chegar a mais de 2000. Stürmer e Morton (1997) citam que camadas de parede evanescentes (*sensu* Morton) apresentam diferentes origens evolutivas em algumas espécies de Glomeraceae; assim não é possível considerar esse caráter como homólogo a todas as espécies da família. Entretanto, neste trabalho a maior parte dos critérios

atribuídos por Morton (1990) acerca das camadas da “parede estrutural” do esporo foi mantida, tendo em vista a complexidade em gerar novos critérios satisfatórios.

Considerando os caracteres 14 e 16 (Tab. 2) (“parede encerrando parede estrutural, não contínua com a hifa” e “parede evanescente originada da parede de uma hifa”, respectivamente), convém mencionar que nas espécies de Glomeromycota (com exceção de algumas Archaeosporaceae) a “parede evanescente” (*sensu* Walker) é contínua com a hifa. Considerando que a “parede evanescente” dos caracteres 14 e 16, na matriz de Morton (1990), está presente apenas em espécies de Glomeraceae ou Acaulosporaceae, respectivamente, a correta descrição para os caracteres deveria ser: “parede evanescente originada da parede de uma hifa de sustentação com várias camadas” para Glomeraceae (caráter 17, Tab. 5) e “parede evanescente originada de parede de uma hifa com apenas uma camada” para Acaulosporaceae (caráter 19, Tab. 5). A partir dessas considerações, outro caráter foi gerado para as espécies de Archaeosporaceae que não se enquadram nessas colocações (caráter 15, Tab. 5).

Para o caráter 14, Morton (1990) colocou uma série evolutiva, partindo de “parede” evanescente até flexível. Esses tipos de “parede” (*sensu* Walker) não parecem ter origem evolutiva comum. Desse modo, as camadas evanescentes (*sensu* Morton) relativas a esse caráter foram consideradas separadamente das unitárias e flexíveis (caracteres 16 e 17, Tab. 5). Em Acaulosporaceae, pelo menos dois tipos distintos de camada evanescente podem ser observados: um que permanece por mais e outro por menos tempo durante a formação e maturação do esporo. Essas camadas (denominadas de paredes) foram consideradas por Morton (1990) como ausentes ou presentes; entretanto, aqui foram tratadas numa série evolutiva (ausente → caindo cedo, durante a maturação do esporo → permanecendo por mais tempo em esporos maduros), dependendo do tipo de camada (caráter 19, Tab. 5).

Com relação às “paredes germinativas” (sensu Morton), é possível encontrar uma configuração muito semelhante entre espécies de Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Morton (1990) considerou que essas “paredes internas membranosas” não seriam homólogas, mas análogas; assim as famílias não teriam muita proximidade, com Gigasporaceae e Acaulosporaceae consideradas, inclusive, em diferentes subordens. *Gigaspora* teria posição basal em relação à *Scutellospora*, indicando evolução independente das “paredes germinativas” em membros desse gênero. Várias considerações atuais são opostas a essa colocação. De acordo com dados moleculares, *Scutellospora* ocuparia posição basal em relação à *Gigaspora* (Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000b). A partir dessa proposição, é sugerido que a formação de uma camada germinativa (na “parede estrutural” do esporo) em *Gigaspora*, é caráter apomórfico em relação à presença de placas germinativas em *Scutellospora*. Em 1990 também não se tinha conhecimento sobre o “orb” em Acaulosporaceae, estrutura semelhante à placa germinativa encontrada apenas em *Scutellospora*. Recentemente foi descoberta uma espécie em Gigasporaceae (*S. projecturata*) que apresenta não uma típica placa, mas uma estrutura em espiral muito semelhante ao “orb”, tal como visto também em outras espécies do grupo, ainda não descritas (Kramadibrata et al. 2000). Esse talvez seja o elo morfológico que faltava para a indicação de proximidade entre as duas famílias. O padrão de desenvolvimento do esporo em Acaulosporaceae é similar ao encontrado em Gigasporaceae (*Scutellospora*) (Sturmer e Morton 1999). Entretanto, os autores sublinham que “paredes germinativas” não são estruturas homólogas às famílias. A formação do esporo a partir de um sáculo esporífero (Acaulosporaceae) e célula esporogênica bulbosa (Gigasporaceae), presença de uma camada evanescente e uma fina camada, interna à camada laminada na “parede estrutural do esporo”, e a camada “beaded” na “parede germinativa” apenas em Acaulosporaceae são os argumentos usados para que essas estruturas sejam análogas. Porém *S. biornata* e *S. crenulata* (Herrera-Peraza et al. 2001) apresentam

uma camada “beaded” e foi observada uma fina camada, interna à camada laminada em *S. cerradensis*, *S. heterogama*, *S. pellucida* e *S. rubra* (Morton 2003 <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>). Além disso, a partir de análises de “relógio molecular”, Simon et al. (1993) indicaram que as famílias Acaulosporaceae e Gigasporaceae emergiram mais tarde durante a evolução de Glomeromycota e divergiram uma da outra no fim do paleozóico (250mi de anos atrás). A proximidade entre as famílias (únicas que apresentam “paredes germinativas”), indicadas tanto a partir de dados moleculares (Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000b; Schwarzott et al. 2001) quanto morfológicos (Simon et al. 1993) e as demais evidências discutidas, sugerem que as “paredes germinativas” em Acaulosporaceae e Gigasporaceae são estruturas homólogas. Além disso, elas se encaixam perfeitamente nos critérios utilizados para determinação de homologia: são morfológicamente semelhantes, ocupam aproximadamente a mesma posição e apresentam os mesmos estádios de formação numa série ontogenética.

O caráter de germinação dos esporos também foi modificado. Antes se considerava apenas a germinação em Gigasporaceae, sendo agora esse caráter colocado como uma série evolutiva abrangendo todo o grupo (caráter 26, Tab. 5). A seqüência de estados dentro da série foi definida com base no padrão de desenvolvimento do esporo, em registro fóssil, na homologia estrutural e no atual padrão filogenético do grupo, definido a partir de dados moleculares. Assim teríamos: tubos germinativos originados a partir da parede do esporo ou do lúmen da hifa de sustentação sem estruturas especializadas na germinação → tubos germinativos originados de um “orb” → tubos germinativos originados de uma placa germinativa → tubos germinativos originados da camada de parede papilada (germinativa). Os primeiros registros fósseis indicam a presença apenas de espécies semelhantes a *Glomus*; portanto foi assumido que a estratégia de germinação deste grupo seria o estado plesiomórfico. Além disso, dados moleculares posicionam outros grupos que apresentam esse

tipo de germinação em ramos basais nas árvores. A presença de “orb” aparece como estado plesiomórfico em relação à presença de placa germinativa. De acordo com os atuais dados de filogênese de Glomeromycota (e isso parece ser um consenso) Archaeosporaceae emergiu antes de Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Como os esporos das espécies de Acaulosporaceae desenvolvem-se de maneira semelhante aos morfotipos acaulosporóides em Archaeosporaceae e considerando que “orb” e placa germinativa são estruturas homólogas, possivelmente o “orb” surgiu antes da placa, no processo evolutivo do grupo. A partir dessas colocações é possível indicar a presença de camada germinativa papilada como caráter apomórfico na série.

Alguns caracteres considerados por Morton (1990) foram eliminados. A presença de ornamentações no esporo (caracteres 13 e 18 Tab. 2) não deve ser usada como caráter em filogênese, pois pode ocorrer mais de uma vez no processo evolutivo, independente da formação de grupos; assim, qualquer sinapomorfia considerada pode estar agrupando clados polifiléticos. Dando suporte a essa afirmação o índice de consistência e retenção foram baixos para os caracteres 13 e 18 (Tab. 2), os únicos considerando a presença ou não de ornamentação (IC= 0,250 e 0,333; IR= 0,400 e 0 respectivamente). O caráter 19 (Tab. 2) diz respeito ao número de “paredes semi-rígidas internas” e a matriz 1 (Tab. 3) indica a presença desse caráter apenas em espécies de Acaulosporaceae. Essas “paredes” equivalem a camadas flexíveis encontradas nas “paredes germinativas” de certas espécies; assim, parece não haver muito sentido a adoção desse caráter. Por apresentar IR= 0 nas análises, o caráter 23 (Tab. 2) também foi eliminado. O caráter 26 (Tab.2) foi excluído porque nenhuma das espécies aqui estudadas apresenta parede amorfa ligada a uma “parede coriácea”.

Apesar das modificações, muitas das considerações evolutivas de Morton (1990) foram mantidas e os dados usados para gerar árvores são baseados em seu trabalho. Vale salientar o pioneirismo do autor na elaboração de um elegante modelo evolutivo (baseado na

morfologia) para Glomeromycota. Passados mais de 10 anos, faz-se necessário o estabelecimento de novos padrões evolutivos (principalmente para as camadas de parede), sobretudo em Glomeraceae. Porém, devido à complexidade do tema ainda não é possível fazer todas as considerações necessárias.

Conjunto de caracteres I: comparação de árvores geradas (matrizes 1 e 2)

As árvores geradas por MP apresentaram diferentes topologias, de acordo com a matriz utilizada. Assim, Paraglomerales emerge separadamente de todos os outros clados em Glomeromycota, enquanto Glomeraceae apresenta-se em apenas um grupo, conforme a árvore gerada a partir da matriz 1 (Fig. 1). Porém, na árvore gerada pela matriz 2, Paraglomerales posiciona-se no mesmo clado que Gigasporaceae e Acaulosporaceae, apesar de apresentar baixo valor de suporte (52%) e Glomeraceae encontra-se dividido em dois grupos (Fig. 3). Por outro lado, as análises de NJ das matrizes 1 e 2 não evidenciaram grandes mudanças na topologia das árvores, embora diferenças na posição do grupo composto por *G. clarum*, *G. diaphanum*, *G. intraradices* e *G. manihotis* (Figs. 2 e 4) tenham sido observadas. Morton (1990) apresentou uma matriz de dados onde caracteres não comparáveis em determinadas espécies foram considerados como estados plesiomórficos; entretanto, é necessário indicar na matriz os casos dos táxons onde tal configuração aparece (Amorim 2002), para que esses caracteres não tenham efeito nas análises. Aqui fica demonstrado que diferenças topológicas podem ser observadas nas árvores, de acordo com as considerações acerca da plesiomorfia em caracteres não comparáveis em determinados táxons.

Aspectos filogenéticos em Glomeromycota

Os resultados obtidos parecem suportar as atuais indicações, a partir de dados moleculares (Schüßler et al. 2001; Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000b) e morfológicos (Simon et al. 1993), da proximidade entre Acaulosporaceae e Gigasporaceae, contrariando observações

anteriores que indicavam maior proximidade entre Acaulosporaceae e Glomeraceae (Morton 1990).

A aproximação entre Acaulosporaceae e Gigasporaceae, antes não tão óbvia do ponto de vista morfológico, aparentemente pode ser clarificada com a descoberta de *S. projecturata*, que possui uma placa germinativa diferenciada, muito semelhante ao “orb” encontrado em espécies de Acaulosporaceae (Kramadibrata et al. 2000). Os autores inferiram, a partir de dados moleculares, que esta espécie estaria mais próxima de *Gigaspora* do que de *Scutellospora*, e que posteriormente, quando mais dados estivessem disponíveis, este último gênero poderia apresentar diferentes clados.

Em Gigasporaceae, a sugestão de que *Scutellospora* seria um grupo basal em relação a *Gigaspora* (Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000b) indicaria perda de caracteres durante os estádios evolutivos. Os dados referentes às análises de MP, a partir do conjunto de caracteres II, tem suportado essa indicação; porém, se assim fosse, *Scutellospora* teria formado diferentes grupos. As análises de NJ dos dois conjuntos de caracteres indicaram, entretanto, que *Gigaspora* e *Scutellospora* evoluíram separadamente no mesmo grupo e as análises de MP do conjunto de caracteres I mostraram que as espécies de *Gigaspora* não se agruparam. Usando seqüências do SSU rDNA Schwarzott et al. (2001) não obtiveram relação clara de qual dos gêneros seria mais basal; é possível que outras considerações devam ser incorporadas às análises no sentido de estabelecer, com confiança, as relações dentro da família.

As relações entre os gêneros em Acaulosporaceae não parecem estar claras. Em nenhuma das árvores geradas neste trabalho *Entrophospora* forma um grupo à parte; algumas espécies (*E. infrequens* e *E. schenkii*) emergem a partir de ramos basais em relação à família (Fig. 5). Por outro lado, *E. infrequens* agrupa-se com espécies de *Glomus* em outra árvore (Fig. 6). Os dados moleculares parecem ser insuficientes para conclusões definitivas; porém, de acordo com Rodriguez et al. (2001), *E. infrequens* apresenta seqüências de LSU rDNA que

agrupam-se tanto em Gigasporaceae quanto em Glomeraceae. É importante observar que *E. infrequens* e *E. schenkii* não apresentam estrutura de “paredes germinativas”, sendo essa última espécie muito similar a *A. trapei*. Essas indicações reforçam observações morfológicas considerando que as características usadas para separação dos gêneros em Acaulosporaceae não parecem ser suficientes para suportar a existência de *Entrophospora* (Morton 2003 http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/Acaulosporaceae/Acaul_En.htm). Além disso, o autor também sugere que as espécies citadas acima são possíveis representantes de Archaeosporaceae. Embora *E. colombiana* e *E. kentinensis* sejam características para o gênero, apenas com estudos moleculares mais detalhados será possível determinar se *Entrophospora* é ou não um grupo válido.

Em todas as árvores geradas observa-se a proximidade de *A. myriocarpa* com *A. leptoticha*. Essas espécies só não estão no mesmo clado na árvore da figura 5, entretanto, ainda assim estão próximas. Morton (2003 <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/Acaulosporaceae/Acaulospora/myriocarpa/myriocarpa.htm>) indica que *A. myriocarpa* possivelmente pertence a Archaeosporaceae, porém dados moleculares seriam necessários para essa confirmação. Em vista da atual indisponibilidade de *A. myriocarpa* em bancos de inóculo, a análise de rDNA da espécie fica prejudicada. Entretanto, diante da sua posição nas árvores geradas a partir dos dados morfológicos, sugere-se que a mesma seja transferida para a família Archaeosporaceae.

Os dados dão suporte à divisão de Glomeraceae, sugerida em trabalhos anteriores (Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000b; Schwarzott et al. 2001), bem como à inclusão dos representantes de *Sclerocystis* em *Glomus* (Redecker et al. 2000a). *Paraglomus occultum* e *G. tortuosum* agruparam-se separadamente em um mesmo clado nas árvores das Figs. 1 a 4, porém nas árvores das Figs. 5 e 6, *P. brasilianum* agrupa-se com *P. occultum*, enquanto *G. tortuosum* ocupa outra posição. Embora com posição incerta, *G. tortuosum* tem ocupado

posições isoladas ou basais, ao menos em relação a Glomeraceae. Dados moleculares são necessários para uma definição mais clara da posição desse táxon.

As relações filogenéticas entre espécies, nos diferentes grupos de *Glomus*, mostraram algumas congruências com os resultados apresentados por Schwarzott et al. (2001). Assim, *G. mosseae*, *G. coronatum* e *G. caledonium* agruparam-se no mesmo clado (Fig. 5 e 6), enquanto outras espécies (*G. geosporum* e *G. verruculosum*) que estariam compondo esse grupo encontram-se em clados diferentes. *Glomus intraradices*, *G. manihotis* e *G. clarum* também estão próximos aqui, assim como *G. claroideum*, *G. etunicatum*, *G. lamellosum* e *G. luteum* fazem parte do mesmo grupo nas análises de NJ (Fig. 6). Em Schwarzott et al. (2001) *A. leptoticha*, *A. trappei* e *Geosiphon pyriformis* formam um clado basal separado de todo o resto do filo, enquanto *G. spurcum*, *G. versiforme* e um espécime de *G. etunicatum* formam um grupo mais próximo a Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Aqui *A. leptoticha* (morfotipo acaulosporóide) formou um clado basal a quase todo o filo com *A. myriocarpa* e *A. gerdemannii* (morfotipo acaulosporóide) apenas na árvore da figura 6. *Glomus versiforme* foi sempre agrupado em clados contendo outras espécies de *Glomus* e *G. spurcum* formou um clado separado com *G. eburneum*, *G. viscosum*, *A. leptoticha* (morfotipo glomóide), *A. gerdemannii* (morfotipo glomóide) (Fig. 5) e *G. tortuosum* (Fig. 6).

Ainda são escassos os dados moleculares disponíveis para espécies em Acaulosporaceae e Gigasporaceae. A maioria dos trabalhos tem abordado as relações em Glomeraceae e, conseqüentemente, são poucos os representantes de outros grupos nas árvores geradas.

O baixo número de caracteres usados nas análises morfológicas não permite o esclarecimento de todas as relações dos grupos em Glomeromycota. Além disso, espécies dimórficas também apresentam problemas quando comparadas. Os eventos na formação dos esporos de Acaulosporaceae e Archaeosporaceae são semelhantes e tendem a posicionar as

espécies desse último grupo em ramos mais recentes na formação do filo. Devido a esses e outros problemas apresentados na classificação morfológica, dados moleculares são necessários para a avaliação filogenética do filo. Entretanto, a disponibilidade de espécies desse grupo em bancos de inóculo limita, no momento, melhor avaliação molecular. Assim, dados morfológicos podem ser usados para, ao menos, sugerir quais espécies, ou grupos, devem ter suas relações reavaliadas. Vale salientar que este trabalho apresenta o maior número de espécies já analisadas filogeneticamente em Glomeromycota. O objetivo não foi mudar atuais considerações, mas indicar novos caminhos e confirmar conceitos estabelecidos, considerando que a ferramenta molecular se tornou imprescindível na resolução filogenética do grupo. As indicações aqui colocadas devem ser comprovadas em estudos moleculares, a fim de tornar claros os laços filogenéticos, sobretudo em Acaulosporaceae e Glomeraceae.

Referências

- Amorim DS (2002) Fundamentos de Sistemática Filogenética. Holos, Ribeirão Preto
- Bentivenga SP, Morton JB (1995) A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 719-731
- Francis R, Read DJ (1995) Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Can J Bot* 73 (Supp.1): S 1301- S 1309
- Franke M, Morton JB (1994) Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. *Can J Bot* 72: 122-134
- Herrera-Peraza RA, Cuenca G, Walker C (2001) *Scutellospora crenulata*, a new species of Glomales from La Gran Sabana, Venezuela. *Can J Bot* 79: 674-678.
- Kramadibrata K, Walker C, Schwarzott D, Schüßler A (2000) A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann Bot* 86: 21-27

- Morton JB (1990). Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207
- Morton JB, Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491
- Morton JB, Bentivenga SP, Bever JD (1995) Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Bot* 73 (Suppl. 1): 25-32
- Morton JB (1995) Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87:127–137
- Morton JB, Redecker D (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195
- Phipps J, Taylor TN (1996) Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* 88: 707-714.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000a) Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92: 282-285
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000b) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276–284
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000c) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921

- Redecker D (2002) New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Res Microbiol* 153: 125–130
- Remy W, Taylor T N, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 11841–11843
- Rodriguez A, Dougall T, Dodd JC, Clapp JP (2001) The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytol* 152:159–167
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is non-monophyletic. *Mol Phylogenet Evol* 21: 190-197
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. 2° ed. Academic Press, London
- Stürmer SL, Morton JB (1997) Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 89: 72-81
- Stürmer SL, Morton JB (1999) Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 91: 849-857
- Swofford DL (1998) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony *(and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from early Devonian. *Mycologia* 87: 560-563
- Walker C (1992) Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*) - a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897

Tabela 1. Táxons usados nas análises filogenéticas de Glomeromycota.

Espécie	Matriz 1 e 2	Matriz 3
<i>Acaulospora birreticulata</i> Rothwell & Trappe		X
<i>A. colossica</i> Schultz, Bever & Morton		X
<i>A. delicata</i> Walker, Pfeiffer & Bloss	X	X
<i>A. denticulata</i> Sieverding & Toro	X	X
<i>A. dilatata</i> Morton	X	X
<i>A. elegans</i> Trappe & Gerdemann		X
<i>A. foveata</i> Trappe & Janos		X
<i>A. koskei</i> Blaszkowski		X
<i>A. lacunosa</i> Morton	X	X
<i>A. laevis</i> Gerdemann & Trappe	X	X
<i>A. longula</i> Spain & Schenck	X	
<i>A. mellea</i> Spain & Schenck	X	X
<i>A. morrowiae</i> Spain & Schenck	X	X
<i>A. myriocarpa</i> Spain, Sieverding & Schenck	X	X
<i>A. rehmi</i> Sieverding & Toro	X	X
<i>A. rugosa</i> Morton	X	X
<i>A. scrobiculata</i> Trappe		X
<i>A. spinosa</i> Walker & Trappe	X	X
<i>A. tuberculata</i> Janos & Trappe		X
<i>Archaeospora gerdemannii</i> (sinanamorfo acaulosporóide) (Rose, Daniels & Trappe) Morton & Redecker		X
<i>A. gerdemannii</i> (sinanamorfo glomóide) (Rose, Daniels & Trappe) Morton & Redecker		X
<i>A. leptoticha</i> (sinanamorfo acaulosporóide) (Schenck & Smith) Morton & Redecker	X	X
<i>A. leptoticha</i> (sinanamorfo glomóide) (Schenck & Smith) Morton & Redecker	X	X
<i>A. trappei</i> (Ames & Linderman) Morton & Redecker		X
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Schenck	X	X
<i>E. infrequens</i> (Hall) Ames & Schneider	X	X
<i>E. kentinensis</i> Wu & Liu		X
<i>E. schenkii</i> Sieverding & Toro	X	X
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith	X	X
<i>G. ambisporum</i> Smith & Schenck	X	X
<i>G. arboreense</i> McGee	X	X
<i>G. caledonium</i> (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerd.		X
<i>G. cerebriforme</i> McGee	X	X
<i>G. claroideum</i> Schenck & Smith	X	X
<i>G. clarum</i> Nicol. & Schenck	X	X
<i>G. constrictum</i> Trappe		X
<i>G. coremioides</i> (Berk. & Broome) Redecker & Morton	X	X
<i>G. coronatum</i> Giovannetti		X
<i>G. deserticola</i> Trappe, Bloss & Menge	X	X
<i>G. diaphanum</i> Morton & Walker	X	X

Continuação da tabela 1.

Espécie	Matriz 1 e 2	Matriz 3
<i>G. dimorphicum</i> Boyetchko & Tewari	X	X
<i>G. eburneum</i> Kennedy, Stutz & Morton		X
<i>G. etunicatum</i> Becker & Gerdemann	X	X
<i>G. fasciculatum</i> (Thaxter) Gerd. & Trappe emend. Walker & Koske	X	X
<i>G. fecundisporum</i> = <i>Ar. leptoticha</i>	X	
<i>G. geosporum</i> (Nicol. & Gerd.) Walker		X
<i>G. glomerulatum</i> Sieverding	X	X
<i>G. heterosporum</i> Smith & Schenck	X	X
<i>G. intraradices</i> Schenck & Smith	X	X
<i>G. lamellosum</i> Dalpe, Koske & Tews		X
<i>G. luteum</i> Kennedy, Stutz & Morton		X
<i>G. macrocarpum</i> Tulasne & Tulasne	X	X
<i>G. maculosum</i> = <i>G. claroideum</i>	X	
<i>G. manihotis</i> Howeler, Sieverding & Schenck	X	X
<i>G. mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	X	X
<i>G. pallidum</i> Hall	X	X
<i>G. rubiforme</i> (Gerd. & Trappe) Almeida & Schenck	X	X
<i>G. spurcum</i> Pfeiffer, Walker & Bloss		X
<i>G. tenerum</i> Tandy emend. McGee	X	X
<i>G. tortuosum</i> Schenck & Smith	X	X
<i>G. verruculosum</i> Blaszkowski		X
<i>G. versiforme</i> (Karsten) Berch	X	X
<i>G. viscosum</i> Nicol.		X
<i>G. warcupii</i> McGee	X	X
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	X	X
<i>G. decipiens</i> Hall & Abbott	X	X
<i>G. gigantea</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	X	X
<i>G. margarita</i> Becker & Hall	X	X
<i>G. rosea</i> Nicol. & Schenck	X	X
<i>Paraglomus brasilianum</i> (Spain & Miranda) Morton & Redecker		X
<i>P. occultum</i> (Walker) Morton & Redecker	X	X
<i>Scutellospora biornata</i> Spain, Sieverding & Toro		X
<i>S. calospora</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	X	X
<i>S. cerradensis</i> Spain & Miranda		X
<i>S. coralloidea</i> (Trappe, Gerd. & Ho) Walker & Sanders	X	X
<i>S. dipapilosa</i> (Walker & Koske) Walker & Sanders	X	X
<i>S. dipurpurascens</i> Morton & Koske	X	X
<i>S. erythropha</i> (Koske & Walker) Walker & Sanders		X
<i>S. fulgida</i> Koske & Walker		X
<i>S. gregaria</i> (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders	X	X
<i>S. heterogama</i> (Nicol. & Gerdemann) Walker & Sanders	X	X
<i>S. pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	X	X
<i>S. persica</i> (Koske & Walker) Walker & Sanders		X
<i>S. rubra</i> Stürmer & Morton		X
<i>S. scutata</i> Walker & Diederichs		X
<i>S. verrucosa</i> (Koske & Walker) Walker & Sanders		X
<i>S. weresubiae</i> Koske & Walker	X	X

Tabela 2. Caracteres e estados evolutivos em Glomeromycota, considerando os critérios de Morton (1990)

Código	Caráter	Estado (plesiomórfico/apomórfico)
1	Simbiose mutualística em plantas	Ausente (0)/Presente (1)
2	Desenvolvimento arbuscular	Ausente (0)/Presente (1)
3	Talo fúngico	Apenas arbúsculos (0)/Arbúsculos e vesículas (1) Arbúsculos e células auxiliares (2)
4	Células auxiliares	Papiladas a espinhosas (0)/Lisas a rugosas (1)
5	Resposta à coloração com azul de Trypan	Azul (0)/Fraca ou sem reação (1)
6	Arranjo dos esporos	Isolados, raramente sobre ramos hifálicos (0)/Sobre ramos hifálicos em pequenos agregados (1)/Em densos agregados (2)/Em esporocarpos (3)
7	Arranjo dos esporos em esporocarpos	Aleatoriamente, em gleba (0)/Organizados ao redor de um plexo central (1)/Organizados ao redor de um plexo sobre um pedúnculo (2)
8	Perídio ao redor do esporo ou esporocarpo	Ausente (0)/Presente (1)
9	Modo de desenvolvimento do esporo	Terminal sobre uma hifa indiferenciada (0)/Lateral sobre o pescoço de um sáculo esporífero (1)/Terminal, sobre uma célula esporogênica (2)
10	Desenvolvimento do esporo a partir do pescoço do sáculo esporífero	Terminal sobre um ramo hifálico (0)/Terminal sobre um curto pedicelo (1)/Lateral crescendo fora do pescoço do sáculo (2)/Crescendo dentro do pescoço do sáculo (3)
11	Precusores do desenvolvimento do esporo	Ausente (0)/Vesículas intraradiculares (1)
12	Número de grupos de parede separáveis	Um (0)/Dois ou mais (1)
13	Superfície da parede estrutural	Lisa (0)/Discretas ornamentações (1)
14	Parede encerrando parede estrutural, não contínua com a hifa	Ausente (0)/Uma parede evanescente (1)/Duas paredes evanescentes (2)/Parede unitária (3)/Parede flexível fina (4)
15	Parede evanescente	Granular sem reação ao Melzer (0)/Mucilaginosa com reação ao Melzer (1)
16	Parede evanescente originalmente de uma hifa	Ausência (0)/Presença (1)
17	Parede unitária do esporo contínua com a parede do esporóforo	Ausência (0)/Presença (1)
18	Superfície da parede unitária externa	Lisa (0)/Discretas ornamentações (1)
19	Número de camadas de parede semi-rígidas internas	Ausente (0)/Uma (1)/Duas (2)
20	Número de camadas de parede membranosas internas	Ausente (0)/Uma (1)/Duas (2)/Três (3)
21	Superfície da parede membranosa interna	Lisa (0)/'Beaded' (1)
22	Reação da parede membranosa interna ao reagente de Melzer	Ausência (0)/Presença (1)
23	Número de camadas de parede interna flexível	Ausente (0)/Uma (1)
24	Número de paredes coriáceas internas	Ausente (0)/Uma (1)/Duas (2)
25	Parede amorfa ligada à parede membranosa "beaded"	Ausência (0)/Presença (1)
26	Parede amorfa ligada à parede coriácea interna	Ausência (0)/Presença (1)
27	Germinação dos esporos	Tubos germinativos originados das camadas de parede papiladas (0)/Tubos germinativos originados de placas germinativas (1)

Continuação da tabela 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>G. fasciculatum</i>	1	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. fecundisporum</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. glomerulatum</i>	1	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. heterosporum</i>	1	1	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. intraradices</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. macrocarpum</i>	1	1	1	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. maculosum</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. manihotis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. mosseae</i>	1	1	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. pallidum</i>	1	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. rubiforme</i>	1	1	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. tenerum</i>	1	1	1	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. tortuosum</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. versiforme</i>	1	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. warcupii</i>	1	1	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gigaspora albida</i>	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. decipiens</i>	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. gigantea</i>	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. margarita</i>	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. rosea</i>	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paraglomus occultum</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scutellospora calospora</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1
<i>S. coralloideal</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. dipapilosa</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. dipurpurascens</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>S. gregaria</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. heterogama</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. pellucida</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	1	1
<i>S. weresubiae</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0	0	1

(M.A.) morfotipo acaulosporóide; (M.G.) morfotipo glomóide

Tabela 4. Matriz de espécies de Glomeromycota e seus estados evolutivos, considerando os critérios de Morton (1990). Caracteres ausentes (indicados por “?”) sem valor nas análises computacionais

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Outgroup	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora delicata</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	?	1	2	1	1	0	0	0	0	?
<i>A. denticulata</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	?	1	2	1	1	0	0	0	0	?
<i>A. dilatata</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	?	2	1	1	0	0	0	1	0	?
<i>A. lacunosa</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	?	2	1	1	0	0	0	1	0	?
<i>A. laevis</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	?	1	2	1	0	0	0	0	0	?
<i>A. longula</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	?	1	2	1	1	0	0	0	0	?
<i>A. mellea</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	?	1	2	1	0	0	0	0	0	?
<i>A. morrowiae</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	4	0	1	0	?	1	1	1	0	0	0	1	0	?
<i>A. myriocarpa</i>	1	1	1	?	1	1	?	0	1	1	0	0	0	3	?	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>A. rehmi</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	?	1	2	1	1	0	0	0	0	?
<i>A. rugosa</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	0	4	?	1	0	?	1	1	1	0	0	0	1	0	?
<i>A. spinosa</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	?	1	2	1	1	0	0	0	0	?
<i>Archaeospora leptoticha</i> (M.A.)	1	1	1	?	0	0	?	0	1	0	0	0	1	3	?	0	0	?	0	0	?	?	1	0	0	0	?
<i>A. leptoticha</i> (M.G.)	1	1	1	?	1	1	?	0	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>Entrophospora colombiana</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	3	0	1	0	0	0	1	0	?	2	1	1	0	0	0	1	0	?
<i>E. infrequens</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	1	3	0	0	1	0	0	1	0	?	2	0	?	?	1	0	0	0	?
<i>E. schenkii</i>	1	1	1	?	1	0	?	0	1	3	0	1	0	0	0	1	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>Glomus aggregatum</i>	1	1	1	?	0	2	?	0	0	?	1	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. ambisporum</i>	1	1	1	?	0	3	1	0	0	?	0	0	0	2	0	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. arborese</i>	1	1	1	?	0	2	?	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. cerebriforme</i>	1	1	1	?	0	3	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. claroideum</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	0	?	0	0	0	2	0	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. clarum</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	1	0	0	1	1	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. coremioides</i>	1	1	1	?	0	3	2	1	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. deserticola</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. diaphanum</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	1	0	0	1	0	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. dimorphicum</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	0	0	0	2	0	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. etunicatum</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	0	?	0	0	0	1	0	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?

Continuação da tabela 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>G. fasciculatum</i>	1	1	1	?	0	2	?	0	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. fecundisporum</i>	1	1	1	?	1	1	?	0	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. glomerulatum</i>	1	1	1	?	0	3	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. heterosporum</i>	1	1	1	?	0	3	1	0	0	?	0	0	0	1	0	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. intraradices</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	1	0	0	2	1	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. macrocarpum</i>	1	1	1	?	0	3	0	1	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. maculosum</i>	1	1	1	?	0	0	?	0	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>G. manihotis</i>	1	1	1	?	0	1	?	0	0	?	1	0	0	1	1	0	0	?	0	0	?	0	0	0	0	0	?
<i>G. mosseae</i>	1	1	1	?	0	2	?	1	0	?	0	0	0	1	1	0	0	?	0	0	?	0	0	0	0	0	?
<i>G. pallidum</i>	1	1	1	?	0	3	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	0	0	0	0	0	?
<i>G. rubiforme</i>	1	1	1	?	0	3	1	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. tenerum</i>	1	1	1	?	0	3	0	1	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. tortuosum</i>	1	1	1	?	1	0	?	1	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. versiforme</i>	1	1	1	?	0	2	?	0	0	?	0	0	0	3	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>G. warcupii</i>	1	1	1	?	0	2	?	1	0	?	0	0	0	1	1	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>Gigaspora albida</i>	1	1	2	0	0	0	?	0	2	?	0	0	0	0	?	0	1	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0
<i>G. decipiens</i>	1	1	2	0	0	0	?	0	2	?	0	0	0	0	?	0	1	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0
<i>G. gigantea</i>	1	1	2	0	0	0	?	0	2	?	0	0	0	0	?	0	1	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0
<i>G. margarita</i>	1	1	2	0	0	0	?	0	2	?	0	0	0	0	?	0	1	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0
<i>G. rosea</i>	1	1	2	0	0	0	?	0	2	?	0	0	0	0	?	0	1	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0
<i>Paraglomus occultum</i>	1	1	1	?	1	0	?	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	?
<i>Scutellospora callospora</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1
<i>S. coraloideal</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. dipapilosa</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. dipurpurascens</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>S. gregaria</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. heterogama</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. pellucida</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	1	1
<i>S. weresubiae</i>	1	1	2	1	0	0	?	0	2	?	0	1	0	0	?	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0	0	1

(M.A.) morfotipo acaulosporóide; (M.G.) morfotipo glomóide

Tabela 5. Caracteres e estados evolutivos em Glomeromycota, considerando modificações dos critérios de Morton (1990) e novas considerações evolutivas para o filo; *caracteres com modificações na polarização ou novas considerações evolutivas em relação aos dados de Morton (1990)

Caráter	Caráter	Estado (plesiomórfico/apomórfico)
1	Simbiose mutualística em plantas	Ausente (0)/Presente (1)
2	Desenvolvimento arbuscular	Ausente (0)/Presente (1)
3*	Vesículas	Ausente (0)/Presente (1)
4*	Células auxiliares	Ausente (0)/Presente (1)
5*	Superfície das células auxiliares	Lisas a rugosas (0)/Papiladas a espinhosas (1)
6*	Superfície das hifas intrarradiculares	Lisas (0)/Rugosas ou apresentando projeções (1)
7*	Resposta à coloração com azul de Trypan	Fraca reação (0)/Azul escuro (1)
8	Arranjo dos esporos	Isolados, raramente sobre ramos hifálicos (0)/Sobre ramos hifálicos em pequenos agregados (1)/Em densos agregados (2)/Em esporocarpos (3)
9	Arranjo dos esporos em esporocarpos	Aleatoriamente em 'glebal' hifas (0)/Organizados ao redor de um plexo central (1)/De um plexo sobre um 'stalk' (2)
10	Perídio ao redor do esporo ou esporocarpo	Ausente (0)/Presente (1)
11	Modo de desenvolvimento do esporo	Terminal sobre uma hifa indiferenciada (0)/Lateral sobre o pescoço de um sáculo esporífero (1)/Terminal sobre uma célula esporogênica (2)
12	Desenvolvimento do esporo a partir do pescoço do sáculo esporífero	Terminal sobre um curto pedicelo (0) lateral crescendo fora do pescoço do sáculo (1) dentro do pescoço do sáculo (2)
13	Precursores do desenvolvimento do esporo	Ausente (0)/Vesículas intrarradiculares (1)
14	Número de grupos de parede separáveis	Um (0)/Dois ou mais (1)
15*	Parede evanescente não contínua com a parede da hifa	Ausência (0)/Presença (1)
16*	Parede estrutural com camada superficial unitária ou flexível originalmente uma hifa de sustentação com várias camadas de parede	Ausência (0)/Presença (1)
17*	Parede evanescente originalmente de uma hifa de sustentação com várias camadas de parede	Ausente (0)/ Uma parede evanescente (1)/ Duas paredes evanescentes (2)
18	Parede evanescente	Sem reação ao Melzer (0)/ Com reação ao Melzer (1)
19*	Parede evanescente originalmente de hifa com apenas uma camada de parede	Ausente (0)/Caindo na maturação do esporo (1) Permacendo por mais tempo em esporos maduros (2)
20	Parede estrutural do esporo contínua com a parede do esporóforo	Ausência (0)/Presença (1)
21*	Nº de "paredes germinativas"	Ausente (0)/Uma (1)/Duas (2)/Três (3)
22	Superfície da "parede germinativa"	Lisa (0)/'Beaded' (1)
23	Reação da "parede germinativa" ao reagente de Melzer	Ausência (0)/Presença (1)
24	Camadas de paredes coriáceas internas	Ausente (0)/Presente (1)
25	Camada amorfa	Ausente (0)/Presente (1)
26*	Germinação dos esporos	Tubos germinativos originados a partir da parede do esporo ou do lúmen da hifa de sustentação sem estruturas especializadas na germinação (0)/Tubos germinativos originados de um "orb" (1)/Tubos germinativos originados de uma placa germinativa (2)/Tubos germinativos originados das camadas de parede papiladas (3)

Tabela 6. Matriz de espécies de Glomeromycota e seus estados evolutivos, considerando novos critérios. Caracteres ausentes (indicados por “?”) sem valor nas análises computacionais

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Outgroup	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora birreticulata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. colossica</i>	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. delicata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. denticulata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. dilatata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	1
<i>A. elegans</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. foveata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	1	0	1
<i>A. koskei</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. lacunosa</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	1
<i>A. laevis</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1
<i>A. mellea</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	0	1
<i>A. morrowiae</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	1	1
<i>A. myriocarpa</i>	1	1	0	0	?	0	0	1	?	0	1	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	0	0	0	0
<i>A. rehmi</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. rugosa</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	1	1
<i>A. scrobiculata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. spinosa</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1
<i>A. tuberculata</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	1	0	1
<i>Archaeospora leptoticha</i> (M.A.)	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	1
<i>A. leptoticha</i> (M.G.)	1	1	0	0	?	0	0	1	?	0	0	?	0	0	0	1	3	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>A. gerdemannii</i> (M.A.)	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>A. gerdemannii</i> (M.G.)	1	1	0	0	?	0	0	1	?	0	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>A. trappei</i>	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	?	?	0	0	0
<i>Entrophospora colombiana</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	1
<i>E. infrequens</i>	1	1	1	0	?	0	0	0	?	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>E. kentinensis</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	1
<i>E. schenkii</i>	1	1	1	0	?	0	0	0	?	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	?	?	0	0	0
<i>Glomus aggregatum</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	0	0	?	1	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0

Continuação da tabela 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<i>G. ambisporum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	1	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0	
<i>G. arborenses</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0	
<i>G. caledonium</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	1	0	?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. cerebriforme</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0	
<i>G. claroideum</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	0	?	0	0	0	0	2	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. clarum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. constrictum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. coremioides</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	2	1	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. coronatum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	1	0	?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. deserticola</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. diaphanum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. dimorphicum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	0	2	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. eburneum</i>	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. etunicatum</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. fasciculatum</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	0	0	?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. geosporum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. glomerulatum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	0	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. heterosporum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	1	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. intraradices</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	1	0	0	0	2	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. lamellosum</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. luteum</i>	1	1	1	0	?	0	1	0	?	0	0	?	0	0	0	0	2	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. macrocarpum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	1	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. manihotis</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. mosseae</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	1	0	?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. pallidum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	0	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. rubiforme</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	1	0	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. spurcum</i>	1	1	1	0	?	0	0	0	?	0	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. tenerum</i>	1	1	1	0	?	0	1	3	0	1	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. tortuosum</i>	1	1	1	0	?	0	0	0	?	1	0	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. verruculosum</i>	1	1	1	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. versiforme</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	0	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. viscosum</i>	1	1	0	0	?	0	1	1	?	0	0	?	0	0	0	1	0	?	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>G. warcupii</i>	1	1	1	0	?	0	1	2	?	1	0	?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	0	0	0

Continuação da tabela 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<i>Gigaspora albida</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	?	0	2	?	0	0	0	0	0	?	0	1	0	?	?	0	0	3
<i>G. decipiens</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	?	0	2	?	0	0	0	0	0	?	0	1	0	?	?	0	0	3
<i>G. gigantea</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	?	0	2	?	0	0	0	0	0	?	0	1	0	?	?	0	0	3
<i>G. margarita</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	?	0	2	?	0	0	0	0	0	?	0	1	0	?	?	0	0	3
<i>G. rosea</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	?	0	2	?	0	0	0	0	0	?	0	1	0	?	?	0	0	3
<i>Paraglomus brasilianum</i>	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>P. occultum</i>	1	1	0	0	?	0	0	0	?	0	0	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	?	?	0	0	0
<i>Scutellospora biornata</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	1	1	0	0	2
<i>S. callospora</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	1	2
<i>S. cerradensis</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	1	2
<i>S. coralloidea</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. dipapilosa</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	1	0	2
<i>S. dipurpurascens</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	1	2
<i>S. erythropha</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	3	0	1	0	0	2
<i>S. fulgida</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. gregaria</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. heterogama</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	2
<i>S. pellucida</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	1	2
<i>S. persica</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. rubra</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	0	0	2
<i>S. scutata</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	3	0	1	0	1	2
<i>S. verrucosa</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. weresubiae</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	?	0	2	?	0	1	0	0	0	?	0	1	2	0	1	1	0	2

(M.A.) morfotipo acaulosporóide; (M.G.) morfotipo glomóide

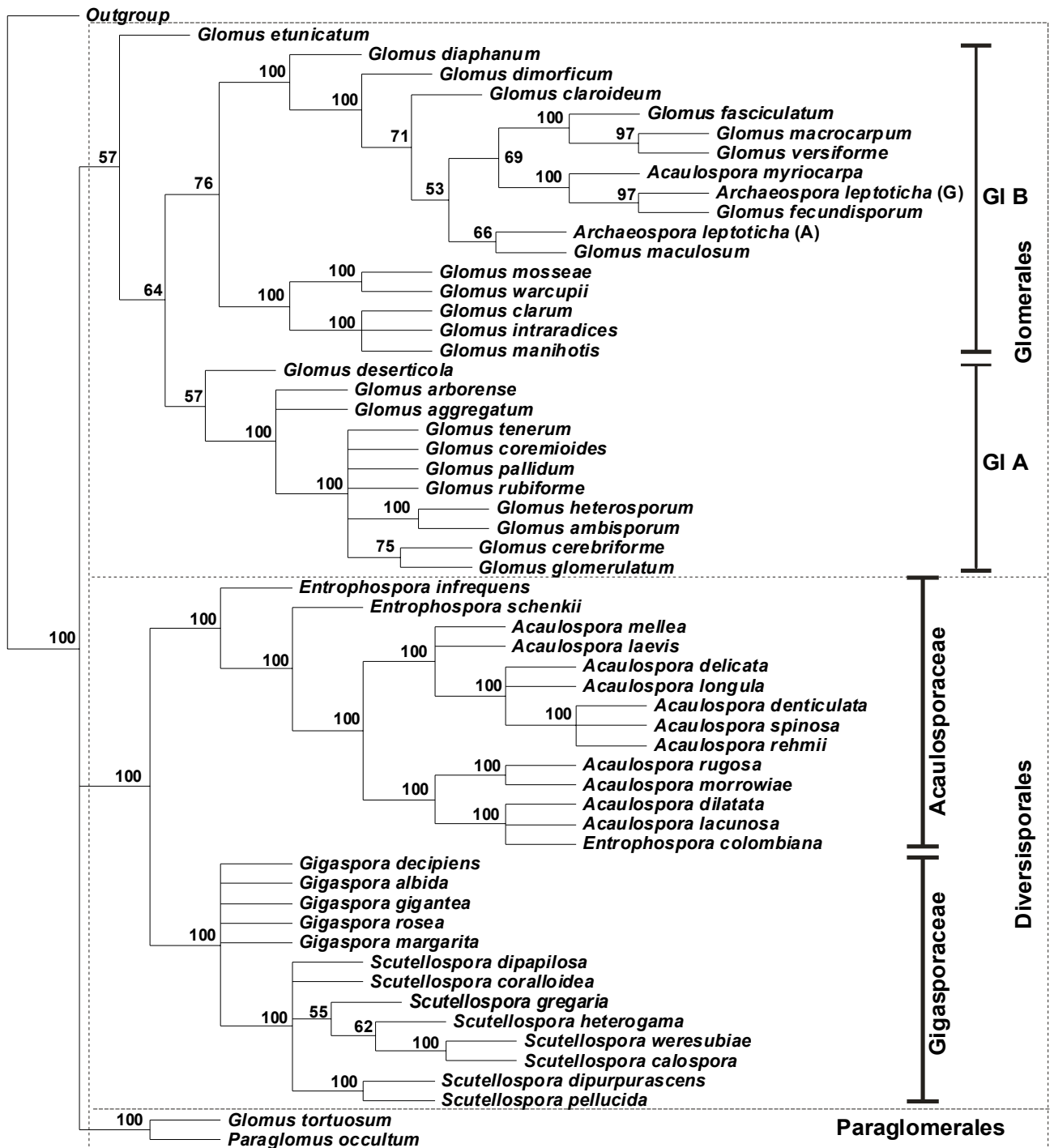


Figura 1. Árvore filogenética (consenso - Majority Rule) de Glomeromycota obtida a partir de análises de máxima parcimônia da matriz 1 do conjunto de caracteres I. Os números nos ramos indicam valores percentuais da ocorrência de cada grupo em 10000 árvores salvas. IC= 0,47; IR= 0,86. (A)= morfotipo acaulosporóide, (G)= morfotipo glomóide.

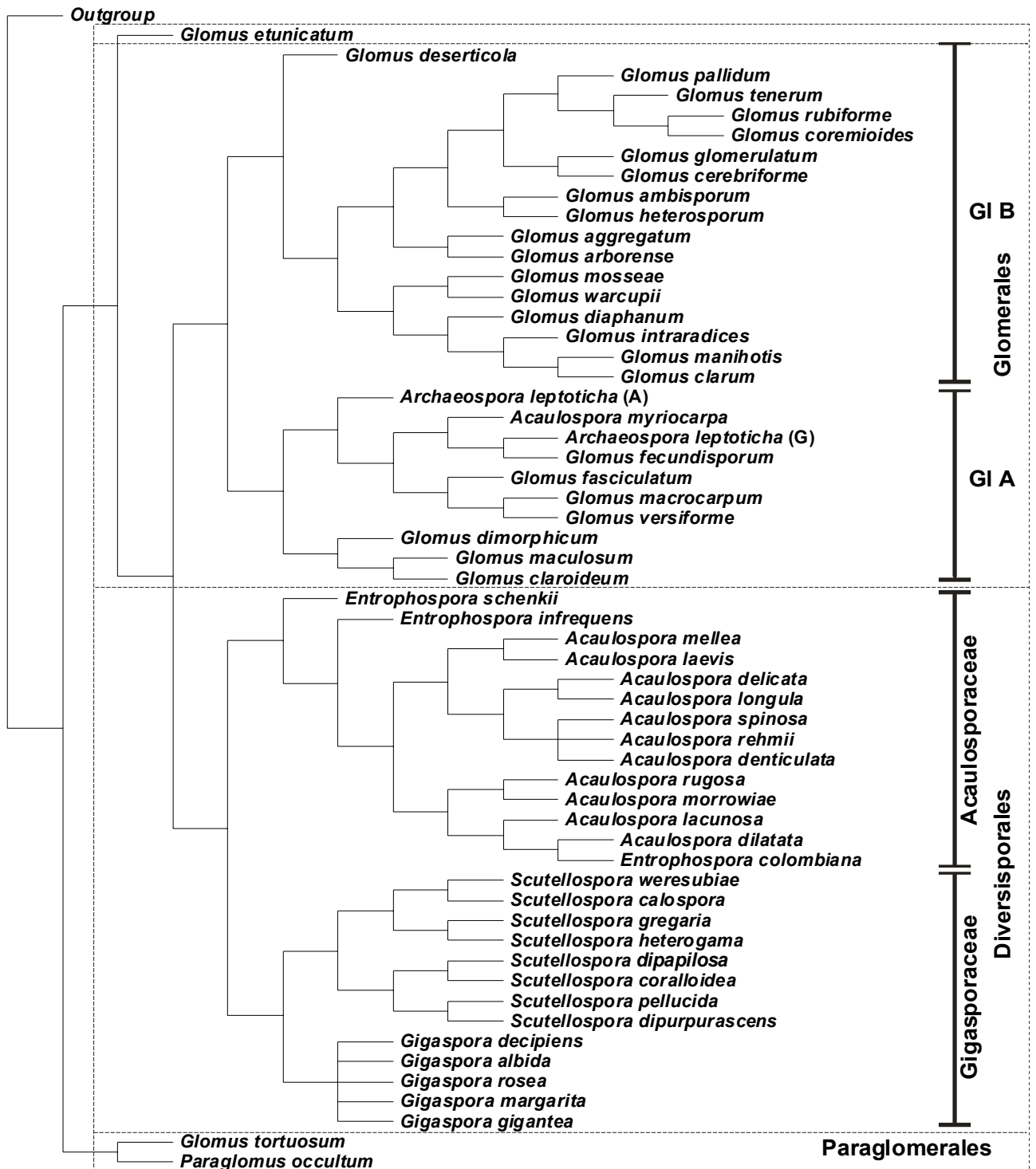


Figura 2. Árvore filogenética de Glomeromycota obtida a partir de análises de neighbor joining da matriz 1 do conjunto de caracteres I. Consenso estrito de 315 árvores. (A)= morfotipo acaulosporóide, (G)= morfotipo glomóide.

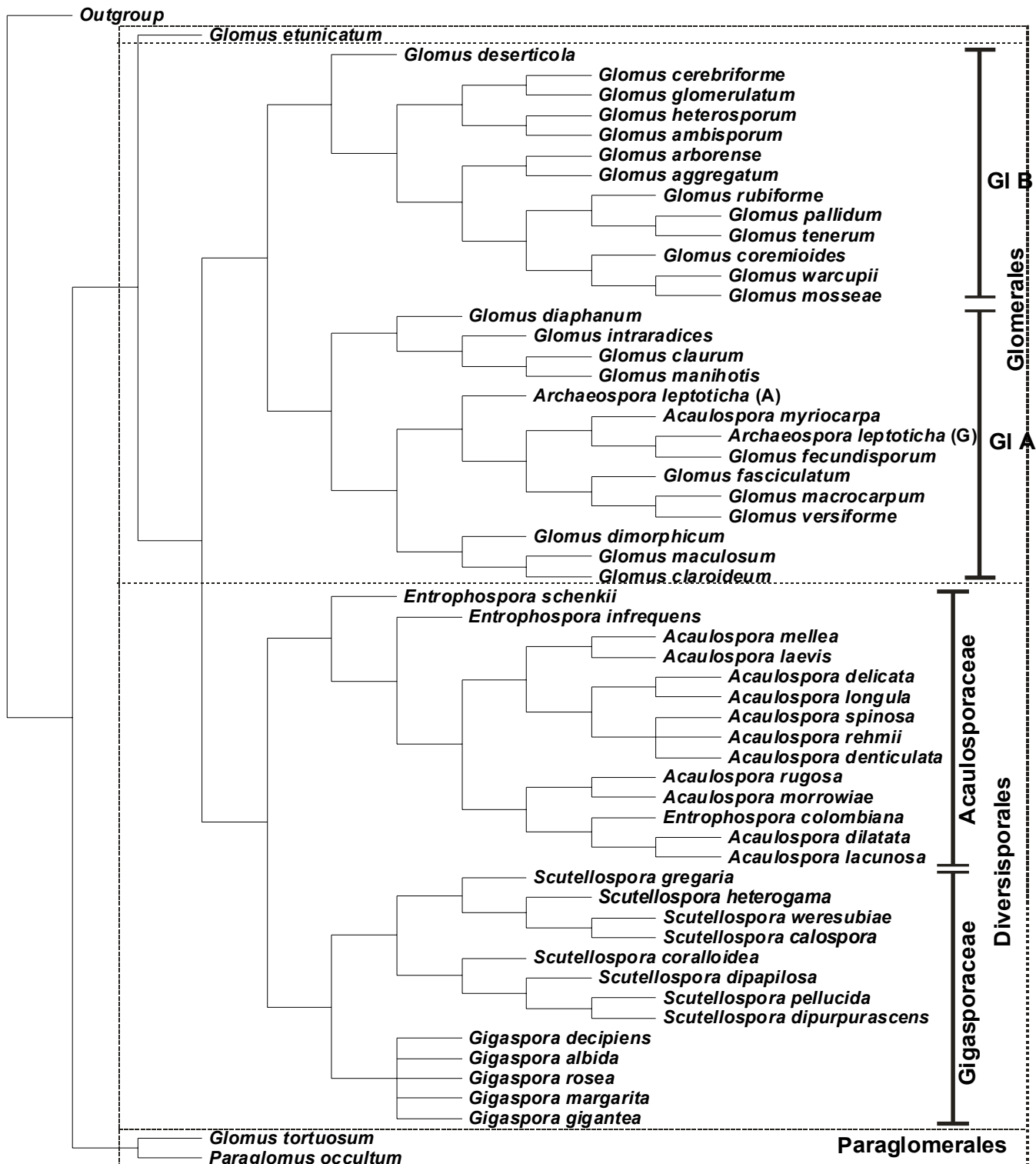


Figura 4. Árvore filogenética de Glomeromycota obtida a partir de análises de neighbor joining da matriz 2 do conjunto de caracteres I. Consenso estrito de 318 árvores. (A)= morfotipo acaulosporóide, (G)= morfotipo glomóide.

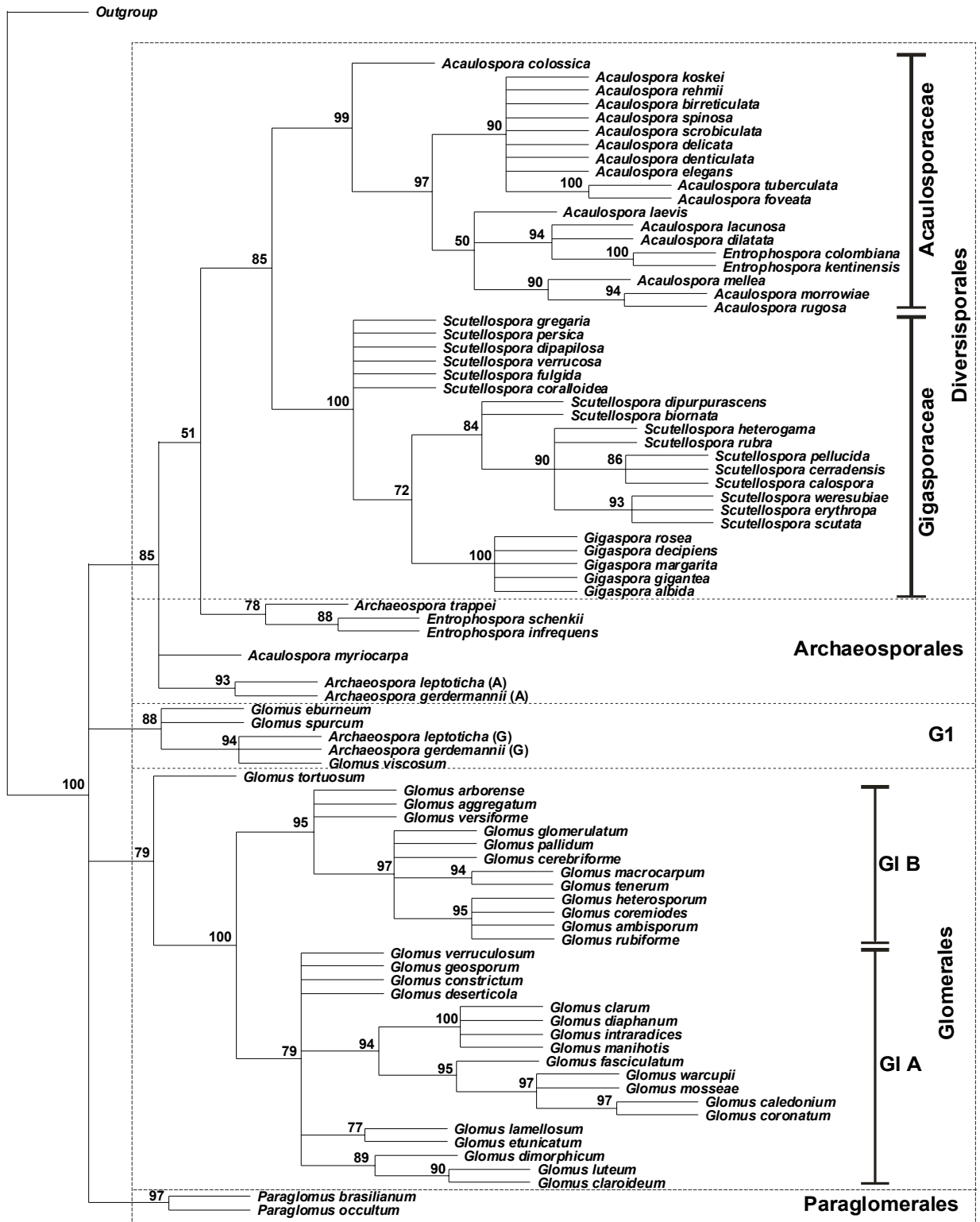


Figura 5. Árvore filogenética (consenso - Majority Rule) de Glomeromycota obtida a partir de análises de máxima parcimônia da matriz do conjunto de caracteres II. Os números nos ramos indicam valores percentuais da ocorrência de cada grupo em 10000 árvores salvas. IC= 0,47; IR= 0,92. (A)= morfotipo acaulosporóide, (G)= morfotipo glomóide.

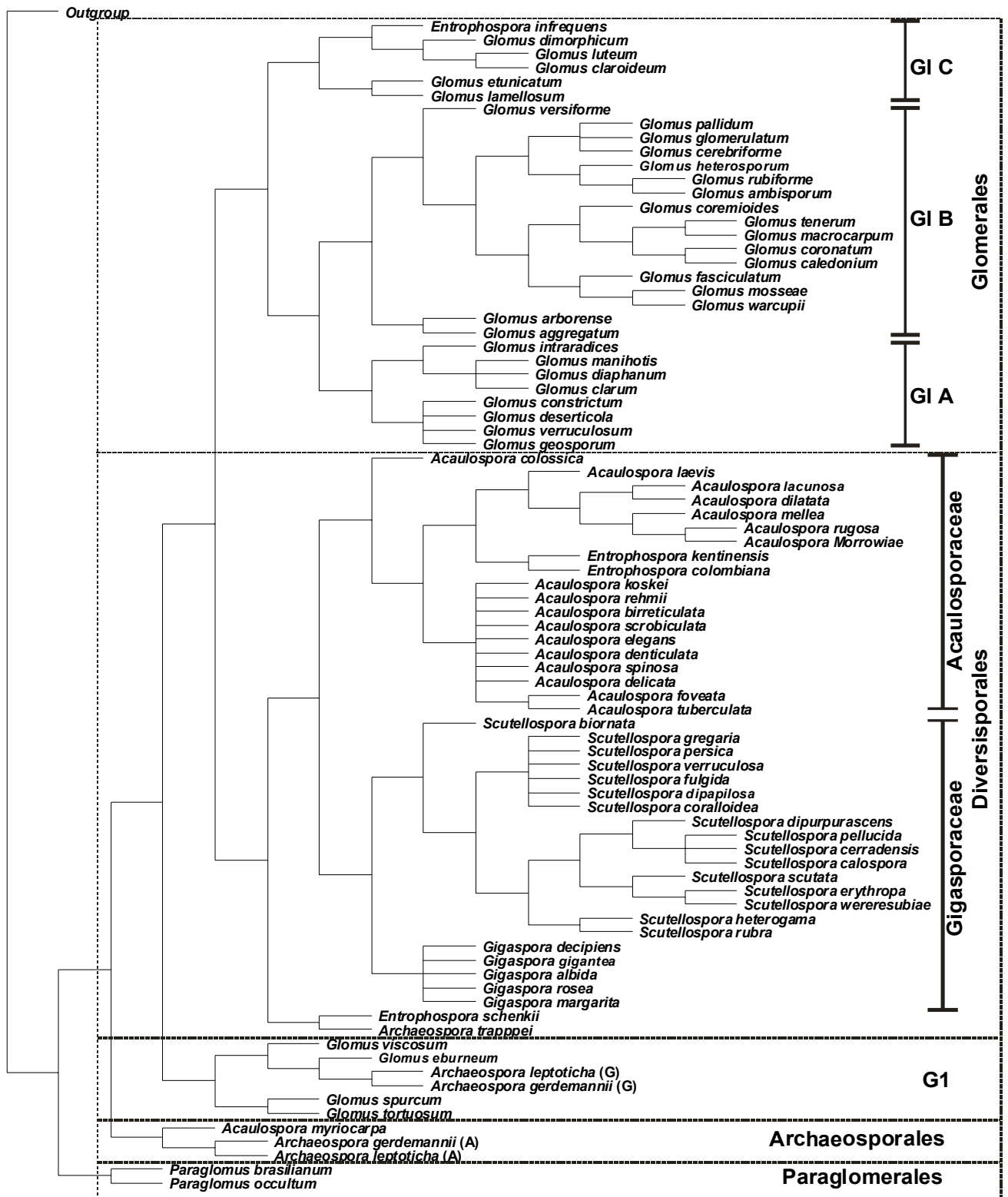


Figura 6. Árvore filogenética de Glomeromycota obtida a partir de análises de neighbor joining da matriz do conjunto de caracteres II. Consenso estrito de 1000 árvores. (A)= morfotipo acaulosporóide, (G)= morfotipo glomóide.

CAPÍTULO 3

Análise filogenética de Glomeromycota a partir de seqüências parciais de LSU rDNA

Artigo a ser enviado ao periódico Mycologia

Análise filogenética de Glomeromycota a partir de seqüências parciais de LSU rDNA

Gladstone Alves da Silva

Leonor Costa Maia

Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n. 50670-420 Recife, PE, Brasil. Fone: +55 81 32718865. Fax: +55 81 32718482.

e-mail: leonorcmaia@hotmail.com

Erica Lumini

Valeria Bianciotto

Paola Bonfante

Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università e Istituto per la Protezione delle Piante

(Sezione di Torino) del CNR – Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino, Italy.

Resumo: Os fungos micorrízicos arbusculares formam associação simbiótica com a maioria das plantas (micorriza). Essa associação existe há mais de 400 milhões de anos e contribuiu para a evolução e a sobrevivência das plantas terrestres. A partir de dados de SSU rDNA, esses fungos foram recentemente agrupados em um novo filo (Glomeromycota); no entanto ainda existem lacunas acerca de sua classificação. Neste trabalho, seqüências parciais de LSU rDNA foram usadas no estudo filogenético de Glomeromycota, com o objetivo de avaliar o potencial de resolução dessas seqüências. As árvores obtidas indicaram que Glomeromycota é monofilético, Archaeosporaceae e Paraglomeraceae são grupos ancestrais, Acaulosporaceae e Gigasporaceae estão unidos em um mesmo clado e Glomeraceae é polifilético, como descrito em trabalhos anteriores. Esta é a primeira vez que outra subunidade ribossomal é utilizada para análise filogenética de todo o filo Glomeromycota considera outra subunidade ribossomal. Apesar dos resultados suportarem a maioria dos anteriormente mostrados, também com esse marcador molecular outras espécies precisam ser avaliadas para a determinação de grupos ainda não resolvidos no filo.

Palavras-chave: Glomeromycota; LSU rDNA; filogenia; micorriza arbuscular; taxonomia

Abstract: The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form a symbiotic association with most plants. This symbiosis exists for over than 400 millions years and contributed for evolution and survival of terrestrial plants. Some researchers recently grouped the AMF in a new phylum (Glomeromycota) using data from SSU rDNA; however, there are some unsolved problems in the classification of the group. In this work, partial sequences from resolution were used o these sequences. Phylogenetic studies of Glomeromycota with the aim of evaluating the LSU rDNA potential for phylogenetic resolution. The trees obtained indicated that Glomeromycota is monophyletic, Archaeosporaceae and Paraglomeraceae are ancestral groups, Acaulosporaceae and Gigasporaceae are in a same clade and Glomeraceae is polyphyletic, as already reported. This represents the first phylogenetic analysis of the entire phylum (Glomeromycota) using other rDNA subunits than SSU rDNA. Our results support most data from other works and point out that also with this molecular marker, an higher number of species is needed to determine groups still unsolved in the phylum.

Key-words: Glomeromycota; LSU rDNA; phylogeny; arbuscular mycorrhiza; taxonomy.

INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), com cerca de 157 espécies (Kirk et al., 2001), formam a mais ampla associação simbiótica entre plantas e fungos encontrada na natureza (micorriza) e estima-se que 95% dos táxons de plantas vasculares pertençam a famílias que caracteristicamente formam micorriza (Trappe, 1987).

Morton e Benny (1990) agruparam esses fungos, caracterizados pela formação de arbúsculos e até então incluídos entre os Endogonales (*Zygomycetes*, *Zygomycota*), na ordem Glomales, distribuindo-os em três famílias e seis gêneros, definidos pelo modo de formação do esporo. Simon et al. (1993), em trabalho pioneiro utilizando seqüências de rDNA como ferramenta para classificação dos FMA, observaram diferentes tendências na classificação do grupo em relação às análises morfológicas. Contudo até então todas as espécies incluídas em Glomales eram, ao menos, possíveis formadoras de micorriza arbuscular. Porém, Schüßler et al. (1994) sugeriram, a partir de semelhanças morfológicas com *Glomus*, que *Geosiphon pyriforme* (Endogonales), embora sem formar micorriza arbuscular, mas constituindo endosimbiose com *Nostoc* (cianobactéria), seria uma espécie relacionada com o grupo. Mais tarde, Gehrig et al. (1996) encontraram evidências, através do sequenciamento de SSU rDNA (“small subunit” rDNA), de que *G. pyriforme* seria uma espécie ancestral de Glomales. A partir daí uma nova tendência, baseada na classificação do grupo através de seqüências nucleotídicas, seria iniciada. Utilizando seqüências do SSU rDNA, Redecker et al. (2000a) inseriram *Sclerocystis coremioides* em *Glomus*, determinando a exclusão deste gênero monoespecífico. Duas novas famílias (Archaeosporaceae e Paraglomaceae) foram propostas por Morton e Redecker (2001) e Glomales foi elevado à categoria de filo (Glomeromycota), com quatro ordens (Schüßler et al., 2001b).

Apesar dos avanços alcançados na interpretação filogenética em Glomeromycota, muitas lacunas ainda existem, como é o caso dos dois grupos dentro de Glomerales (*Glomus*

grupo A e grupo B) que ainda não estão completamente definidos, bem como a falta da descrição de *Diversispora* (Schüßler et al., 2001b).

A atual classificação de Glomeromycota é baseada principalmente em seqüências de rDNA. É importante que outros genes ou outras subunidades de genes sejam considerados na classificação do grupo, visto a necessidade de confirmação das atuais evidências nas tendências evolutivas, bem como resolução dos problemas ainda existentes. Entretanto, é preciso descobrir quais genes podem ser utilizados satisfatoriamente na filogênese, pois regiões como a ITS (internal transcribed spacers) têm sido consideradas inadequadas para clarificar relações filogenéticas, ao menos dentro de Gigasporaceae (Lanfranco et al., 2001). Seqüências do LSU rDNA (“larger subunit” rDNA) não foram usadas até agora para a avaliação do filo como um todo; assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de resolução filogenética dessas seqüências, bem como confirmar ou sugerir novos caminhos para as atuais interpretações das tendências evolutivas no grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fungos MA - Dez isolados, propagados em potes de cultura e pertencendo aos gêneros Gigaspora, Glomus e Scutellospora, foram usados para extração de DNA e sequenciamento neste estudo (Tab 1).

Extração de DNA - O DNA dos esporos foi extraído como descrito em Lanfranco et al. (2001) com algumas modificações. Dez a 50 esporos foram lavados em água destilada, sonicados de três a quatro vezes, macerados em 50-100 µl do tampão de reação de PCR da REDTaq (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂ e 0,01% gelatina) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), centrifugados a 1000 RPM por 2 min e o sobrenadante incubado a 95°C por 13 min. Depois da extração, o DNA foi estocado a -20°C.

PCR e sequenciamento - Os primers usados, 28G1 (5'-CATGGAGGGTGAGAATCCCG-3') e 28G2 (5'-CCATTACGTCAACATCCTTAACG-3'), para região parcial do LSU rDNA,

foram desenhados a partir de seqüências de FMA já depositadas no GenBank. As reações de PCR seguiram Lanfranco et al. (2001) com algumas modificações nos parâmetros de ciclagem: 95°C 3 min (1 ciclo), 94°C 45s, 55°C 1 min, 72°C 1 min (40 ciclos), 72°C 7 min (1 ciclo). Os produtos amplificados foram purificados e seqüenciados diretamente.

Alinhamento das seqüências e análise filogenética - Trinta e quatro seqüências de FMA foram usadas: dez obtidas no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Turim, e 24 retiradas do GenBank (Tab 1). As seqüências foram alinhadas com o programa Clustalx (Thompson et al., 1997) e editadas usando o programa GeneDoc (Nicholas et al., 1997).

Para avaliação filogenética e construção de árvores, análises de máxima parcimônia (MP) e neighbor joining (NJ), com 1000 e 10000 bootstraps respectivamente, foram usadas com o auxílio do programa PAUP* (Swofford, 2002). Os índices de consistência (IC) e retenção (IR), para as análises de MP também foram calculados pelo programa. Como grupo externo foram usadas seqüências de *Mortierella polycephala* (AF113464), *Boletus edulis* (AF336240.1) e *Neurospora crassa* (AF286411.1).

RESULTADOS

De forma geral as árvores obtidas tanto por MP quanto por NJ foram muito similares (Figs. 1 e 2). A análise filogenética, obtida com seqüências parciais do LSU rDNA, indica Glomeromycota como grupo monofilético, apresentando valores de bootstrap de 72% (MP) e 76% (NJ). As árvores apresentadas mostraram *Archaeospora* como grupo mais basal, seguido por *Paraglomus* (análise de MP).

As famílias Acaulosporaceae e Gigasporaceae estão unidas em um mesmo grupo com valores de bootstrap de 70% e 53% para as análises de MP e NJ respectivamente. As espécies de Acaulosporaceae e Gigasporaceae agruparam-se com valores de bootstrap acima de 99% para cada família. Nas análises de MP, *S. heterogama* e *S. calospora* estão isoladas, outras

três espécies de *Scutellospora* formaram um grupo à parte e as espécies de *Gigaspora* reuniram-se num mesmo clado. Nas análises de NJ foram observados dois grupos em Gigasporaceae, um deles com todas as espécies de *Gigaspora* e outro reunindo as de *Scutellospora*.

Em *Glomus*, foi possível observar dois grupos, aqui denominados como *Glomus* 1 (G1) e *Glomus* 2 (G2). O G1 mostrou valores de bootstrap elevados (100%), sendo basal em relação ao clado que compõe G2, Gigasporaceae e Acaulosporaceae nas análises de MP. O G2 foi suportado por 75% (NJ) e 92% (MP) dos valores de bootstrap. Este pode ser dividido em dois subgrupos (G2A e G2B), ambos com valores de suporte de bootstrap de 100%, nas análises de NJ e MP.

DISCUSSÃO

As árvores aqui obtidas em geral são muito similares àquela gerada por Schwarzott et al. (2001). Entretanto, Archaeosporaceae emerge antes de Paraglomeraceae, contrariando o observado por esses autores e por Redecker et al. (2000b) (análises de MP) onde não havia clara definição sobre qual dos grupos teria emergido primeiro (Archaeosporaceae ou Paraglomeraceae). É necessária cautela na determinação das relações entre esses grupos, pois aqui apenas um representante de cada grupo foi avaliado.

Os resultados desse trabalho confirmam os dados de Schwarzott et al. (2001) sobre a proximidade entre Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Essa comum ancestralidade entre as famílias já havia sido apontada anteriormente por Simon et al. (1993) e Redecker et al. (2000b) em análises de NJ. Entretanto, com base em dados morfológicos, Morton (1990) indicou que Acaulosporaceae estaria mais próxima de Glomeraceae, fato confirmado por Gianinazzi-Pearson et al. (1994) ao encontrarem β (1 \rightarrow 3) glucanos apenas na parede de espécies dessas duas famílias.

Em Gigasporaceae, dados de ontogênese (Franke & Morton, 1994; Bentivenga & Morton, 1995; Morton, 1995) e perfil de ácidos graxos (Bentivenga e Morton, 1996) têm indicado que *Gigaspora* seria basal à *Scutellospora*, como previamente estabelecido com dados morfológicos (Morton, 1990). Contudo, árvores obtidas por Simon et al. (1993) e Redecker et al. (2000b) a partir de dados moleculares, demonstraram que *Scutellospora* emergiu antes de *Gigaspora* no processo evolutivo. Embora atualmente *Gigaspora* esteja sendo considerado como gênero mais avançado na família (Redecker, 2002), os resultados de Lanfranco et al. (2001) e Schwarzott et al. (2001) parecem indicar que os dois gêneros evoluíram separadamente no grupo. Aqui uma tendência similar foi encontrada na análise de MP com *Scutellospora* apresentando vários ramos distintos, como observado em Schwarzott et al. (2001) e Schüßler et al. (2001a); contudo, a análise de NJ revelou apenas um ramo na formação do gênero. Kramadibrata et al. (2000) reportaram que *S. projecturata* pertence a um grupo mais próximo à *Gigaspora* e distinto daquele das espécies de *Scutellospora* seqüenciadas até o momento. As espécies de *Gigaspora* têm se apresentado em um único clado na maioria dos trabalhos de filogênese em Glomeromycota, porém os caminhos evolutivos em *Scutellospora* ainda precisam ser desvendados.

No trabalho de Schwarzott et al. (2001) algumas espécies de *Glomus* (*G. etunicatum*, *G. spurcum* e *G. versiforme*) agrupam-se com Acaulosporaceae e Gigasporaceae para formar a ordem Diversisporales. De acordo com esses autores, dois isolados de *G. etunicatum* agruparam-se em clados diferentes, deixando dúvidas sobre a verdadeira posição da espécie; isso possivelmente ocorreu por dificuldades na identificação, ou contaminação do material. Os presentes resultados indicam que *G. etunicatum* não faz parte de Diversisporales, porém forma um clado separado com *G. claroideum* com 100% de suporte (Figs. 1 e 2). Outro dado importante agrupando *G. claroideum* e *G. etunicatum* é a presença do ácido graxo C20:0 ISO, observado apenas nessas duas espécies (Graham et al. 1995). Os dois isolados de *G.*

coronatum usados nesse trabalho também se agruparam em posições diferentes no clado G2B, um deles mais próximo a *G. mosseae* e outro a *G. constrictum*. Não é possível afirmar com segurança a exata posição dessa espécie, possivelmente houve um problema de identificação de um deles.

De acordo com Schwarzott et al. (2001), Glomeraceae estaria dividida em três grupos, sendo um deles subdividido em pelo menos mais dois (A e B). Aqui foi observado que a família Glomeraceae apresentou dois grupos (G1 e G2), sendo que G2 também mostra um padrão de subdivisão similar ao descrito por Schwarzott et al. (2001). Além disso, as espécies de cada grupo são as mesmas apresentadas por esses autores, o que reforça a teoria desses pesquisadores quanto às relações filogenéticas de Glomeromycota. É necessário que outras espécies de Glomeraceae tenham seus genes seqüenciados, tanto rDNA como outros genes filogenético-informativos, para melhor estabelecer as relações entre as espécies dentro do grupo.

AGRADECIMENTOS

G.A. Silva e L.C. Maia agradecem à CAPES (bolsa de Doutorado) e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

LITERATURA CITADA

- Bentivenga SP, Morton JB. 1995. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 719-731.
- Bentivenga SP, Morton JB. 1996. Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5659–5662.
- Franke M, Morton JB. 1994. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. *Can J Bot* 72: 122-134.

- Gehrig H, Schüßler A, Kluge M. 1996. *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J Mol Evol* 43: 71-81.
- Gianinazzi-Pearson V, Lemoine M-C, Arnould C, Gollotte A, Morton JB. 1994. Localization of β (1 \rightarrow 3) glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales. *Mycologia* 86: 478-485.
- Graham JH, Hodge NC, Morton JB. 1995. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Appl Environ Microbiol* 61: 58-64.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th edition. CAB International, Oxon.
- Kramadibrata K, Walker C, Schwarzott D, Schüßler A. 2000. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann Bot* 86: 21-27.
- Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P. 2001. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytol* 152:169-179.
- Morton JB. 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207.
- Morton JB, Benny GL 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491

- Morton JB. 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87:127–137
- Morton JB, Redecker D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DWII. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News* 4: 1-4.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000a. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92: 282-285.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000b. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276–284.
- Redecker D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 67-73.
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Mol Phylogenet Evol* 21: 190-197.
- Schüßler A, Mollenhauer D, Schnepf E, Kluge M. 1994. *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Bot Acta* 107: 36-45.
- Schüßler A, Gehrig H, Schwarzott D, Walker C. 2001a. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res* 105: 05-15.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001b. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421.

Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.

Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony *(and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 24:4876-4882.

Trappe JM. 1987. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the Angiosperms from an evolutionary standpoint. Pp. 5-25 In: *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Ed. G. R. Safir. Boca Raton, FL: CRC Press.

Tabela 1. Procedência dos isolados de Glomeromycota utilizados no sequenciamento de LSU rDNA.

Espécimes*	Código	País	Fonte	LSU rDNA
<i>Acaulospora lacunosa</i> Morton	BEG 78	EUA	BEG	AJ510230.1
<i>A. laevis</i> Gerd. & Trappe	BEG 13	Nova Zelândia	BEG	AJ510229.1
<i>A. longula</i> Spain & Schenck	BEG 08	Reino Unido	BEG	AJ510228.1
<i>Archaeospora gerdemannii</i> 1 (Rose, Daniels & Trappe) Morton & Redecker	NC169-3	EUA	INVAM	AJ510234.1
<i>A. gerdemannii</i> 2	AU215-6	Tasmânia	INVAM	AJ510233.1
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	BR 601	Brasil	J. Morton	
<i>G. gigantea</i> 1 (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	MN 414D	EUA	J. Morton	
<i>G. gigantea</i> 2	NC 150	EUA	J. Morton	
<i>G. margarita</i> 1 Becker & Hall	MAFF 52	Japão	M. Saito	
<i>G. margarita</i> 2	BEG 34	Nova Zelândia	P. Bonfante	
<i>G. margarita</i> 3	MAFF 54	Japão	M. Saito	
<i>G. rosea</i> 1 Nicol. & Schenck	BEG 9	EUA	BEG	Y12075.1
<i>G. rosea</i> 2	UT 102	EUA	J. Morton	
<i>Glomus caledonium</i> 1 (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerd.	SC_658	ND	ND	AF396799.1
<i>G. caledonium</i> 2	BEG 86	Dinamarca	BEG	AJ510239.1
<i>G. claroideum</i> 1 Schenck & Smith	BEG 31	Finlândia	BEG	AJ271929.1
<i>G. claroideum</i> 2	BEG14	Dinamarca	BEG	AF235007.1
<i>G. clarum</i> 1 Nicol. & Schenck	LPA64	ND	ND	AJ510243.1
<i>G. clarum</i> 2	UFPE 08	Brasil	L.C. Maia	
<i>G. constrictum</i> Trappe	BEG 130	Espanha	BEG	AF145741.1
<i>G. coronatum</i> 1 Giovannetti	BEG 28	Itália	BEG	AF145739.1
<i>G. coronatum</i> 2	BEG 49	Espanha	BEG	AF145740.1

Tabela 1. Continuação

Espécimes*	Código	País	Fonte	LSU rDNA
<i>G. etunicatum</i> Becker & Gerd.	UFPE 06	Brasil	L.C.Maia	
<i>G. fragilistratum</i> Skou & Jakobsen	BEG 05	Dinamarca	BEG	AF145747.1
<i>G. geosporum</i> (Nicol. & Gerd.) Walker	BEG 11	Reino Unido	BEG	AJ510241.1
<i>G. intraradices</i> Schenck & Smith	SI 141	NA	NA	AF396797.1
<i>G. mosseae</i> 1 (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	BEG 25	Reino Unido	BEG	AF145735.1
<i>G. mosseae</i> 2	BEG 85	Dinamarca	BEG	AF145736.1
<i>Paraglomus occultum</i> (Walker) Morton & Redecker	CL700C-2	Colômbia	INVAM	AJ271713.1
<i>Scutellospora callospora</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	BEG 32	Reino Unido	BEG	AJ510231.1
<i>S. castanea</i> Walker	BEG 01	França	BEG	Y12076.1
<i>S. gregaria</i> (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders	LPA48	ND	ND	AJ510232.1
<i>S. heterogama</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	UFPE 19	Brasil	L.C. Maia	
<i>S. pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	Scutpell90	ND	ND	AF396784.1

*Espécimes em negrito foram seqüenciados neste trabalho (sem número de acesso por não estarem ainda depositadas no GenBank). ND= não disponível

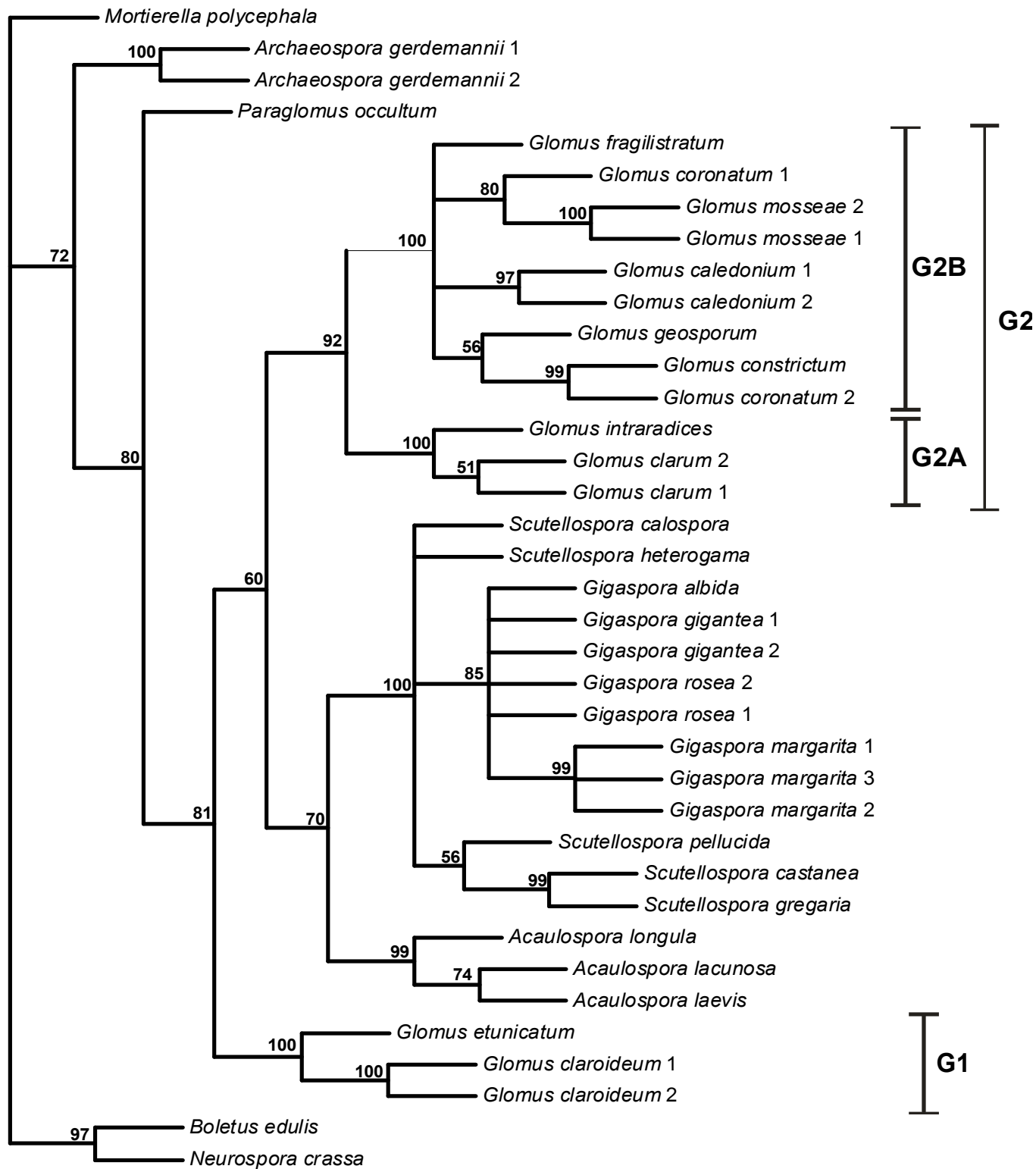


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir de análises de máxima parcimônia de seqüências parciais do LSU rDNA. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 1000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 600bp. IC= 0,56; IR= 0,73.

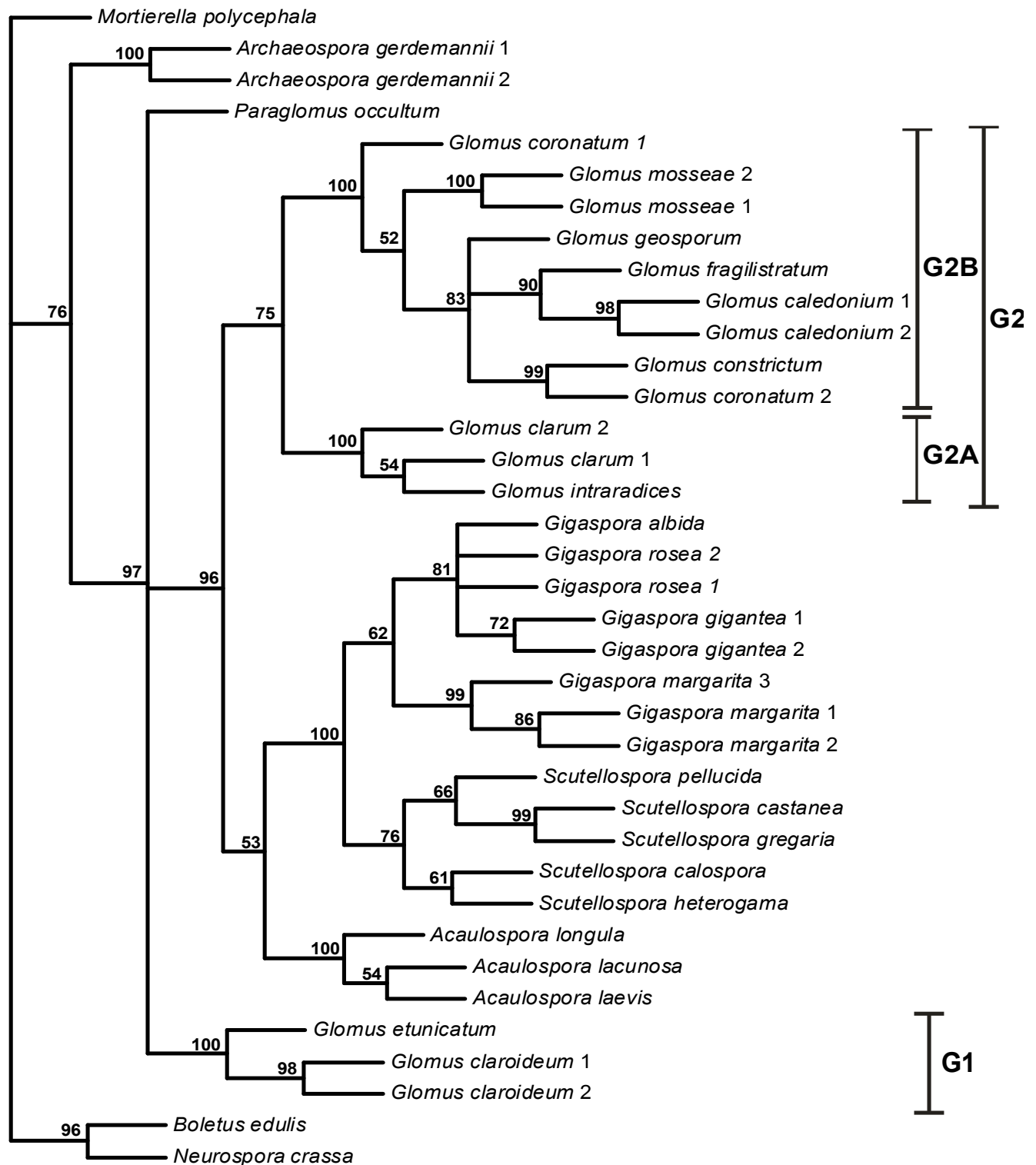


Figura 2. Árvore filogenética obtida a partir de análises de neighbor joining de seqüências parciais do LSU rDNA usando os parâmetros de Kimura (1980). Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 10000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 600bp.

CAPÍTULO 4

Implicações filogenéticas da amplificação de genes mitocôndriais em espécies de Glomeromycota: uma primeira abordagem

Artigo a ser enviado ao periódico Mycorrhiza

Gladstone Alves da Silva · Erica Lumini · Valeria Bianciotto · Leonor Costa Maia · Paola Bonfante

Implicações filogenéticas da amplificação de genes mitocôndriais em espécies de Glomeromycota: uma primeira abordagem

G.A. Silva · L.C. Maia

Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n. CEP 50670-420 Recife, PE, Brasil. Fone: +55 81 32718865. Fax: +55 81 32718482. e-mail: leonorcmaia@hotmail.com

Erica Lumini · Valeria Bianciotto · Paola Bonfante

Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università e Istituto per la Protezione delle Piante (Sezione di Torino) del CNR – Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino, Italy.

Resumo Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foram colocados recentemente, a partir de análises filogenéticas de seqüências de SSU rDNA, em um novo filo (Glomeromycota). Entretanto, muitas lacunas ainda existem acerca das relações desses fungos e outras seqüências precisam ser analisadas para confirmação ou não dos resultados obtidos em trabalhos prévios ou mesmo para indicação de novos caminhos nas relações do grupo. Foi determinada, em 12 isolados de FMA, a utilidade de primers universais tradicionalmente usados para amplificar genes mitocondriais em outros grupos de fungos, bem como desenvolvidos novos primers capazes de amplificar genes mitocondriais em Glomeromycota, relacionando filogeneticamente as espécies estudadas. A partir de seqüências mitocôndriais de *Gigaspora rosea* obtidas no GeneBank, ou através de pesquisadores, primers foram desenhados e testados. Os primers universais disponíveis para genes mitocondriais de fungos amplificaram apenas o LSU rDNA das endobactérias presentes em espécies de Gigasporaceae. As seqüências obtidas a partir dos primers desenhados neste trabalho foram usadas em análises filogenéticas de espécies de FMA. Uma das seqüências pertence ao mt-LSU rDNA (seqüência 1), a outra não teve similaridade significativa com nenhuma das seqüências do GeneBank (seqüência 2). A análise filogenética da seqüência 1 não reproduziu as relações dentro do grupo. Entretanto, a seqüência 2, apesar de amplificar DNA apenas de espécies de Gigasporaceae, produziu uma árvore que aparentemente suporta dados prévios sobre a filogênese de *Gigaspora*.

Palavras-chave: Filogenia, mt-LSU rDNA, micorriza arbuscular, mitocôndria, seqüências ribossomais

Abstract The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were recently placed in a new phylum (Glomeromycota), based on phylogenetic analysis of SSU rDNA sequences. However, many doubts still exist regarding the relations of these fungi, and other sequences need to be analyzed in order to confirm or not results from previous works and also to indicate new pathways in the relations of the group. Using 12 isolates of AMF the utility of universal primers traditionally used to amplifying mitochondrial genes in other groups of fungi was determined and new primers capable of amplify mitochondrial genes in Glomeromycota were developed, phylogenetically showing the relation between the studied species. From mitochondrial sequences of *Gigaspora rosea* obtained at the GeneBank, or through other researchers, primers were designed and tested. The universal primers available for mitochondrial genes of fungi amplified only the LSU rDNA of the endobacteria present in spores of Gigasporaceae. The sequences obtained from primers designed in this work were used for phylogenetic analysis of AMF species. One of the sequences belongs to the mt-LSU rDNA (sequence 1), the other did not have significative similarity with any of the sequences from the GeneBank (sequence 2). The phylogenetic analysis of sequence 1 did not reproduce the relations into the group. However, sequence 2, although amplifying only DNA from species of Gigasporaceae, produced a tree that apparently supports previous data regarding the phylogenesis of *Gigaspora*.

Key-words; phylogenesis, mt-LSU rDNA, arbuscular mycorrhiza, mitochondria, ribossomal sequences

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam associação mutualista com raízes de plantas (micorriza). Tal associação, que contribuiu para a evolução e sobrevivência das plantas terrestres e dos fungos, existe há 400 milhões de anos (Smith e Read 1997) e representa a mais ampla simbiose entre plantas e fungos encontrada na natureza (Souza e Silva 1996).

A história taxonômica dos FMA é bem recente; a primeira revisão de Endogonaceae (Zygomycota), grupo onde se incluía os FMA, foi publicada antes de suas relações simbióticas serem entendidas (Thaxter 1922). Gerdemann e Trappe (1974) estabeleceram melhor as bases para a classificação dos FMA, porém continuaram agrupando esses fungos na família Endogonaceae. Há alguns anos, os FMA foram considerados um grupo monofilético e agrupados na ordem Glomales, sendo distribuídos em três famílias e seis gêneros: Gigasporaceae (*Gigaspora* e *Scutellospora*), Acaulosporaceae (*Acaulospora* e *Entrophospora*) e Glomaceae (*Glomus* e *Sclerocystis*) (Morton e Benny 1990). A partir de então, outros autores contestaram as relações filogenéticas (Simon et al. 1993) e o caráter monofilético dos FMA (Walker 1992). Simon et al. (1993) trabalharam com seqüências de SSU rDNA de 12 espécies de FMA pertencentes aos gêneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* e *Entrophospora*. Esses pesquisadores foram capazes de desenvolver análise filogenética do grupo com base em estimativas de relógio molecular e sugeriram que Glomales seria monofilético, porém Acaulosporaceae estaria mais próxima de Gigasporaceae do que de Glomaceae, contrariando as propostas de Morton (1990) quanto à proximidade entre as famílias. Também foi inferido por esses autores que Glomaceae poderia ser subdividida, quando mais espécies fossem analisadas, pois muitas diferenças foram vistas entre *G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. intraradices*. Outros estudos foram realizados e mudanças significativas ocorreram na classificação de Glomales, com a adição de novas

famílias (Redecker et al. 2000a e b; Morton e Redecker 2001; Schwarzott et al. 2001). Atualmente os FMA estão colocados em um filo (Glomeromycota) e novas ordens e famílias foram acrescentadas ao grupo (Schüßler et al. 2001).

A utilização de técnicas moleculares no estudo filogenético dos FMA se mostrou bastante adequada; entretanto, apesar dos avanços alcançados até o momento, muitas lacunas ainda existem, como é o caso dos dois grupos dentro de Glomerales (*Glomus* grupo A e grupo B) que ainda não estão completamente definidos (Schüßler et al. 2001).

Alguns trabalhos relatam as relações filogenéticas de *Gigaspora* a partir de ferramentas moleculares (Bago et al. 1998; Lanfranco et al. 2001), com base, sobretudo, em regiões do rDNA. Atualmente novos conceitos estão sendo considerados na reconstrução filogenética e a necessidade de análise de outros genes parece ser um ponto de partida para essa nova etapa (Moncalvo et al. 2000; Philippe et al. 2000). Os genes mitocondriais apresentam uma alternativa na filogenia molecular e alguns trabalhos já demonstram a utilidade dos mesmos em fungos (Moncalvo et al. 2000; Yokoyama et al. 2001; Binder e Hibbett 2002).

O objetivo deste trabalho foi determinar, em 12 isolados de FMA, a utilidade de primers universais tradicionalmente usados para amplificar genes mitocondriais em outros grupos de fungos, bem como desenvolver novos primers capazes de amplificar genes mitocondriais em Glomeromycota, relacionando filogeneticamente as espécies estudadas, a partir dos dados obtidos.

Materiais e métodos

Isolados de FMA

Foram utilizados 12 isolados, pertencentes aos gêneros *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora* (Tab. 1).

Extração de DNA

O DNA dos esporos foi extraído utilizando a metodologia descrita por Lanfranco et al. (2001) com as seguintes modificações: 10 a 50 esporos foram lavados (H₂O destilada), sonicados 3 a 4 vezes, macerados em 50-100 µl de 1x REDTaq PCR Reaction Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂ e 0,01% gelatina) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), centrifugados a 1000 RPM por 2 min. e o sobrenadante incubado a 95°C por 13 min. Após extração o DNA foi conservado a -20°C.

Desenho de primers, PCR e sequenciamento

Primers foram desenhados a partir de seqüências depositadas no GeneBank, ou fornecidas por colegas. A seqüência 1 tem aproximadamente 400 bp; os primers que amplificam essa região foram desenhados a partir de um fragmento depositado no GeneBank (number accession: AJ419668), que representa uma parte do mt-LSU rDNA. A seqüência 2 tem aproximadamente 250 bp, os primers para essa região foram obtidos a partir de uma seqüência, fornecida por Philipp Franken, obtida de uma cDNA library de *G. rosea*.

Os primers MS1, MS2, ML1, ML2, ML3, ML4, ML5, ML6 ML7 e ML8 (White et al. 1990), desenvolvidos para a região codificante de rDNA mitocondrial em fungos, foram utilizados neste estudo. Os seguintes primers foram desenhados: 1MTG1 (5'-GTACCATGAGGGAACAAAAC-3'), 2MTG4 (5'-CCGAGTCTACATACTCACTG-3') (seqüência 1) e 3MTG1 (5'-CTGATTTAATCTTTGTTGCTG-3'), 3MTG2 (5'-CACCAGTATTTTTGAGTATTG-3') (seqüência 2).

A PCR foi realizada segundo o protocolo de Lanfranco et al. (2001) com algumas modificações nos parâmetros de ciclagem: 95°C 3 min (1 ciclo), 94°C 45s, 55°C 1 min, 72°C 1 min (40 ciclos), 72°C 7 min (1 ciclo). Em alguns casos, onde não foi possível visualizar as bandas na primeira amplificação (apenas na seqüência 1), o produto da PCR foi diluído 1:100

e reamplificado. Após acumulação do amplificado, este foi purificado e seqüenciado diretamente.

Alinhamento das seqüências e análise filogenética

As seqüências obtidas foram alinhadas usando o programa Clustalx (Thompson et al. 1997) e editadas com o auxílio do programa Genedoc (Nicholas et al. 1997).

Para análise filogenética e construção das árvores foi utilizada a análise de máxima parcimônia com valores de bootstrap de 1000 replicatas, conduzida com o programa PAUP* (Swofford 2002).

Resultados

Teste de Primers

Em uma primeira etapa, os tradicionais primers universais, usados para amplificação do rDNA mitocondrial em fungos, foram testados. Todas as combinações possíveis foram testadas e falharam na amplificação desses genes nos isolados aqui estudados. Um dado inesperado foi obtido a partir da combinação dos primers ML1-ML4, os quais amplificaram um fragmento de ~ 1100 bp apenas em espécies de Gigasporaceae (exceto *G. rosea*). Após sequenciamento do mesmo, foi observado que esta seqüência representa uma região da LSU rDNA em bactérias, relacionadas àquelas que formam simbiose com Gigasporaceae (*Ralstonia* e *Burkholderia*).

Todos os isolados foram observados em relação à presença de BLOs (bacteria like organisms) e apenas aqueles que apresentaram bactérias foram amplificados com os primers acima citados.

Filogênese a partir de genes mitocondriais

Devido aos problemas encontrados durante as tentativas de amplificação de genes mitocondriais em Glomeromycota, a partir dos primers usados tradicionalmente, foi

necessário uma busca de possíveis seqüências de genes mitocondriais nesses fungos no GeneBank para o desenho de novos primers.

Primers foram desenhados a partir de uma seqüência depositada sob o número de acesso AJ419668 (Seqüência 1) e uma seqüência fornecida pelo Dr. Phillipp Franken (Univ. de Marburg, Alemanha) (Seqüência 2).

A seqüência 2 não teve similaridade significativa com nenhuma das seqüências depositadas até o momento. O índice de que seja relativa a um gene mitocondrial é o elevado percentual dos nucleotídeos A e T (~ 73%) comumente observado no mtDNA.

A partir das seqüências obtidas, árvores filogenéticas foram produzidas (Figs. 1 e 2). Poucas espécies foram amplificadas com a seqüência 1 e algumas vezes foi necessária a reamplificação do produto da PCR para a observação de bandas no gel. Na árvore filogenética dessa seqüência *G. albida* (BR601) se apresentou fora do grupo das outras espécies de *Gigaspora* suportado por 74% dos valores de bootstrap e *G. margarita* formou um clado separado com *G. rosea* com suporte de 78% de bootstrap.

A seqüência 2 amplificou somente as espécies de Gigasporaceae. Os primers também foram testados em *Glomus etunicatum* e *G. clarum*, porém sem sucesso. *Scutelospora heterogama* foi usada como grupo externo e a árvore mostra dois grupos em *Gigaspora*; um representa o clado de *G. margarita* e foi suportado por 99% de bootstrap, o outro apresentou 92% de suporte e foi dividido em dois subgrupos; em um estavam os dois isolados de *G. gigantea* e no outro se agruparam os representantes de *G. albida* e *G. rosea* e o isolado *G. margarita* BR444.

Esses resultados representam os primeiros genes mitocondriais amplificados em Glomeromycota, bem como o primeiro relato de genes mitocondriais usados na filogênese desse grupo.

Discussão

A amplificação de genes bacterianos a partir de primers mitocondriais, usados tradicionalmente, dificulta ainda mais o trabalho com genes mitocondriais em Glomeromycota, ao menos para a família Gigasporaceae, onde muitas espécies possuem endobactérias (Biancioto et al., 2000). Além disso, a maioria dos primers para mtDNA em fungos foi desenhada a partir de seqüências de Ascomycota e Basidiomycota (White et al. 1990). O fato é que Glomeromycota, apesar de estar mais proximamente relacionado aos Basidiomycota e Ascomycota (Schübler et al. 2001), representa um filo distinto e genes mitocondriais em fungos, como o mtrDNA por exemplo, são menos conservados que o nrDNA (Hillis et al. 1996). A pouca disponibilidade de seqüências mitocondriais de Glomeromycota no GeneBank tornou o trabalho mais complicado.

A análise filogenética a partir da seqüência 1 não reproduziu as relações dentro do grupo. Binder e Hibbett (2002), trabalhando com a análise filogenética de Homobasidiomycetes a partir de diferentes genes, observaram conflitos na árvore produzida com os dados de LSU mtrDNA quando comparados com o SSU mtrDNA. Outras regiões, como a ITS, foram consideradas inadequadas para clarificar as relações filogenéticas, ao menos dentro de *Gigaspora* (Lanfranco et al. 2001). Além disso, Clapp et al. (2001), trabalhando com LSU rDNA, analisaram isolados de *Glomus mosseae*, *G. coronatum* e *G. constrictum* e observaram variações nas seqüências dentro do mesmo isolado, determinando que esta variação obscureceu a resolução desta subunidade do rDNA ao nível de espécie.

Tendo em vista os dados aqui obtidos e os descritos em Binder e Hibbett (2002), é possível que o LSU mtrDNA não seja um marcador filogenético adequado, ao menos em fungos.

Com relação à seqüência 2, os dados parecem confirmar aqueles observados por Bago et al. (1998), onde foram sugeridos três grupos subgenéricos em *Gigaspora*. Um representado

por *G. margarita* e *G. decipiens*, outro por *G. albida* e *G. rosea*, mostrando a proximidade entre essas duas espécies, e um terceiro grupo com *G. gigantea*. Aqui foram encontrados dois grupos dentro de *Gigaspora*: um formado por dois isolados de *G. margarita* e outro dividido em dois subgrupos; um com *G. gigantea* e outro com *G. albida*, *G. rosea* e o isolado *G. margarita* BR 444. Vale salientar que observações morfológicas e dados moleculares (Bago et al. 1998) indicam que o isolado *G. margarita* BR 444 seja na verdade *G. albida*. Ainda de acordo com Bago et al. (1998) esse isolado teria sido identificado posteriormente como *G. albida*, entretanto, o material recebido estava identificado como *G. margarita*. Trabalho está em curso para definir a identidade desse e de outros isolados de *Gigaspora* e dados referentes a esse estudo serão oportunamente disponibilizados.

Os dados de filogênese aqui obtidos, juntamente com aqueles de Bago et al. (1998) parecem contrariar os resultados de Schwarzott et al. (2001), pois a árvore filogenética obtida por esses autores, a partir de seqüências de SSU rDNA, mostra *G. margarita* no mesmo grupo de *G. albida* e *G. gigantea*. Vale salientar entretanto, que Lanfranco et al. (2001), trabalhando com a caracterização morfológica e molecular de espécies de *Gigaspora*, relataram erro na identificação da *G. margarita* usada no trabalho de Schwarzott et al. (2001), sendo este isolado reidentificado como *G. rosea*. A discriminação de espécies em *Gigaspora*, a partir de dados morfológicos, pode ser difícil; além disso, apenas a partir de dados morfológicos não é possível relacionar filogeneticamente as espécies de *Gigaspora*, devido a pouca quantidade de caracteres informativos e à presença de um único padrão ontogenético (Bentivenga & Morton, 1995).

As relações entre as espécies de *Gigaspora* parecem ser claramente mostradas a partir da seqüência 2. Apesar de curta, acredita-se que essa seqüência possa ser usada para complementar os dados obtidos a partir das seqüências de SSU nrDNA, para melhor entendimento da filogênese na família Gigasporaceae.

Dados suplementares serão necessários para confirmar os resultados aqui encontrados e a utilização de outros genes parece ser o caminho para uma nova visão filogenética do grupo.

Referências

- Bago B, Bentivenga SP, Brenac V, Dodd JC, Piché Y, Simon L (1998) Molecular analysis of *Gigaspora* (Glomales, Gigasporaceae). *New Phytol* 139: 581-588
- Bentivenga SP, Morton JB (1995) A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 719-731
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P, Perotto S (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to Gigasporaceae. *Appl Environ Microbiol* 66: 4503-4509
- Binder M, Hibbett DS (2002) Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 22: 76-90
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC (2001) Inter- and intra-isolates rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol* 149: 539-554
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974) The Endogonaceae of the Pacific Northwest. *Mycol Mem* 5: 1-76
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996) *Molecular Systematics*. 2^o ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland
- Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P (2001) A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytol* 152:169-179

- Moncalvo JM, Drehmel D, Vilgalys R (2000) Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Mol Phylogenet Evol* 16: 48-63
- Morton JB (1990) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207
- Morton JB, Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491
- Morton JB, Redecker D (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DWII (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News* 4: 1-4
- Philippe H, Germot A, Moreira D (2000) The new phylogeny of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 10: 596–601
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000). Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92: 282-285
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000b) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276–284
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Mol Phylogenet Evol* 21: 190-197
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421

- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. 2° ed. Academic Press, London
- Souza FA, Silva EMR (1996) Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: Siqueira JO, (ed) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. UFLA/DCS e DCF, Lavras pp 255-290
- Swofford DL (1998) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony *(and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Thaxter R (1922) A revision of the Endogonaceae. *Proc Am Acad Arts Sci* 57: 291-351
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 24: 4876-4882
- Walker C (1992) Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322
- Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K (2001) Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiol Letts* 200: 241-246

Tabela 1. Procedência dos isolados de Glomeromycota utilizados nas análises filogenéticas.

Espécie	Código	Origem	Curador
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	FL 927	ND	L.C. Maia
<i>Gigaspora albida</i>	BR 601	Brasil	J. Morton
<i>Gigaspora gigantea</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	MN 414D	EUA	J. Morton
<i>Gigaspora gigantea</i>	NC 150	EUA	J. Morton
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	BR 444	Brasil	J. Morton
<i>Gigaspora margarita</i>	BEG 34	Nova Zelândia	P. Bonfante
<i>Gigaspora margarita</i>	MAFF 52	Japão	M. Saito
<i>Gigaspora rosea</i> Nicol. & Schenck	UT 102	EUA	J. Morton
<i>Gigaspora rosea</i>	BR 151A	Brasil	J. Morton
<i>Gigaspora rosea</i>	MAFF 62	Japão	M. Saito
<i>Glomus clarum</i> Nicol. & Schenck	UFPE 08	Brasil	L.C. Maia
<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	UFPE 19	Brasil	L.C. Maia

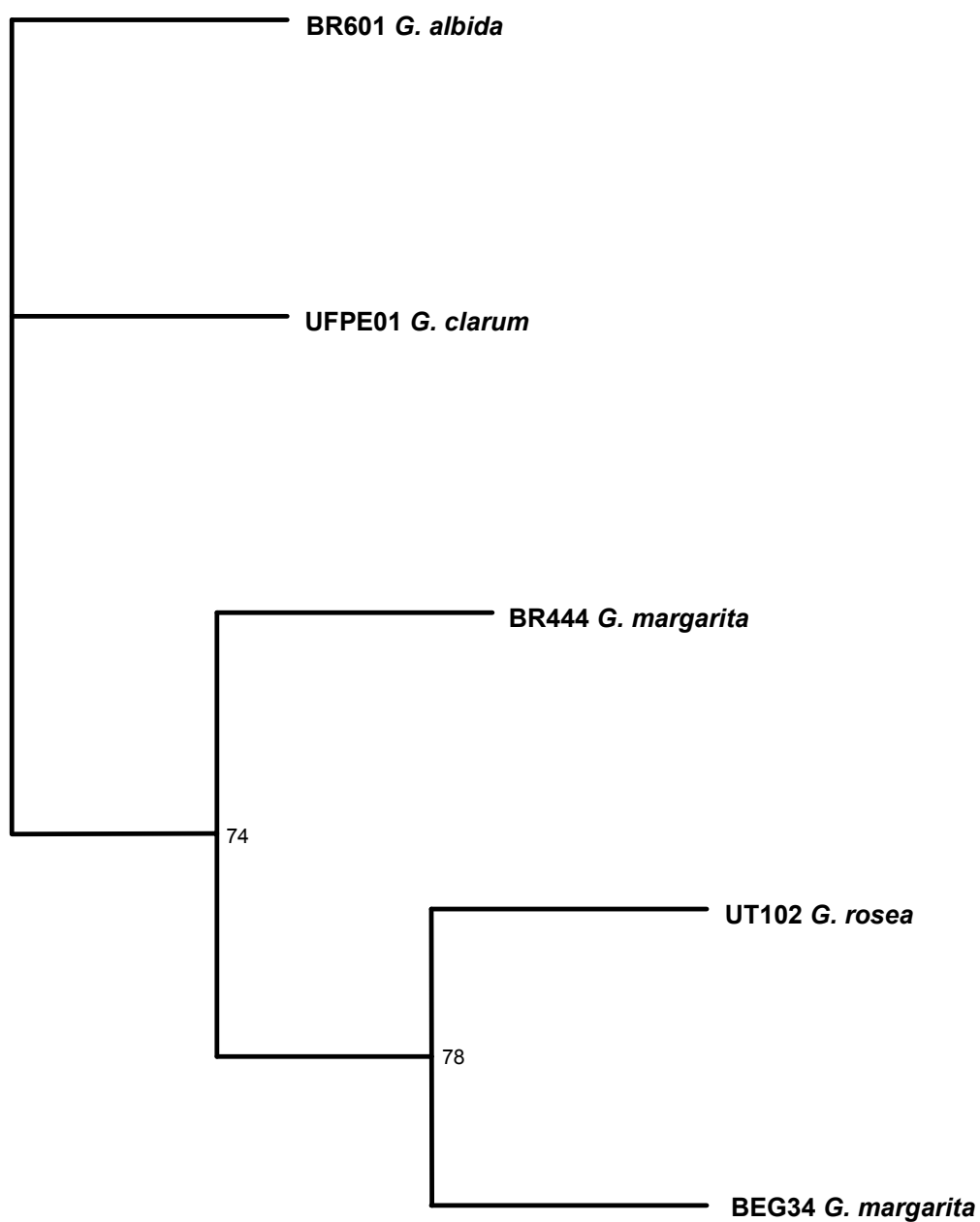


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir de análises de parsimônia de seqüências do 23s rDNA mitocondrial. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 1000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 400bp.

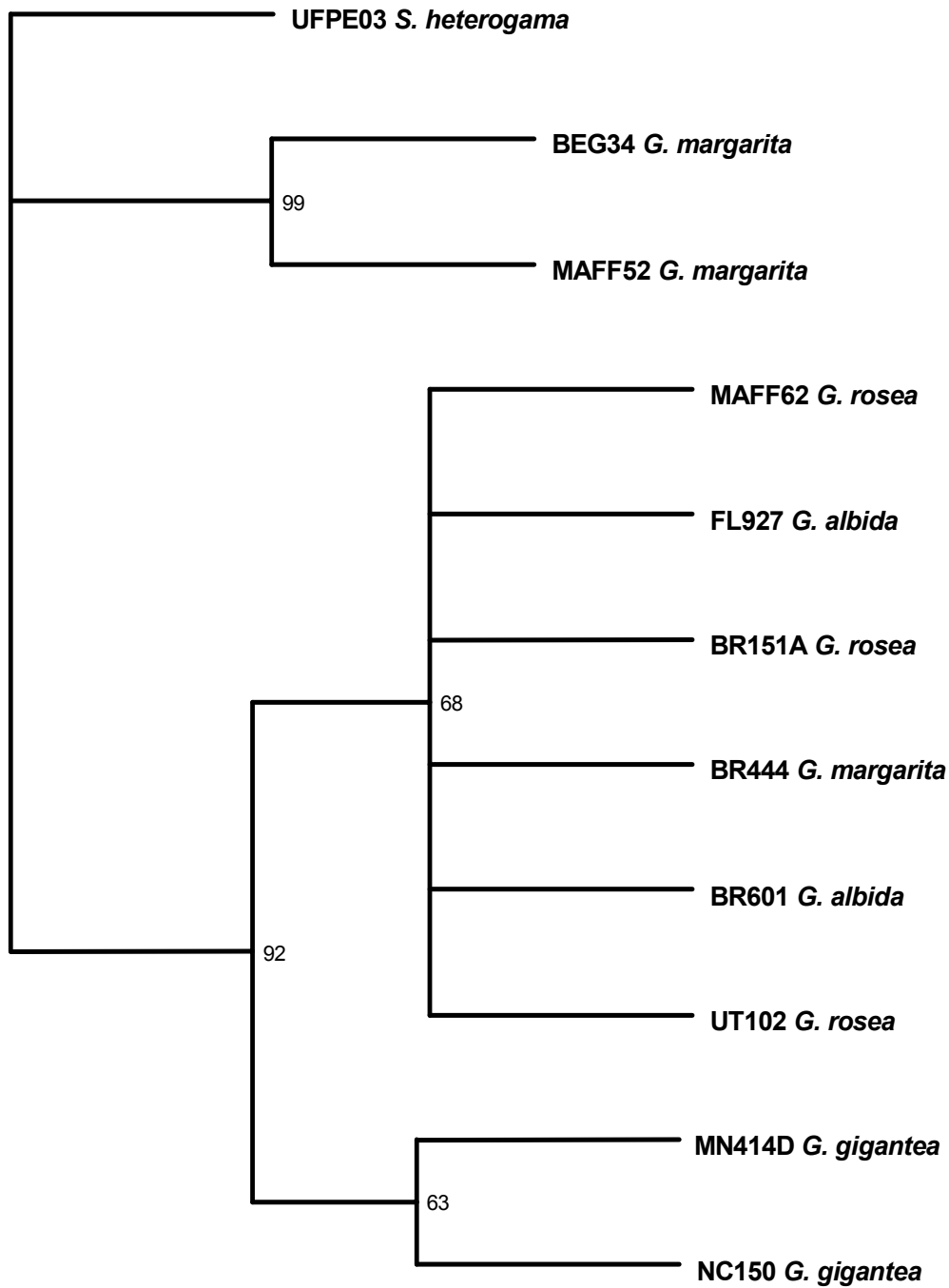


Figura 2. Árvore filogenética obtida a partir de análises de parsimônia de possíveis seqüências mitocondriais. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 1000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 250bp.

CAPÍTULO 5

Resolução de conflitos na identificação de espécies de *Gigaspora* Gerd. & Trappe (Glomeromycota) a partir de primers espécie- específicos e análises filogenéticas de seqüências de rDNA

Artigo a ser enviado ao periódico Mycorrhiza

Gladstone Alves da Silva · Erica Lumini · Valeria Bianciotto · Leonor Costa Maia · Paola Bonfante

Resolução de conflitos na identificação de espécies de *Gigaspora* Gerd. & Trappe (Glomeromycota) a partir de primers espécie-específicos e análises filogenéticas de seqüências de rDNA

G.A. Silva · L.C. Maia

Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n. 50670-420 Recife, PE, Brasil. Fone: +55 81 32718865. Fax: +55 81 32718482.
e-mail: leonorcmaia@yahoo.com.br

Erica Lumini · Valeria Bianciotto · Paola Bonfante

Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università e Istituto per la Protezione delle Piante (Sezione di Torino) del CNR – Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino, Italy.

Resumo Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) possuem cerca de 157 espécies, identificadas a partir de características morfológicas do esporo. Devido às dificuldades para diagnóstico dos táxons destes fungos, pesquisadores têm sugerido métodos alternativos de identificação, entre os quais se destaca a construção de primers espécie-específicos. Neste trabalho a identidade de duas espécies de FMA, apresentando problemas na identificação morfológica, foi resolvida a partir do uso de primers espécie-específicos e análise filogenética de seqüências de SSU e LSU rDNA. Dezenove táxons de Gigasporaceae foram analisados e os dados também revelaram que *Scutellospora* seria possivelmente um gênero polifilético, ocupando posição basal em relação à *Gigaspora*, como sugerido por outros autores.

Palavras-chave: Filogenia, seqüências ribossomais, micorriza arbuscular, Glomeromycota, primers.

Abstract The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) include 157 species that have often been identified by morphological characteristics of the spore. Due to the difficulties found for diagnostic of taxa of these fungi, researchers have proposed, among the new alternatives for identification, the construction of primers species-specific. In this work the identity of two AMF species, with problems for morphological identification was solved using species-specific primers and phylogenetic analysis SSU rDNA sequences. Nineteen taxa of Gigasporaceae were analysed and the data also indicated that *Scutellospora* probably is a poliphyletic group, with basal position in relation to Gigaspora, as suggested by other authors. Key-words: phylogenesis, ribosomal sequences, arbuscular mycorrhiza, Glomeromycota, primers.

Introdução

Atualmente existem descritas (Kirk et al., 2001) cerca de 157 espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Esse número é pequeno para um filo inteiro, considerando a estimativa de que existem mais de 2500 táxons a serem descobertos (Morton et al. 1995). A identificação desses fungos, ao nível específico, não é fácil e a experiência do pesquisador é um dos requisitos para realizá-la corretamente (Bentivenga e Morton 1994). O esporo é praticamente a única estrutura que fornece as características necessárias à identificação dos FMA, porém este deve ser avaliado em bom estado para a correta visualização de suas características (Morton 1993).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os FMA a partir de métodos mais simples, que exijam menos experiência do taxonomista. Outra razão para a busca de métodos alternativos é a necessidade de se identificar corretamente, não só o fungo que está na rizosfera, mas o que está colonizando o hospedeiro. Assim, Abbott (1982) mostrou que a partir das estruturas vegetativas dos FMA nas raízes, era possível identificar ao menos os gêneros desses fungos. Entretanto, esse método de identificação não é frequentemente usado, pois, apesar de fornecer uma noção sobre o fungo que está colonizando a raiz da planta, exige metodologia menos prática que a tradicional e não funciona para o nível específico.

Métodos moleculares têm sido chave para abordagens ecológicas e pesquisadores têm usado análises de DNA através de perfis eletroforéticos (Wyss e Bonfante 1993), comparação de seqüências (Helgason et al. 1998; Daniell et al. 2001; Husband et al. 2002a; 2002b) e construção de primers espécie-específicos (Lanfranco et al. 1995; 1999; 2001; Millner et al. 1998; 2001a; 2001b; Redecker 2000) para a identificação dos FMA.

As vantagens da utilização de primers espécie-específicos são a identificação exata ao nível de espécie, principalmente aquelas apresentando conflitos morfológicos, e a

possibilidade de trabalho com esporos ou raízes colonizadas, determinando quais fungos estão participando ativamente da simbiose. Entretanto, o número de espécies para as quais esses primers foram desenhados ainda é muito baixo e não permite uma abordagem ecológica completa da diversidade de FMA.

Os trabalhos de filogênese têm dado mais atenção a Glomeraceae. Esta família apresenta o maior número de espécies de FMA e é atualmente considerada polifilética (Schüßler et al. 2001). Entretanto, alguns problemas acerca da posição dos gêneros em Gigasporaceae também vêm sendo discutidos. Os dados de Morton (1990) indicaram que *Gigaspora* ocuparia posição basal em relação a *Scutellospora*. Esses resultados foram suportados por observações ontogenéticas (Franke e Morton 1994; Bentivenga e Morton 1995; Morton 1995) e perfil de ácidos graxos (Bentivenga e Morton 1996). Por outro lado, de acordo com dados moleculares, *Scutellospora* seria basal em relação a *Gigaspora* (Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000); entretanto, o uso de seqüências de SSU rDNA, não permitiu definir com clareza, qual dos gêneros estaria na base filogenética (Schwarzott et al. 2001).

Problemas para identificação específica são conhecidos em *Gigaspora* (Lanfranco et al. 2001). A variação morfológica no gênero é baixa, sendo os caracteres subcelulares e padrão ontogenético de formação do esporo rigorosamente os mesmos para todas as espécies do grupo (Bentivenga e Morton 1995). Assim, para identificar os representantes do gênero são usados apenas espessura da parede, diâmetro e cor do esporo. Primers espécie-específicos foram desenhados para *G. margarita* (Lanfranco et al. 1999) e *G. rosea* (Lanfranco et al. 2001). Esses primers mostraram eficiência na separação de espécies apresentando conflitos morfológicos. Assim, os objetivos desse trabalho foram os de verificar a identidade de dois isolados diagnosticados de forma confusa como *G. albida* e *G. margarita*, desenhar primer espécie-específico para *G. albida*, auxiliando o diagnóstico das espécies em estudo e avaliar filogeneticamente Gigasporaceae, a partir de seqüências de SSU e LSU rDNA.

Materiais e métodos

Fungos MA

Treze isolados, propagados em culturas-armadilha e pertencendo aos gêneros *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora* foram usados para extração de DNA e sequenciamento (Tab 1).

Extração de DNA

O DNA dos esporos foi extraído como descrito em Lanfranco et al. (2001), com algumas modificações que seguem: 10 a 50 esporos foram lavados em água destilada, sonicados de três a quatro vezes, macerados em 50-100 µl do tampão de reação de PCR da REDTaq (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂ e 0,01% gelly) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), centrifugados a 1000 RPM por 2 min e o sobrenadante incubado a 95°C por 13 min. Depois da extração, o DNA foi estocado a -20°C.

Desenho de primers, PCR e seqüenciamento

Para resolver conflitos na identificação morfológica de *G. albida*, um primer espécie-específico, ALB1 (5'-CCCAACTAAAAATACTTCAGTC-3'), foi desenhado para esta espécie a partir de seqüências ITS depositadas no GenBank (AJ239118.1). Este primer foi combinado com o GiITS1 (Lanfranco et al. 1999), amplificando um fragmento de 387pb. Para a identificação de *G. margarita* e *G. rosea* foram usadas as combinações dos primers GiITS1-GiITS2 (Lanfranco et al. 1999) e GiITS1-GiR3 (Lanfranco et al. 2001), respectivamente. Os primers empregados para amplificar uma região parcial do LSU rDNA, 28G1 (5'-CATGGAGGGTGAGAATCCCG-3') e 28G2 (5'-CCATTACG TCAACATCCTTAACG-3') foram desenhados a partir de seqüências de FMA já depositadas no GenBank. Para o SSU rDNA foram usados os primers: NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 e NS8 (White et al. 1990). As reações de PCR foram realizadas segundo Lanfranco et al. (2001), com algumas modificações nos parâmetros de ciclagem: 95°C 3 min (1 ciclo), 94°C 45s, 55°C 1 min, 72°C 1 min (40

ciclos), 72°C 7 min (1 ciclo). Os produtos amplificados foram purificados e diretamente seqüenciados.

Alinhamento das seqüências e análise filogenética

Para o alinhamento do SSU e LSU rDNA foram usadas seqüências de 30 e 17 isolados de FMA respectivamente, algumas das quais obtidas no GenBank (Tab 1). As seqüências foram alinhadas com o programa Clustalx (Thompson et al. 1997) e editadas usando o programa Genedoc (Nicholas et al. 1997).

Para avaliação filogenética e construção de árvores de cada uma das matrizes geradas, análises de máxima parcimônia (MP) e neighbor joining (NJ), com 1.000 e 10.000 bootstraps, respectivamente, foram usadas com o auxílio do programa PAUP* (Swofford 2002). Os índices de consistência (IC) e retenção (IR), para as análises de MP, e a extensão das árvores, também foram calculados pelo programa. *Glomus clarum* e *G. etunicatum* foram usados como grupo externo em todas as análises.

Resultados

Os isolados *G. albida* FL 927 e *G. margarita* BR 444 apresentaram características morfológicas similares a de outras espécies de *Gigaspora*, apresentando espessura de parede [9,6-(12,2)-14,4µm e 12-(13,9)-16,8µm, respectivamente] e diâmetro dos esporos [230-(282)-360µm e 250-(320)-384µm, respectivamente] com medidas que se sobrepõem às das demais espécies do gênero. Entretanto, os esporos eram hialinos/brancos a amarelos, não apresentando a típica coloração esverdeada (*G. albida*) ou rosada (*G. rosea*), observada nos isolados de referência *G. albida* BR 601 e *G. rosea* UT 102. *Gigaspora albida* BR 601 e todos os isolados de *G. margarita* apresentaram endobactérias; entretanto esses organismos estavam ausentes em todos os isolados de *G. rosea* e em *G. albida* FL 927. Devido a dificuldades no processo de coloração, não foi possível determinar se endobactérias estavam presentes em *G. gigantea*.

Teste de primers espécie-específicos para táxons de *Gigaspora*

Onze isolados de *Gigaspora* foram usados nos testes de primers espécie-específicos (Tab. 1). Para controle, o DNA de todos foi avaliado em reações de PCR, com a combinação de primers NS1-NS2 tendo apresentado resultados positivos. Os primers GiITS1-GiITS2 amplificaram apenas as espécies de *G. margarita*, à exceção do isolado *G. margarita* BR 444, que não amplificou (Fig. 1A). A combinação do primer espécie-específico construído para *G. rosea* (GiR3) com GiITS1 amplificou não apenas os isolados de *G. rosea*, mas *G. albida* FL 927 e também mostrou uma fraca reação ao DNA dos esporos de *G. albida* BR 601 e *G. margarita* BR 444 (Fig. 1B), enquanto o par de primers GiITS1-ALB1 amplificou apenas *G. albida* BR 601 e *G. margarita* BR 444 (Fig. 1C).

Análise filogenética de Gigasporaceae a partir de SSU rDNA

As análises de MP de SSU rDNA indicaram suporte de 100% nas análises de bootstrap para Gigasporaceae (Fig. 2). Algumas espécies de *Scutellospora* apresentaram-se em ramos basais na árvore, não formando clado único, como foi observado para *Gigaspora* com 93% de suporte. Neste último gênero, os isolados de *G. margarita* e *G. decipiens* formaram um clado com 60% de suporte, porém *G. margarita* BR 444 mostrou posição mais próxima a *G. rosea*, *G. albida* e *G. gigantea*, embora os isolados desses táxons não tenham formado grupos específicos.

Nas análises de NJ, Gigasporaceae também teve suporte de 100% de bootstrap (Fig. 3). *Scutellospora* apresentou dois ramos: um composto por *S. aurigloba*, *S. nodosa*, *S. projecturata* e *S. calospora* com suporte de 75% e outro mais próximo de *Gigaspora*, com as espécies restantes apresentando baixo suporte (51%). Em *Gigaspora* as relações foram confusas: os isolados de *G. margarita* e *G. decipiens* não formaram grupos e apenas os representantes de *G. gigantea* agruparam-se.

Análise filogenética de Gigasporaceae a partir de LSU rDNA

As análises de MP mostraram suporte de 100% para Gigasporaceae (Fig. 4). As espécies de *Scutellospora* foram basais em relação à *Gigaspora*, porém este último gênero teve baixos valores de bootstrap (54%). Em *Gigaspora* dois grupos foram observados: os isolados de *G. margarita*, à exceção de *G. margarita* BR 444, formaram um clado separado com 100% de suporte e outro clado foi formado contendo as outras espécies, contudo com valores de bootstrap baixos (50%).

Nas análises de NJ, Gigasporaceae apresentou suporte de 99% de bootstrap (Fig. 5). *Scutellospora* mais uma vez não formou um grupo monofilético e apresentou-se basalmente em relação à *Gigaspora*. Dois ramos foram observados neste último gênero, um com os representantes de *G. margarita*, exceto *G. margarita* BR 444, e outro ramo com as demais espécies.

Discussão

O uso de primers espécie-específicos indicou erros na identificação dos isolados *G. margarita* BR 444 e *G. albida* FL 927. Os resultados mostraram que esses isolados devem ser renomeados como *G. albida* e *G. rosea*, respectivamente. Em *Gigaspora*, as espécies são separadas apenas com base na espessura da parede, diâmetro e cor dos esporos. A sobreposição dessas características e a ausência de caracteres que definam com segurança os táxons no gênero têm dificultado bastante a identificação. Os dados para *G. margarita* BR 444 também foram suportados pelas análises filogenéticas, onde esse isolado não formou grupo com os outros indivíduos da mesma espécie em nenhuma das árvores. A partir de seqüências de SSU rDNA, Bago et al. (1998) observaram que esse isolado apresentou o mesmo grupo de seqüências registrado em espécies de *G. albida* e que *G. margarita* BR 444 teria sido identificado posteriormente como *G. albida*. Entretanto, recebemos o material como *G. margarita* e verificamos que, na atual base de dados do INVAM, esse isolado continua a ser diagnosticado como tal.

Endobactérias são sempre observadas em espécies de *Gigaspora*, à exceção dos isolados de *G. rosea* observados até o momento. *Gigaspora albida* FL 927 não apresentou essas bactérias, o que pode ser mais um indício de que esse isolado seria na verdade *G. rosea*.

Dezenove espécies de Gigasporaceae (mais da metade da família) foram usadas nas análises filogenéticas. Gigasporaceae se apresentou como grupo monofilético em todas as árvores; porém, não houve suporte para *Scutellospora* como um único clado. Essa indicação reforça observações prévias de Kramadibrata et al. (2000), os quais consideraram que, no futuro, quando mais seqüências forem usadas nas análises, os caminhos evolutivos em *Scutellospora* poderão ser desvendados. Como o gênero vem se apresentando como grupo polifilético, duas modificações poderão ser feitas; ou *Scutellospora* será subdividido ou Gigasporaceae será uma família monogenérica, incluindo-se novamente as espécies de *Scutellospora* em *Gigaspora*. Embora essa última indicação pareça remota, uma vez que a separação morfológica dos dois gêneros é bem sólida e apenas nas análises de MP de LSU rDNA *Gigaspora* formou um clado com baixos valores de bootstrap (54%), ela deve ser considerada.

Todas as árvores geradas demonstraram que algumas espécies de *Scutellospora* são basais em relação à *Gigaspora*. Isso indicaria uma evolução seguida de perda de caracteres dentro da família, contrariando o observado em trabalhos anteriores (Morton 1990; 1995; Franke e Morton 1994; Bentivenga e Morton 1995; 1996). Entretanto, outros trabalhos de filogênese a partir de seqüências de SSU rDNA já apontavam essas evidências (Simon et al. 1993; Kramadibrata et al. 2000), embora algumas dúvidas ainda existam sobre essas relações. Em Lanfranco et al. (2001) foi observada clara definição entre os gêneros, a partir de análises de seqüências parciais de SSU rDNA e ITS; possivelmente a baixa quantidade de espécies de *Scutellospora* utilizadas nessas análises tenha obscurecido as relações entre os gêneros.

Apesar dos dados indicarem o agrupamento das espécies de *Gigaspora* e mostrarem que *Scutellospora* seria basal a este gênero, alguns grupos não parecem consistentes. As análises de NJ de SSU rDNA mostraram o agrupamento de *S. projecturata*, *S. aurigloba*, *S. calospora* e *S. nodosa* suportadas por 75% de bootstrap, enquanto nas análises de MP estas espécies não formam clado. As análises de NJ e MP de LSU rDNA mostraram *S. pellucida* e *S. castanea* em um mesmo clado, entretanto essas espécies encontram-se em posições completamente diferentes nas análises de SSU rDNA. O baixo número de táxons de *Scutellospora* utilizado para as análises filogenéticas do fragmento de LSU rDNA pode ter interferido no agrupamento das espécies.

De acordo com Bago et al. (1998), *Gigaspora* pode ser dividida em três grupos subgenéricos, um contendo *G. margarita* e *G. decipiens*, outro composto por *G. albida* e *G. rosea* e o último formado apenas por *G. gigantea*. Entretanto os resultados aqui obtidos dão suporte a dois grupos, um formado por *G. margarita* e *G. decipiens* (apenas SSU rDNA) e outro com o restante das espécies do gênero.

Os dados indicam que *Scutellospora* deve ser considerado definitivamente como gênero basal em relação a *Gigaspora*. Entretanto, outros estudos são necessários para verificar o possível polifiletismo desse grupo. Técnicas moleculares têm ajudado no diagnóstico de espécies em *Gigaspora* e devem ser incorporadas para resolver os conflitos na identificação dos táxons desse gênero.

Referências

- Abbott LK (1982) Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. Aust J Bot 30: 485-499
- Bago B, Bentivenga S, Brenac V, Dodd JC, Piche Y, Simon L (1998) Molecular analysis of *Gigaspora* (Glomales, Gigasporaceae). New Phytol 139: 581-588

- Bentivenga SP, Morton JB (1994) Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. In: Pflieger FL, Linderman RG (Eds) Mycorrhizae and Plant Health. APS Press, St. Paul, pp 283-308
- Bentivenga SP, Morton JB (1995) A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 719-731
- Bentivenga SP, Morton JB (1996) Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5659-5662
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 203-209
- Franke M, Morton JB (1994) Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. *Can J Bot* 72: 122-134
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 384: 431
- Husband R, Herre EA, Young JPW (2002a) Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 131-136
- Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002b) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Mol Ecol* 11: 2669-2678
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th edition. CAB International, Oxon.
- Kramadibrata K, Walker C, Schwarzott D, Schüßler A (2000) A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann Bot* 86: 21-27

- Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, Bonfante P (1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Ecol* 4: 61-68
- Lanfranco L, Delpero M, Bonfante P (1999) Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol Ecol* 8: 37-45
- Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P (2001). A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytol* 152: 169-179
- Millner PD, Mulbry WW, Reynolds SL, Patterson CA (1998) A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 8: 19-27
- Millner PD, Mulbry WW, Reynolds SL (2001a) Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. *Mycorrhiza* 10: 259-265
- Millner PD, Mulbry WW, Reynolds SL (2001b) Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of two ancient endomycorrhizal fungi, *Glomus occultum* and *Glomus brasilianum*. *FEMS Microbiol Letts* 196: 165-170
- Morton JB (1990) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207
- Morton JB (1993) Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* 2: 97-109
- Morton JB (1995) Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87: 127-137

- Morton JB, Bentivenga SP, Bever J (1995) Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Bot* 73 (Suppl. 1): 25-32
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DWII (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News* 4: 1-4
- Redecker D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276-284
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is non-monophyletic. *Mol Phylogenet Evol* 21: 190-197
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony *(and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 24: 4876-4882
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322

Wyss P, Bonfante P (1993) Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol Res* 97: 1351-1357

Tabela 1. Origem dos isolados de Glomeromycota utilizados nos testes de primers espécie-específicos e nas análises filogenéticas.

Espécimes*	Código	País	Fonte	18s	28s
<i>Gigaspora albida</i> 1 Schenck & Smith #	BR 601	Brasil	J. Morton	X	X
<i>G. albida</i> 2	FL 927	ND	J. Morton	Z14009.1	-
<i>G. albida</i> 3 #	FL 927	ND	L.C. Maia	X	X
<i>G. decipiens</i> Hall & Abbott	BEG 45	Austrália	BEG	U96146.1	-
<i>G. gigantea</i> 1 (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe #	MN 414D	EUA	J. Morton	X	X
<i>G. gigantea</i> 2 #	NC 150	EUA	J. Morton	X	X
<i>G. gigantea</i> 3	WV 932	EUA	INVAM	Z14010.1	-
<i>G. margarita</i> 1 Becker & Hall #	MAFF 52	Japão	M. Saito	X	X
<i>G. margarita</i> 2 #	MAFF 54	Japão	M. Saito	X	X
<i>G. margarita</i> 3 #	BEG 34	Nova Zelândia	P. Bonfante	-	X
<i>G. margarita</i> 4 #	BR 444	Brasil	J.Morton	X	X
<i>G. rosea</i> 1 Nicol. & Schenck #	UT 102	EUA	J. Morton	X	X
<i>G. rosea</i> 2 #	MAFF 62	Japão	M. Saito	X	-
<i>G. rosea</i> 3 #	BR 151 A	Brasil	INVAM	X	-
<i>G. rosea</i> 4	DAOM 194757	ND	ND	X58726.1	-
<i>G. rosea</i> 5	BEG 9	EUA	BEG	-	Y12075.1
<i>G. clarum</i> Nicol. & Schenck	UFPE 08	Brasil	L.C. Maia	X	X
<i>G. etunicatum</i> Becker & Gerd.	UFPE 06	Brasil	L.C.Maia	X	X

Continuação da tabela 1

Espécimes*	Código	País	Fonte	18s	28s
<i>Scutellospora. aurigloba</i> (Hall) Walker & Sanders	WUM 53	Alemanha	C. Walker	AJ276093.2	-
<i>S. callospora</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	BEG 32	Reino Unido	BEG	AJ306443.1	AJ510231.1
<i>S. castanea</i> Walker	BEG 01	França	BEG	AF038590.1	Y12076.1
<i>S. cerradensis</i> Spain & Miranda	MAFF 520056	Japão	M. Saito	AB041345.1	-
<i>S. dipapilosa</i> (Walker & Koske) Walker & Sanders	WV 929	ND	ND	Z14013.1	-
<i>S. fulgida</i> Koske & Walker	W 2993	Argentina	M.N. Cabello	AJ306435.1	-
<i>S. gilmorei</i> (Trappe & Herd.) Walker & Sanders	W 3085	EUA	C. Walker	AJ276094.2	-
<i>S. gregaria</i> (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders	LPA48	ND	ND	-	AJ510232.1
<i>S. heterogama 1</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	UFPE 19	Brasil	L.C. Maia	X	X
<i>S. heterogama 2</i>	BEG 35	EUA	BEG	AJ306434.1	-
<i>S. nodosa</i> Blaszkowski	W 3485	Inglaterra	C. Walker	AJ306437.1	-
<i>S. pellucida 1</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	WV 873	ND	INVAM	Z14012.1	-
<i>S. pellucida 2</i>	Scutpell 90	ND	ND	-	AF396784.1
<i>S. projecturata</i> Kramadibrata & Walker	W 3254	Indonésia	K. Kramadibrata	AJ242729.1	-
<i>S. spinosissima</i> Walker, Cuenca & Sanchez	W 3009	Venezuela	G. Cuenca	AJ306436.1	-
<i>S. weresubiae</i> Koske & Walker	W 2988	Argentina	M.N. Cabello	AJ306444.1	-

*Espécimes em negrito foram seqüenciadas neste trabalho. # espécies usadas nos testes com primers espécie-específicos; X seqüências ainda sem número no GenBank; ND não disponível

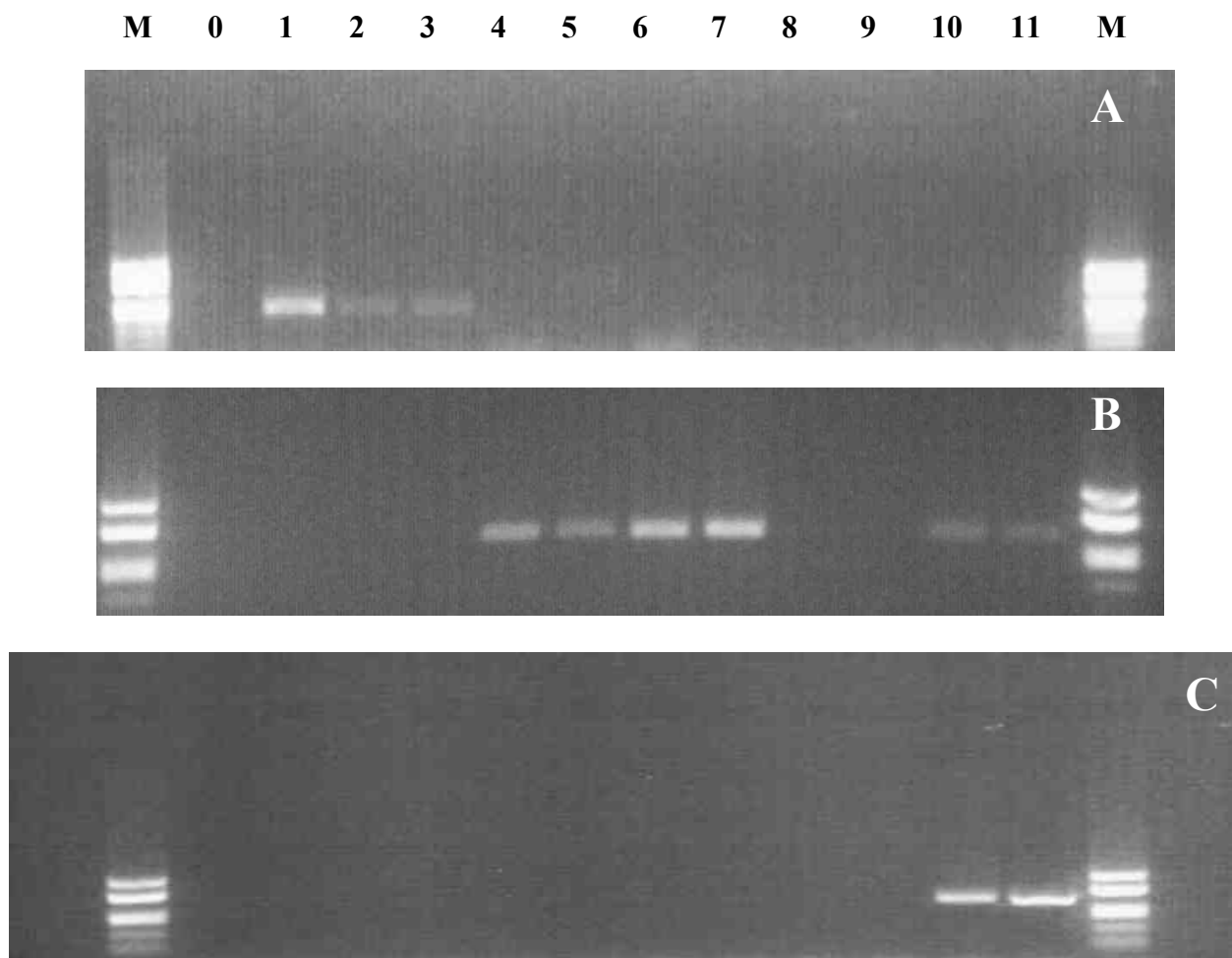


Figura 1. Gel de eletroforese com os produtos de PCR dos seguintes isolados: *Gigaspora margarita* (BEG 34, poço 1; Maff 54, poço 2; Maff 52, poço 3); *G. rosea* (BR 151A, poço 4; UT 102, poço 5; Maff 62, poço 6); *G. albida* FL 927, poço 7; *G. gigantea* (MN 414D, poço 8; NC 150, poço 9); *G. albida* BR 601, poço 10; *G. margarita* BR 444, poço 11. Diferentes combinações de primers foram usadas: A) GiITS1-GiITS2; B) GiITS1-GiR3; C) GiITS1-ALB1. M= pUC 18 digerido com *Hae* III. Poço 0= controle sem DNA.

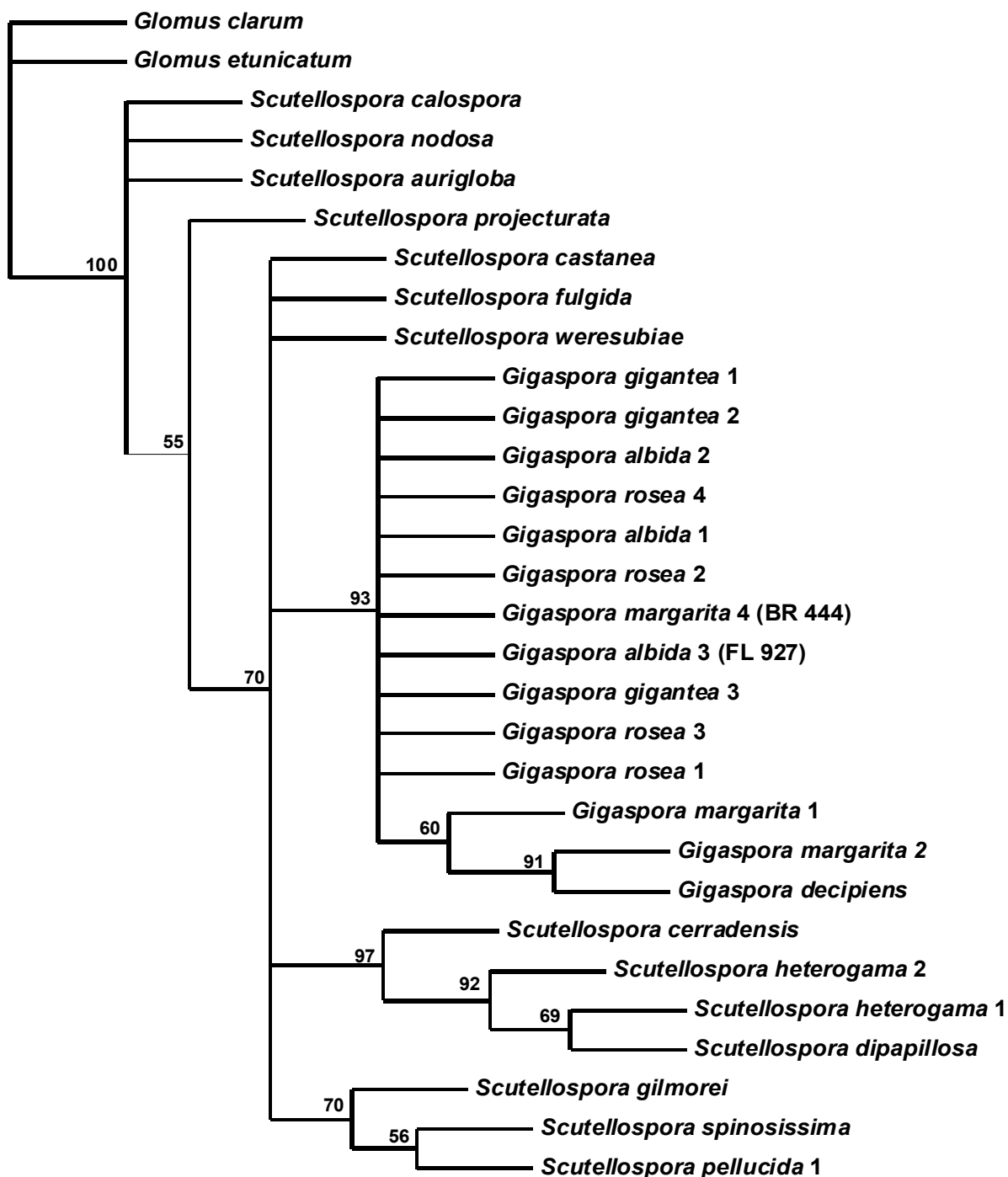


Figura 2. Árvore filogenética de Gigasporaceae obtida a partir de análises de máxima parcimônia de seqüências de SSU rDNA. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 1000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 1600bp. IC= 0,75; IR= 0,69; Extensão da árvore = 454 passos.

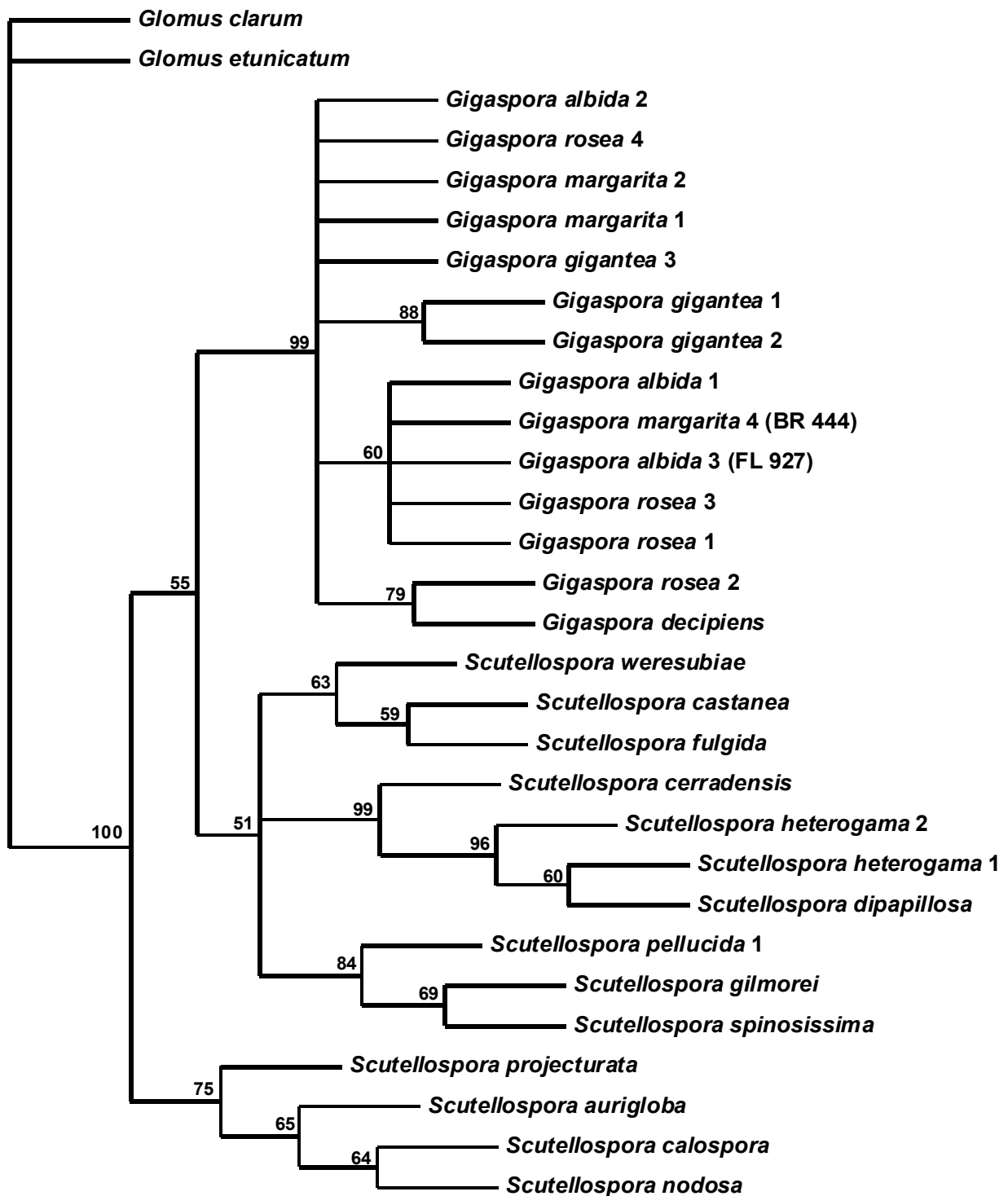


Figura 3. Árvore filogenética obtida a partir de análises de neighbor joining de seqüências parciais de SSU rDNA usando os parâmetros de Kimura (1980). Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 10000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 1600bp.

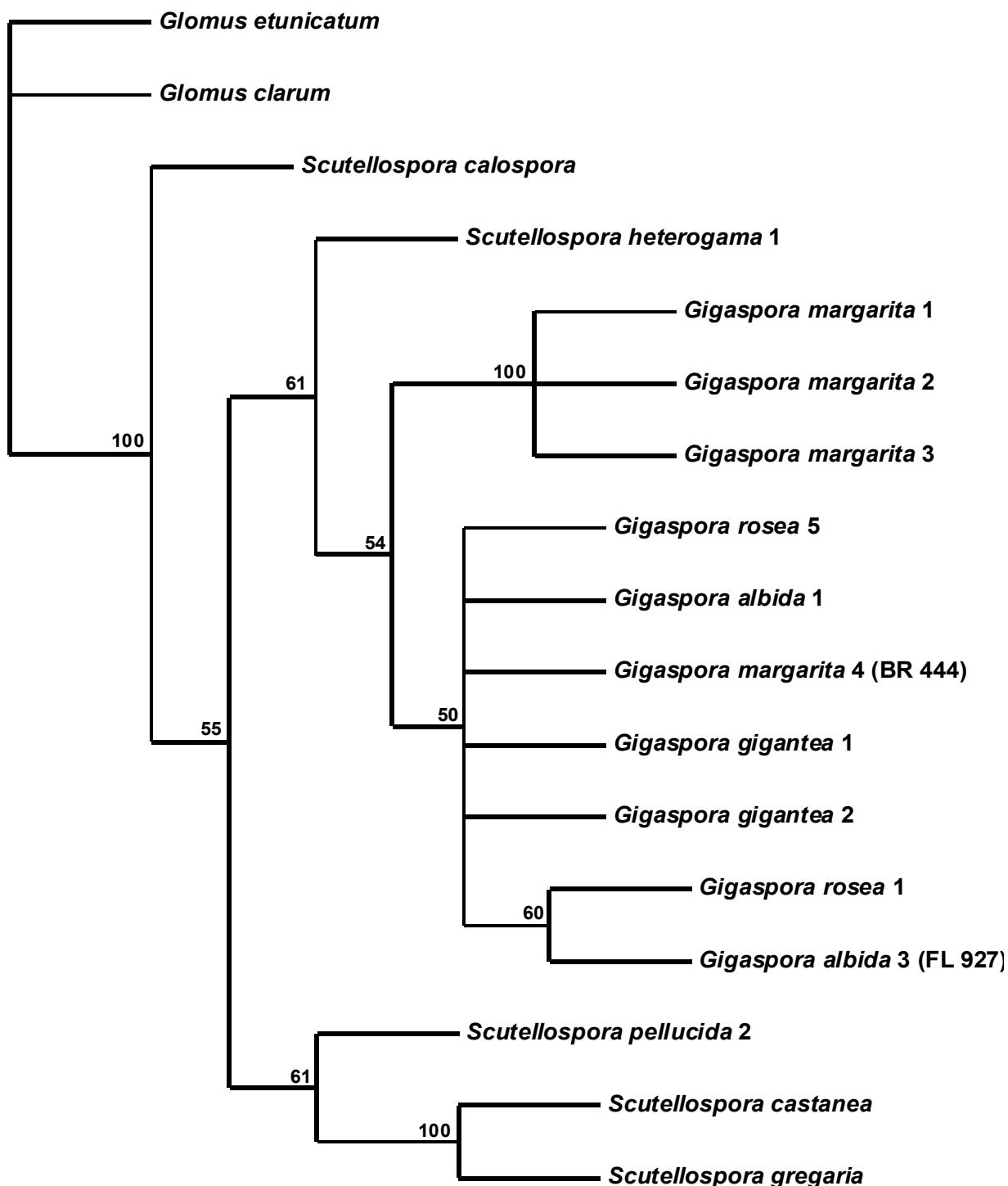


Figura 4. Árvore filogenética de Gigasporaceae obtida a partir de análises de máxima parcimônia de seqüências parciais de LSU rDNA. Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 1000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 600bp. IC= 0,81; IR= 0,65; extensão da árvore = 341 passos.

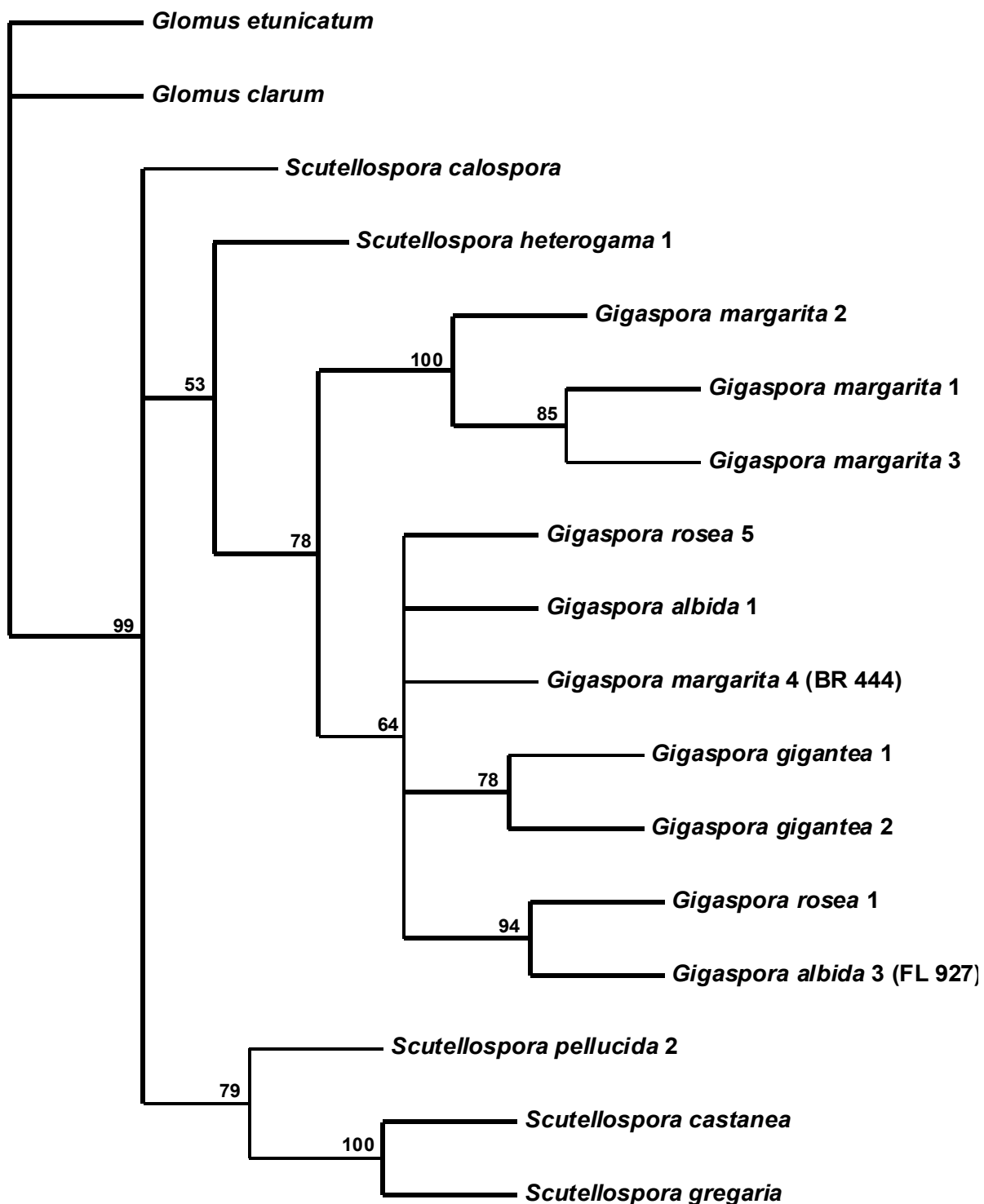


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir de análises de neighbor joining de seqüências parciais do LSU rDNA usando os parâmetros de Kimura (1980). Os números nos ramos indicam valores de bootstrap de 10000 replicatas. As seqüências correspondentes para esta árvore são de ~ 600bp.

CAPÍTULO 6

Chaves para identificação e tabelas comparativas entre espécies de Gigasporaceae - Glomeromycota

Artigo a ser enviado ao periódico Acta Botanica Brasílica

**CHAVES PARA IDENTIFICAÇÃO E TABELAS COMPARATIVAS ENTRE
ESPÉCIES DE GIGASPORACEAE - GLOMEROMYCOTA¹**

Gladstone Alves da Silva²

Leonor Costa Maia²

¹ Parte da tese de Doutorado do primeiro autor

² Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n. CEP 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Autor para correspondência: leonoremaia@hotmail.com

RESUMO – (Chaves de identificação e tabelas comparativas entre espécies de Gigasporaceae - Glomeromycota). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam associação mutualista com as plantas, fornecendo nutrientes minerais e recebendo, em troca, carboidratos. Esses fungos possuem cerca de 157 espécies e estão agrupados na divisão Glomeromycota. Gigasporaceae, uma das famílias de FMA, possui 37 espécies distribuídas em dois gêneros (*Gigaspora* e *Scutellospora*). A identificação dos FMA não é fácil e está baseada principalmente nas características morfológicas do esporo, por isso são necessários meios que ajudem a distinguir melhor os táxons. Este trabalho teve como objetivos gerar chaves dicotômicas e tabelas comparativas para espécies em Gigasporaceae. Trabalhos com as descrições originais, bem como aquelas disponíveis no INVAM, foram consultados para construção dessas chaves e tabelas. Não foi gerada uma chave para *Gigaspora* devido à impossibilidade de distinguir morfológicamente algumas espécies, mas uma tabela comparativa para separação dos táxons específicos foi elaborada. Foi construída uma chave para *Scutellospora* sendo que de 32 espécies, sete (*S. alborosea*, *S. gilmorei*, *S. minuta*, *S. nigra*, *S. reticulata*, *S. savanicola* e *S. tricalypta*) não foram incluídas por apresentarem descrições incompletas. Tabelas comparativas associadas a chaves dicotômicas ajudam na identificação de espécies em Gigasporaceae, e redescrições de algumas espécies devem ser feitas, tendo em vista a ausência de registros mais substanciados que auxiliem na definição de alguns táxons.

Palavras-chave – FMA, micorriza arbuscular, chave dicotômica, *Gigaspora*, *Scutellospora*.

ABSTRACT – (Keys for identification and tables for comparison between species of Gigasporaceae - Glomeromycota). The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form a mutualistic association with plants, providing mineral nutrients from the soil and receiving carbohydrates produced by the hosts. These fungi, which include almost 157 species are classified in a new phylum, Glomeromycota. Gigasporaceae, one of the AMF families, include 37 species in two genera (*Gigaspora* and *Scutellospora*). Identification of these fungi is not easy and have often been based on morphological characteristics of the spore; thus, new methods are needed to better distinguish the taxa. The aim of this work was to generate dichotomic keys and comparative tables for species of Gigasporaceae, and original descriptions, as well as those available at INVAM were used for that. A key for *Gigaspora* is not presented because it is impossible to morphologically distinguish some species, but a comparative table to help separation of taxa was organized. A key for *Scutellospora* was generated, but seven (*S. alborosea*, *S. gilmorei*, *S. minuta*, *S. nigra*, *S. reticulata*, *S. savanicola* e *S. tricalypta*), out of 32 species were not included because their descriptions are incomplete. Comparison tables together with dichotomic trees help identification of Gigasporaceae species, but redescriptions are needed considering the lack of more complete registers of characters for definition of species in this family.

Key-words – AMF, arbuscular mycorrhiza, dichotomic key, *Gigaspora*, *Scutellospora*.

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam a mais ampla e antiga simbiose entre plantas terrestres e fungos na natureza (Redecker *et al.* 2000). Esses organismos são capazes de aumentar a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas (Cooper & Tinker 1978), desempenhando importante papel no equilíbrio dos ecossistemas terrestres, atuando na definição de nichos ecológicos ocupados pelas plantas e na determinação da composição das comunidades vegetais (Francis & Read 1995).

Os FMA estão incluídos em Glomeromycota (Schüßler *et al.* 2001) e apresentam cerca de 157 espécies (Kirk *et al.* 2001). Para identificação desses fungos eram usados, principalmente, caracteres como formação de esporocarpos, presença de perídio, espessura da parede, cor e diâmetro do esporo, diâmetro da hifa de sustentação, presença de paredes internas no esporo, entre outros. Walker (1983) estabeleceu novos conceitos, considerando principalmente os diferentes tipos de “parede” do esporo na identificação. Além dos tipos de “parede” também são utilizadas algumas propriedades tais como espessura, pigmentação, ornamentação e reações histoquímicas que podem ser observadas em esporos quebrados (Bentivenga & Morton 1994). Muitos autores adotaram essa prática, descrevendo em detalhe a estrutura da parede de esporos de FMA, considerando-a composta por “paredes”, como proposto por Walker (1983) ou como uma unidade com camadas e sub-camadas (Maia *et al.* 1993).

Um novo padrão na descrição de espécies, baseado na ontogênese do esporo foi proposto (Franke & Morton 1994; Bentivenga & Morton 1995; Morton 1995; Stürmer & Morton 1997; 1999), levando em consideração dados com valores filogenéticos e não meramente fenéticos. Esses autores usaram metodologia completamente diversa daquela de Walker (1983) para designar as camadas de parede do esporo, que são divididas em dois principais grupos: parede estrutural e germinativa do esporo. Apesar de parecer mais complexo, o método que utiliza dados ontogenéticos, sem dúvida, é mais coerente e lógico.

Além da morfologia do esporo, estruturas vegetativas dos FMA podem ser usadas na identificação, porém funcionam no máximo ao nível genérico. Abbott (1982) descreveu em detalhe as diferentes conformações das estruturas somáticas em FMA. Esse método de identificação não é freqüentemente usado pelos taxonomistas pois, apesar de fornecer uma noção sobre o fungo que está colonizando a raiz da planta, é menos prático que o tradicional.

Embora o estudo taxonômico dos FMA tenha avançado, a identificação desses fungos, em nível específico, não é fácil, sendo necessária bastante experiência do pesquisador para realizá-la corretamente (Bentivenga & Morton 1994). Um grande problema encontrado é que muitas espécies

foram descritas antes da formulação dos conceitos taxonômicos atualmente utilizados e a necessidade de trabalhos de redescrição é inerente (Walker 1992). O único manual para identificação de espécies desse grupo foi elaborado por Schenck & Pérez (1990), passados mais de 10 anos encontra-se desatualizado, por não incorporar novas descrições e considerações taxonômicas mais recentes. Assim é de interesse que, para facilitar a identificação, novas metodologias e atualizações das descrições existentes sejam incorporadas ao estudo taxonômico do grupo.

Tendo em vista a carência de ferramentas que facilitem a identificação dos FMA, esse trabalho teve como objetivos gerar chaves dicotômicas e tabelas comparativas para a identificação de espécies em Gigasporaceae. A família, é uma das sete de Glomeromycota, e seus membros são caracterizados pela formação do esporo a partir de uma célula esporogênica, produção de células auxiliares e ausência de vesículas intra-radulares. O grupo possui 37 espécies pertencentes a dois gêneros: *Gigaspora* e *Scutellospora*. O primeiro, com apenas cinco espécies, distingue-se do segundo (32 espécies) pela ausência, nos esporos, de “paredes germinativas” e de placas germinativas.

Material e métodos

Para a descrição das espécies, construção das chaves e elaboração das tabelas comparativas foram usadas as descrições originais, trabalhos de redescrição dos táxons, bem como os dados disponíveis no site do INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>). As descrições do INVAM foram usadas sempre que possível, para melhor padronização dos dados. Todas as espécies de Gigasporaceae foram abordadas; entretanto, das 32 espécies de *Scutellospora* atualmente descritas, apenas 25 foram usadas na elaboração da chave para o gênero, pois as demais (*S. alborosea*, *S. gilmorei*, *S. minuta*, *S. nigra*, *S. reticulata*, *S. savanicola* e *S. tricalypta*) foram descritas antes do trabalho de Walker (1983) e não há redescrições disponíveis, o que dificulta a comparação dos caracteres. Além disso, não foi possível construir uma chave de identificação para as espécies de *Gigaspora*, pois as mesmas são estruturalmente idênticas (Bentivenga & Morton 1995), sendo identificadas apenas por características que geralmente se sobrepõe entre as espécies (diâmetro e cor do esporo, diâmetro da célula esporogênica e espessura da parede do esporo).

Foram considerados conceitos de ontogênese do esporo (Franke & Morton 1994; Bentivenga & Morton 1995 e Morton 1995) para atribuição de caracteres da parede. De acordo com tais conceitos, a parede do esporo estaria dividida em “parede estrutural” e “parede germinativa” (“spore wall” e “germinal wall” sensu Morton). Na primeira, as camadas da parede são contínuas com

aquelas encontradas na célula esporogênica; na segunda, a “parede germinativa” é formada independentemente e está ligada ao processo de germinação.

Os caracteres considerados para elaboração das chaves e tabelas foram: diâmetro e cor do esporo, espessura da parede do esporo, diâmetro da célula esporogênica, presença de ornamentação na “parede estrutural” do esporo, número de “paredes germinativas”, reação das “paredes estrutural e germinativa” em Melzer, presença de camada amorfa e/ou “beaded” na “parede germinativa” e tipo de placa germinativa.

Para a descrição das espécies, foram usados os conceitos de ontogênese do esporo adotados para Gigasporaceae (Franke & Morton 1994; Bentivenga & Morton 1995 e Morton 1995).

Resultados e discussão

Apesar de *Gigaspora* ter apenas cinco espécies, são relatados problemas de identificação (Lanfranco *et al.* 2001). Isso ocorre porque existe pouca variação morfológica para a separação segura dos representantes do gênero, sendo os caracteres subcelulares e padrão ontogenético de formação do esporo rigorosamente os mesmos para todos os táxons do grupo (Bentivenga & Morton 1995). As espécies de *Gigaspora* foram separadas apenas com base na cor, diâmetro do esporo e da célula esporogênica (Tab. 1). Essas características variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do esporo e a sobreposição das mesmas é praticamente inevitável. No diâmetro do esporo existe uma sobreposição de 20 µm entre as espécies, assim, no mínimo 20 esporos devem ser observados, sendo considerada a média obtida para esse caráter.

Em *Scutellospora* pode ser observada maior variação dos caracteres subcelulares e as espécies foram separadas com maior segurança (Tab. 2). Apesar disso, alguns táxons são muito similares e as diferenças entre eles são quase imperceptíveis. *Scutellospora calospora* é muito semelhante a *S. dipurpurascens*; a única diferença entre essas espécies reside na primeira “parede germinativa”: *S. calospora* apresenta duas camadas, enquanto *S. dipurpurascens* apresenta apenas uma. Essa característica, entretanto, é muito difícil de ser observada e requer muita experiência prática por parte do pesquisador.

Duas chaves foram geradas para *Scutellospora*; na primeira, o principal critério usado para a separação das espécies foi presença ou não de ornamentação e na segunda, foi o número de “paredes germinativas”. A maioria dos táxons desse gênero apresenta uma ou duas dessas “paredes”. Normalmente cada “parede” é composta por duas camadas; assim, dependendo do número de camadas, é possível determinar quantas “paredes germinativas” existem. A posição da placa

germinativa também pode ser usada na determinação do número de “paredes germinativas”. Essa estrutura sempre se localiza sobre a “parede” mais interna; portanto, havendo mais de uma camada flexível acima da placa germinativa é praticamente certo que existem duas ou mais “paredes”. A utilização do reagente de Melzer também ajuda na interpretação e na individualização das camadas, pois algumas coram diversamente (com maior ou menor intensidade) ou não apresentam reação.

Uma camada flexível na “parede estrutural” do esporo tem sido detectada em algumas espécies (Spain & Miranda 1996), embora seja frequentemente confundida com aquelas encontradas na “parede germinativa”; observações mais acuradas mostraram que tem continuidade com a parede da célula esporogênica. Essa camada é mais facilmente observada em *S. cerradensis* e embora ocorra em outras espécies (*S. heterogama*, *S. pellucida* e *S. rubra*), nestas é de difícil detecção; na chave está sendo usada como um dos critérios para separação entre *S. cerradensis* e *S. nodosa*.

Diferentes tipos de ornamentação também podem ser empregados na distinção entre espécies, embora não tenham sido avaliados como caráter primordial na elaboração das chaves. *Scutellospora spinosissima* pode ser distinguida facilmente dos outros táxons pela densa ornamentação espinhosa (Walker *et al.* 1998), bem como *S. projecturata*, que forma parede com longas projeções (2-4 μ m) no esporo (Kramadibrata *et al.* 2000). Outras espécies como *S. biornata*, *S. cerradensis*, *S. coralloidea*, *S. crenulata*, *S. dipapilosa*, *S. gregaria*, *S. heterogama*, *S. nodosa*, *S. persica* e *S. verrucosa* apresentam ornamentações mais discretas, com a superfície do esporo apresentando pequenas projeções, que diferem em densidade, comprimento e espessura. Koske & Walker (1985) fizeram descrições detalhadas de seis espécies com superfície rugosa, espinulosa ou verrucosa, elaborando uma chave para distinguir os táxons a partir dos tipos de ornamentação.

A cor foi um critério pouco explorado na elaboração das chaves de *Scutellospora*. Embora seja bastante útil na separação de algumas espécies, esse caráter é extremamente variável, dependendo do estágio de desenvolvimento do esporo ou de condições ambientais.

Não foi o objetivo elaborar descrições detalhadas das espécies, ou fornecer conhecimentos básicos sobre caracteres usados na identificação em Gigasporaceae. Entretanto recomenda-se a utilização de descrições originais para facilitar a correta identificação, bem como o estudo dos conceitos básicos para identificação morfológica desses fungos. Atualmente estão disponíveis descrições detalhadas e bem ilustradas de 19 espécies de Gigasporaceae no site do INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>). Descrições de outras espécies podem ser consultadas nos trabalhos originais ou no manual para identificação de FMA (Schenck & Pérez 1990). Os tradicionais conceitos e caracteres usados na identificação de FMA são extensamente descritos por Morton (1988). Descrições detalhadas sobre a ontogênese e conceitos de

desenvolvimento em esporos de Gigasporaceae também estão disponíveis (Franke & Morton 1994; Bentivenga & Morton 1995; Morton 1995).

O uso de chaves e tabelas comparativas tem como objetivo facilitar o trabalho do pesquisador na identificação de espécies de determinado táxon; entretanto, deve-se salientar que para correta utilização das mesmas, conhecimentos básicos sobre a taxonomia do grupo são essenciais.

Chave para espécies de *Scutellospora*

(“paredes germinativas” como principal critério de separação)

1. Uma “parede germinativa” 2
 2. Superfície do esporo lisa 3
 3. Esporos hialinos a creme escuro; célula esporogênica 20-27µm diâm. *S. fulgida*
 3. Esporos amarelados a amarelo-marrons; célula esporogênica 35-51µm diâm. 4
 4. “Parede germinativa” positiva em Melzer e com camada amorfa *S. arenicola*
 4. “Parede germinativa” negativa em Melzer e sem camada amorfa *S. castanea*
 2. Superfície do esporo ornamentada 5
 5. “Parede germinativa” positiva em Melzer, com camada “beaded” 6
 6. “Parede germinativa” sem camada amorfa *S. biornata*
 6. “Parede germinativa” com camada amorfa *S. crenulata*
 5. “Parede germinativa” negativa em Melzer, sem camada “beaded” 7
 7. Esporo < 200µm diâm.; “parede estrutural” do esporo com 3 camadas; superfície dos esporos com curtas “verrugas” e longas projeções retas 4-10µm de alt. .. *S. dipapillosa*
 7. Esporo > 200µm diâm.; “parede estrutural” do esporo com 2 camadas; superfície dos esporos com “verrugas” sem longas projeções retas 8
 8. “Parede estrutural” negativa em Melzer *S. coralloidea*
 8. “Parede estrutural” positiva em Melzer 9
 9. Célula esporogênica 35-46µm diâm.; superfície dos esporos com projeções verrucosas de até 0,5µm espess. por 0,2-0,5µm alt. *S. persica*
 9. Célula esporogênica > 50µm diâm.; superfície dos esporos com projeções verrucosas com mais de 0,5µm espess. e 0,5µm alt. 10

10. Esporos 380-520 μ m diâm.; avermelhados a vermelho-marrons; superfície dos esporos com projeções verrucosas com 11-26 μ m espess. por 3-7 μ m alt.....
.....***S. gregaria***
10. Esporos 220-360 μ m diâm.; cor de palha pálido a laranja-marrom; superfície dos esporos com projeções verrucosas com 0,5-1,0 μ m espess. por 0,5-1,2 μ m alt....
.....***S. verrucosa***
1. Duas ou mais “paredes germinativas” 11
11. Duas “paredes germinativas” 12
12. Superfície do esporo lisa 13
13. “Parede germinativa” sem camada amorfa 14
14. 1^a “parede germinativa” com uma camada ***S. auriglobosa***
14. 1^a “parede germinativa” com duas camadas 15
15. Esporo laranja-marrom a vermelho escuro; célula esporogênica 18-35 μ m diâm.; parede do esporo 7-12 μ m espess..... ***S. rubra***
15. Esporo rosa pálido a rosa; célula esporogênica 32-50 μ m diâm.; parede do esporo 8-26 μ m espess..... ***S. weresubiae***
13. “Parede germinativa” com camada amorfa..... 16
16. “Parede estrutural” negativa em Melzer 17
17. Célula esporogênica 50-65 μ m diâm.; ***S. hawaiiensis***
17. Célula esporogênica 21-30 μ m diâm.; 18
18. 1^a. “parede germinativa” com duas camadas ***S. calospora***
18. 1^a. “parede germinativa” com uma camada ***S. dipurpurascens***
16. “Parede estrutural” positiva em Melzer 19
19. C1 da “parede estrutural” do esporo com 0,7-1,2 μ m espess.; esporos geralmente globosos a subglobosos ***S. armeniaca***
19. C1 da “parede estrutural” do esporo com 1,8-5,0 μ m espess.; esporos geralmente oblongos a elipsóides (reniformes) ***S. pellucida***
12. Superfície do esporo ornamentada..... 20
20. “Parede estrutural” negativa em Melzer 21
21. Placa germinativa em espiral; superfície dos esporos com grandes protuberâncias esparsamente distribuídas ***S. projecturata***
21. Placa germinativa não espiralada; superfície dos esporos coberta com pequenas projeções espinhosas densamente distribuídas ***S. spinosissima***

20. “Parede estrutural” positiva em Melzer 22
22. “Parede germinativa” sem camada amorfa; esporo vermelho-marron de claro a escuro; célula esporogênica 24-28µm diâm. *S. heterogama*
22. “Parede germinativa” com camada amorfa; esporo hialino a branco ou amarelo-marron; célula esporogênica 25-50µm diâm. 23
23. Esporo 220-380µm diâm.; presença de camada flexível na “parede estrutural” *S. cerradensis*
23. Esporo 160-270 x 160-340µm (compr. por larg., respectivamente); ausência de camada flexível na “parede estrutural” *S. nodosa*
11. Três “paredes germinativas” 24
24. Esporo vermelho-marron de claro a escuro; 160-320µm diâm.; célula esporogênica 38-50µm diâm.; parede do esporo 8,4-18µm espess.; ausência de camada amorfa nas “paredes germinativas” *S. erythropha*
24. Esporo de hialino a branco ou amarelo-marron; 340-640µm diâm.; célula esporogênica 47-90µm diâm.; parede do esporo 19,5-56µm diâm.; presença de camada amorfa nas “paredes germinativas” *S. scutata*

Chave para espécies de *Scutellospora*

(Ornamentação como principal critério de separação)

1. Superfície do esporo lisa 2
2. Parede germinativa sem camada amorfa 3
3. Esporo com uma “parede germinativa” 4
4. Parede do esporo 14-42µm espess.; esporos amarelados a amarelo-marrons com tons de ocre; célula esporogênica 38-51µm diâm. *S. castanea*
4. Parede do esporo 6,5-9,5µm espess.; esporos hialinos a brancos; célula esporogênica 20-27µm diâm. *S. fulgida*
3. Esporo com duas “paredes germinativas” 5
5. 1ª “parede germinativa” com apenas uma camada *S. auriglobosa*
5. 1ª “parede germinativa” com duas camadas 6
6. Esporo laranja-marron a vermelho escuro; célula esporogênica 18-35µm diâm.; parede do esporo 7-12µm espess. *S. rubra*

6. Esporo rosa pálido a rosa; célula esporogênica 32-50µm diâm.; parede do esporo 8-26µm espess.....	<i>S. weresubiae</i>
2. “Parede germinativa” com camada amorfa.....	7
7. “Parede estrutural” negativa em Melzer.....	8
8. Esporos com duas “paredes germinativas”.....	9
9. Célula esporogênica 50-65µm diâm.;.....	<i>S. hawaiiensis</i>
9. Célula esporogênica 21-30µm diâm.;.....	10
10. 1 ^a . “parede germinativa” com duas camadas.....	<i>S. calospora</i>
10. 1 ^a . “parede germinativa” com uma camada.....	<i>S. dipurpurascens</i>
8. Esporos com três “paredes germinativas”.....	11
11. Esporo vermelho-marrom de claro a escuro; 160-320µm diâm.; célula esporogênica 38-50µm diâm.; parede do esporo 8,4-18µm espess.; ausência de camada amorfa nas “paredes germinativas”.....	<i>S. erythropha</i>
11. Esporo de hialino a branco ou amarelo-marrom; 340-640µm diâm.; célula esporogênica 47-90 µm diâm.; parede do esporo 19,5-56µm espess.; presença de camada amorfa nas “paredes germinativas”.....	<i>S. scutata</i>
7. “Parede estrutural” positiva em Melzer.....	12
12. Esporos com apenas uma “parede germinativa”.....	<i>S. arenicola</i>
12. Esporos com duas paredes germinativas.....	13
13. C1 da “parede estrutural” do esporo com 0,7-1,2µm de espess.; esporos geralmente globosos a subglobosos.....	<i>S. armeniaca</i>
13. C1 da “parede estrutural” do esporo com 1,8-5,0µm de espess.; esporos geralmente oblongos a elipsóides.....	<i>S. pellucida</i>
1. Superfície do esporo ornamentada.....	14
14. “Parede germinativa” sem camada amorfa.....	15
15. “Parede germinativa” com camada “beaded”.....	<i>S. biornata</i>
15. “Parede germinativa” sem camada “beaded”.....	16
16. Esporo < 200µm diâm.; “parede estrutural” do esporo com 3 camadas.....	17
17. Uma “parede germinativa”; “parede germinativa” negativa em Melzer; célula esporogênica 27- 40 µm diâm.....	<i>S. dipapillosa</i>
17. Duas “paredes germinativas”; “parede germinativa” positiva em Melzer; célula esporogênica 24-28µm diâm.....	<i>S. heterogama</i>
16. Esporo > 200 µm diâm.; “parede estrutural” do esporo com 2 camadas.....	18

18. “Parede estrutural” negativa em Melzer *S. coralloidea*
18. “Parede estrutural” positiva em Melzer..... 19
19. Célula esporogênica 35-46µm diâm.; superfície dos esporos com projeções verrucosas com até 0,5µm espess. por 0,2-0,5µm alt..... *S. persica*
19. Célula esporogênica > 50µm diâm.; superfície dos esporos com projeções verrucosas com mais de 0,5µm espess. e 0,5µm alt..... 20
20. Esporos 380-520µm diâm.; avermelhados a vermelho-marrons; superfície dos esporos com projeções verrucosas com 11-26µm espess. por 3-7µm alt.....
..... *S. gregaria*
20. Esporos 220-360µm diâm.; cor de palha pálido a laranja-marrom; superfície dos esporos com projeções verrucosas com 0,5-1,0µm espess. por 0,5-1,2µm alt
..... *S. verrucosa*
14. “Parede germinativa” com camada amorfa 21
21. Uma “parede germinativa”; “parede germinativa” com camada “beaded” *S. crenulata*
21. Duas “paredes germinativas”; “parede germinativa” sem camada “beaded” 22
22. “Parede estrutural” negativa em Melzer 23
23. Placa germinativa em espiral; superfície dos esporos com grandes protuberâncias esparsamente distribuídas *S. projecturata*
23. Placa germinativa não espiralada; superfície dos esporos coberta com pequenas projeções espinhosas densamente distribuídas *S. spinosissima*
22. “Parede estrutural” positiva em Melzer 24
24. Esporo 220-380µm diâm.; presença de camada flexível na “parede estrutural”
..... *S. cerradensis*
24. Esporo 160-270 x 160-340µm (compr. por larg., respectivamente); ausência de camada flexível na “parede estrutural” *S. nodosa*

Descrição das espécies de *Gigaspora* (fonte: Morton 2003, <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>)

Gigaspora albida Schenck & Smith **Mycologia** 74: 77-92 1982.

Esporos globosos a subglobosos com 200-280µm diâm., freqüentemente de cor creme com tons de verde pálido, apresentando célula esporogênica com 32-45µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3); a primeira lisa, com 2,0-3,2µm espess.; a segunda semi-

plástica, consistindo de subcamadas com 14-26µm espess., que coram de vermelho-marrom escuro a vermelho-púrpura escuro em Melzer; a terceira (C3) é uma camada germinativa e está intimamente aderida a C2, sendo vista apenas ao nível ultraestrutural.

Gigaspora decipiens Hall & Abbott **Trans. Br. Mycol. Soc.** 83: 203-208. 1984.

Esporos globosos a subglobosos com 280-440µm diâm., freqüentemente de cor branca a creme tornando-se amarelo-marrom com a idade. Célula esporogênica com 51-63µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3). A primeira (C1) é lisa e tem 2,5-3,2µm espess.; C2 é semi-plástica, consistindo de subcamadas, com 15-60µm de espess., que se tornam vermelho-púrpura escuro (quase preto) em Melzer; C3 é uma camada germinativa, está intimamente aderida a C2 e é vista apenas em análise ultraestrutural.

Gigaspora gigantea (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe **Mycol. Mem.** 5: 76p. 1974.

Basiônimo: *Endogone gigantea* Nicol. & Gerd. **Mycologia** 60: 313-325. 1968.

Esporos globosos a subglobosos, raramente irregulares com 240-400µm diâm., de cor amarela brilhante esverdeada; célula esporogênica com 38-54µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3). C1 é lisa com 2,8-3,6µm de espess. C2 é semi-plástica com 8-29µm espess. e consiste de subcamadas que coram de vermelho-marrom escuro a vermelho-púrpura escuro em Melzer. C3 é uma camada germinativa e está intimamente aderida a C2, sendo vista apenas ao nível ultraestrutural.

Gigaspora margarita Becker & Hall **Mycotaxon** 4: 155-160 1976.

Esporos globosos a subglobosos, raramente irregulares, com 260-400µm diâm., cor branca a creme ou muitas vezes amarela-escura em muitos esporos; célula esporogênica com 34-47µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3). C1 é lisa e apresenta 1,6-2,4µm espess.; C2 é semi-plástica, tem 13-31µm espess. e consiste de subcamadas que coram de vermelho-marrom escuro a vermelho-púrpura escuro em Melzer; C3 é uma camada germinativa e está intimamente aderida a C2, sendo vista apenas ao nível ultraestrutural.

Gigaspora rosea Nicol. & Schenck **Mycologia** 71: 178-198 1979.

Esporos globosos a subglobosos, com 160-280µm diâm., cor creme com tons de rosa pálido; célula esporogênica possuindo 32-45µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3). C1 é lisa, com 1,5-2,2µm espess.; C2 é semi-plástica, com 8-29µm espess., e consiste de

subcamadas que coram de vermelho-marrom escuro a vermelho-púrpura escuro em Melzer; C3 é uma camada germinativa intimamente aderida a C2, sendo vista apenas ao nível ultraestrutural.

Descrição das espécies de *Scutellospora* (fonte: Morton 2003, <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm> e descrições originais)

Scutellospora alborosea (Ferrer & Herrera) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora alborosea* Ferrer & Herrera **Rev. Jard. Bot. Nac.** 1: 43-66. 1980.

Esporos globosos a subglobosos, 204-287µm diâm., cor hialina rosada a marrom rósea; célula esporogênica com 21-50µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2). A mais externa (C1) tem 4-11µm espess. e apresenta superfície lisa. A mais interna (C2) consiste de subcamadas e varia de 1,5-5,5µm espess. A “Parede germinativa” tem 0,7-2,1µm espess.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número de “paredes germinativas”.

Scutellospora arenicola Koske & Halvorson **Mycologia** 81: 927-933. 1989.

Esporos subglobosos a irregulares, 160-360x120-310µm (compr. por larg., respectivamente), cor amarelo-marrom a laranja-marrom; célula esporogênica com 35-47µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2). A mais externa (C1) tem 0,8-1,5µm espess. e apresenta superfície lisa ou ligeiramente rugosa. A mais interna (C2) consiste de subcamadas e varia de 3,5-12µm espess. Esta camada torna-se vermelho-marrom escuro em Melzer. Apenas uma “parede germinativa”, apresentando três camadas (C1, C2 e C3). A mais externa (C1) tem 0,8-1,5µm espess., C2 tem 1-2µm espess., C3 é plástica, sendo denominada amorfa e varia de 1-3µm espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo. Essa camada apresenta uma coloração vermelho-púrpura escuro em Melzer.

Scutellospora armeniaca Blaszowski **Mycologia** 84: 939-944. 1992.

Esporos globosos a subglobosos algumas vezes ovóides, 140-240µm diâm., cor amarela a amarela-marrom; célula esporogênica com 32-42µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3). A mais externa (C1) é lisa e tem 0,7-1,2µm espess., C2 consiste de subcamadas e varia de 5,4-13µm de espess. Em Melzer, essa camada torna-se vermelha. A camada mais interna (C3) é fina e flexível com menos de 1µm espess. Duas “paredes germinativas” estão presentes, a mais externa (PG1) é composta por duas camadas: C1 tem 1-1,7µm e C2, 0,7-1,5µm

ess. A PG2 também apresenta duas camadas, a mais externa (C1) tem 0,7-1,5 μ m ess. e freqüentemente produz uma fraca coloração rósea em Melzer. A camada mais interna (C2) é plástica, sendo denominada amorfa e varia de 2-4,7 μ m ess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo. Em Melzer, essa camada apresenta coloração púrpura.

Scutellospora auriglobosa (Hall) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora auriglobosa* Hall **Trans. Br. Mycol. Soc.** 68: 341-356. 1977.

Esporos globosos a ovóides, 323-438x323-469 μ m (compr. por larg., respectivamente), cor amarelo pálido a amarelo escuro; célula esporogênica com 70-100x40-50 μ m (compr. por larg., respectivamente). “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2). A mais externa (C1) é lisa com 1-5 μ m ess., C2 consiste de subcamadas, variando de 6-16 μ m ess. Duas “paredes germinativas” estão presentes, a mais externa (PG1) é composta por apenas uma camada muito fina, com menos que 1 μ m ess. PG2 apresenta duas camadas (C1 e C2). A mais externa (C1) tem 4-7 μ m ess. e C2 tem menos que 1 μ m ess.

Obs. esta espécie não foi testada quanto à reação em Melzer.

Scutellospora biornata Spain, Sieverding & Toro **Mycotaxon** 35: 219-227. 1989.

Esporos globosos a subglobosos, (120) 260-450 (493) μ m diâm., cor amarela a laranja-marrom; célula esporogênica com (30) 50-60 (65) μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2); a externa (C1) tem 0,5-1 μ m ess., apresentando sobre a superfície projeções retas (0,5) 1-3 μ m ess. na base e 2 μ m no ápice, que se afunilam. A camada mais interna (C2) consiste de numerosas subcamadas que se expandem em PVLG e pode exibir considerável plasticidade, variando de 5-25 μ m ess., dependendo da pressão aplicada quando os esporos são quebrados. Esta camada cora de vermelho-marrom escuro a vermelho-púrpura em Melzer. Apenas uma “parede germinativa” flexível presente, apresentando duas camadas. A primeira (C1) tem 0,5-1 μ m ess., superfície “beaded” e reação negativa em Melzer; a segunda (C2), com 1-2 μ m ess., apresenta coloração de rosa pálido a vermelho-marrom brilhante em Melzer.

Scutellospora calospora (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora calospora* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe **Mycol. Mem.** 5: 76p. 1974.

Endogone calospora Nicol. & Gerd. **Mycologia** 60: 313-325. 1968.

Esporos subglobosos a oblongos, 120-220 μ m diâm., cor amarelo pálido a amarelo-marrom com tons de verde; célula esporogênica com 22-28 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas

camadas (C1 e C2); a externa (C1) é lisa, tem 1-1,2 μ m espess. e é firmemente ligada a C2. A camada mais interna (C2) consiste de subcamadas muito finas e aderentes umas as outras, variando de 1,8 a 4,2 μ m espess. Duas “paredes germinativas” estão presentes; a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1 e C2). A primeira (C1) tem menos que 0,5 μ m espess. e a segunda (C2) tem 0,4-1,4 μ m. A parede mais interna (PG2) também apresenta duas camadas. A mais externa (C1) tem 1,2-3,2 μ m espess. e freqüentemente produz fraca coloração rósea em Melzer. A camada mais interna (C2) é hialina e plástica, sendo denominada amorfa. Essa camada varia de 2,5 a 8,0 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo e apresenta uma coloração vermelho-púrpura em Melzer.

Scutellospora castanea Walker **Cryptogamie Mycol.** 14: 279-286. 1993.

Esporos globosos a subglobosos, raramente ovóides ou obovóides, 169-369x176-372 μ m (compr. por larg., respectivamente), cor branca opaca a ocre; célula esporogênica com 38-51 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2), a camada externa (C1) é lisa com 2-4 μ m espess. A camada mais interna (C2) consiste de subcamadas, que aumentam em número dependendo da pressão aplicada para quebrar os esporos. Esta camada varia de 10-35 μ m espess. em esporos maduros e torna-se rosa a vermelha ou amarela em Melzer. Apenas uma “parede germinativa” flexível presente, apresentando duas camadas (C1 e C2). A mais externa (C1) tem menos que 1 μ m espess. e reage negativamente em Melzer. A mais interna (C2) tem 1-2 μ m espess. e também não apresenta reação em Melzer.

Scutellospora cerradensis Spain & Miranda **Mycotaxon** 60: 129-136. 1996.

Esporos globosos, subglobosos, freqüentemente elípticos ou fortemente oblongos, 220-380 μ m diâm., hialinos/brancos quando jovens a amarelo-marrons quando velhos; célula esporogênica com 32-45 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com quatro camadas (C1, C2, C3 e C4). A mais externa (C1) tem a superfície papilada; as papilas geralmente apresentam menos de 1 μ m alt. por 1-1,5 μ m larg. e localizam-se muito próximas umas das outras. A segunda camada (C2) tem 1,5-3,0 μ m espess., é distinguível de C3 apenas em Melzer, tornando-se rosa-vermelho pálido; C3 consiste de subcamadas muito finas e aderentes, tem de 2,5-8 μ m espess. e apresenta coloração vermelho-púrpura escuro a vermelho-preto em Melzer. A camada mais interna (C4) é fina, com menos de 1 μ m espess., separa-se facilmente das outras camadas da “parede estrutural” do esporo, exceto no ponto de ligação à célula esporogênica. Esta camada pode facilmente ser confundida com uma “parede germinativa”. Duas “paredes germinativas” estão presentes; a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1

e C2). C1 tem menos de 0,5 μ m e C2, 1,0-2,8 μ m espess. A PG2 também apresenta duas camadas. C1 tem 2,0-4,8 μ m espess. e freqüentemente produz uma fraca coloração rosea em Melzer. C2 é hialina e plástica, sendo denominada amorfa; varia de 4-18 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo e em Melzer apresenta coloração vermelho-púrpura a vermelho-púrpura escuro.

Scutellospora coralloidea (Trappe, Gerd. & Ho) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora coralloidea* Trappe, Gerd. & Ho **Mycol. Mem.** 5: 76p. 1974.

Esporos globosos a subglobosos, 260-480 μ m diâm., cor laranja-vermelho a vermelho-marrom escuro; célula esporogênica com 41-62 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas, a externa (C1) apresenta superfície verrucosa, com “verrugas” achatadas e de margens angulares (a maioria dessas “verrugas” apresenta 2-12 μ m espess. por 1-3 μ m alt.). A camada mais interna (C2) consiste de subcamadas, que aumentam em número dependendo da pressão aplicada. Esta camada varia de 6,5-10,5 μ m espess. em esporos maduros. Apenas uma “parede germinativa” flexível presente, apresentando duas camadas: C1 tem menos de 0,5 μ m e C2 tem 0,6-1,2 μ m espess. Ambas não reagem em Melzer.

Scutellospora crenulata Herrera-Peraza, Cuenca & Walker **Can. J. Bot.** 79: 674-678. 2001.

Esporos globosos a subglobosos, algumas vezes elipsóides, 103-165x116–170 μ m (compr. por larg., respectivamente), cor ocre; célula esporogênica com 22–46x8,6–26,5 μ m (compr. por larg., respectivamente). “Parede estrutural” do esporo com três camadas (C1, C2 e C3); a externa (C1) é de difícil observação e não reage em Melzer, C2 tem 5-9 μ m espess. e consiste de subcamadas, apresenta superfície ornamentada com papilas hexagonais, pentagonais ou tetragonais, raramente irregulares com 3-6 μ m alt. por 3,6-10 μ m larg. na base; essa camada torna-se amarela em Melzer. A camada mais interna (C3) é hialina, tem menos que 1 μ m espess. e não reage em Melzer. Apenas uma “parede germinativa”, apresentando três camadas. A primeira (C1) tem cerca de 1 μ m espess., superfície “beaded” e não reage em Melzer; a segunda (C2) é amorfa, com 5-19 μ m espess. em PVLG; a terceira (C3) tem menos que 1 μ m espess. Ambas tornam-se vermelho púrpura em Melzer.

Scutellospora dipapilosa (Walker & Koske) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora dipapilosa* Walker & Koske **Mycologia** 77: 702-720. 1985.

Esporos globosos, subglobosos a irregulares, 135-180 μ m diâm., cor laranja-marrom pálido a laranja-marrom escuro; célula esporogênica com 27-40 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com

três camadas (C1, C2 e C3). C1 tem 1,5-2 μ m espess. e apresenta superfície com ornamentações que consistem de curtas “verrugas”, a maioria com 0,5-1 μ m larg. na base por 0,5-1,5 μ m alt., sendo distantes umas das outras menos de 0,5 μ m. C2 consiste de subcamadas e tem de 3-8 μ m espess. C3 é uma fina camada flexível com menos de 0,5 μ m espess. Apenas uma “parede germinativa” está presente, com duas camadas; C1 tem 2-6 μ m e C2 0,5-1 μ m espess..

Obs. apesar da descrição original não fornecer dados sobre a reação em Melzer, segundo Morton (1990) a “parede germinativa” reage positivamente a essa solução.

Scutellospora dipurpurascens Morton & Koske **Mycologia** 80: 520-524. 1988.

Esporos subglobosos a oblongos, algumas vezes irregulares, 140-240 μ m diâm., cor amarelo pálido com tons verdes a amarelo-marrom esverdeado; célula esporogênica com 21-30 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2). C1 é lisa, tem 1-1,2 μ m espess. e está firmemente ligada a C2, que consiste de subcamadas muito finas e aderentes e tem de 1,8 a 4,2 μ m espess. Duas “paredes germinativas” estão presentes, a mais externa (PG1) é composta por apenas uma camada que varia de 0,6-1 μ m espess. e torna-se rosa brilhante em Melzer. A PG2 apresenta duas camadas: C1 tem 1,2-3,2 μ m espess. e freqüentemente produz uma fraca coloração rósea em Melzer; C2 é plástica, sendo denominada amorfa e varia de 2,5-8,0 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo. Em Melzer apresenta coloração de vermelho-púrpura a vermelho-púrpura escuro.

Scutellospora erythropha (Koske & Walker) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora erythropha* Koske & Walker **Mycologia** 76: 250-255. 1984.

Esporos subglobosos a oblongos, 160-320 μ m diâm., cor vermelho-marrom a vermelho-marrom escuro; célula esporogênica com 38-50 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas. C1 é lisa com 0,8-1,2 μ m espess. e firmemente ligada a C2, que consiste de subcamadas e tem de 3,2-7,4 μ m de espess. Três “paredes germinativas” estão presentes, a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1 e C2), C1 tem menos de 0,5 μ m e C2, 0,5-0,8 μ m espess. PG2 também é composta por duas camadas (C1 e C2), C1 tem menos de 0,5 μ m espess. e C2, 1,2-3,2 μ m. PG3 apresenta C1 com 0,8-2,4 e C2 com 0,9-1,6 μ m espess.; essas duas camadas tornam-se rosa a rosa-púrpura em Melzer.

Scutellospora fulgida Koske & Walker **Mycotaxon** 27: 219-235. 1986.

Esporos globosos a subglobosos, 120-240µm diâm., cor hialina a creme escuro; célula esporogênica com 20-27µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 é lisa, com 0,7-1,8µm espess. e C2 consiste de subcamadas com 4,5-6µm espess. Esta camada torna-se amarelo brilhante a ouro em Melzer. Apenas uma “parede germinativa” flexível presente, apresentando duas camadas; C1 tem menos de 0,5µm espess. e C2, 0,6-1,2µm espess.; nenhuma dessas camadas reage em Melzer.

Scutellospora gilmorei (Trappe & Gerd.) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora gilmorei* Trappe & Gerd. **Mycol. Mem.** 5: 76p. 1974.

Esporos globosos a subglobosos, ocasionalmente elipsóides, 204-320µm diâm. e cor hialina; célula esporogênica com 27-40µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2), que apresentam juntas, 11µm espess. C1 tem menos que 1µm espess. e apresenta superfície lisa. C2, possivelmente consiste de subcamadas e apresenta espessura variável. A “Parede germinativa” está dividida em quatro camadas; a mais externa tem menos de 1µm e as demais apresentam espess. variável.

Obs. Não há relato da reação das paredes em Melzer e não é possível determinar o número exato de “paredes germinativas”.

Scutellospora gregaria (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora gregaria* Schenck & Nicol. **Mycologia** 71: 178-198. 1985.

Esporos globosos a subglobosos, 380-520µm diâm., cor vermelho-marrom a vermelho-marrom escuro; célula esporogênica com 50-66µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 tem 0,7-1,8µm espess. e apresenta superfície com ornamentações que consistem de “verrugas” redondas, a maioria com 11-26,7µm espess., por 3-7µm de alt.; C2 consiste de subcamadas e apresenta de 8-12,6µm espess. Esta camada torna-se vermelho-marrom a marrom em Melzer. Apenas uma “parede germinativa” flexível presente, apresentando duas camadas; C1 tem menos de 0,5µm e C2 varia de 0,6-1,3µm espess.; nenhuma dessas camadas reage em Melzer.

Scutellospora hawaiiensis Koske & Gemma **Mycologia** 87: 678-683. 1995.

Esporos subglobosos a irregulares, 200-360x180-290µm (compr. por larg., respectivamente), cor laranja-marrom pálido a laranja-marrom escuro; célula esporogênica com 50-65µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: a externa (C1) é lisa a ligeiramente rugosa, tem 1,2-2µm

espass. e é firmemente ligada a C2; a camada mais interna (C2) consiste de subcamadas muito finas, variando de 0,8-2,2 μ m espess. Duas “paredes germinativas” estão presentes; a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1 e C2), a primeira (C1) tem 2,8-4,8 μ m espess. e a segunda (C2) tem 0,5-1,6 μ m. A parede mais interna (PG2) também apresenta duas camadas, a mais externa (C1) tem 2-3,3 μ m espess. A camada mais interna (C2) é hialina e plástica, sendo denominada amorfa. Essa camada varia de 3-25 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo e torna-se vermelho-púrpura em Melzer.

Scutellospora heterogama (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora heterogama* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe **Mycol. Mem.** 5: 76p. 1974.

Endogone heterogama Nicol. & Gerd. **Mycologia** 60: 313-325. 1968.

Esporos subglobosos a oblongos, 120-200 μ m diâm., cor laranja-marrom escuro a vermelho-marrom; célula esporogênica com 24-28 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas: C1 apresenta superfície com ornamentações que consistem de curtas “verrugas” a maioria com 1,0-2,5 μ m alt.; C2 consiste de subcamadas e tem de 5,0-9,0 μ m espess., tornando-se vermelho-marrom escuro em Melzer; C3 é uma fina camada flexível com menos de 1 μ m espess., e usualmente é vista apenas próxima ao plug de oclusão da célula esporogênica. Duas “paredes germinativas” estão presentes. A mais externa (PG1) é composta por duas camadas: C1 tem menos de 0,5 μ m e C2, 0,8-1,5 μ m espess. PG2 também apresenta duas camadas: C1 com 0,5-0,8 μ m e C2 com 0,9-1,8 μ m espess., tornando-se rosa-púrpura a púrpura escuro em Melzer.

Scutellospora minuta (Ferrer & Herrera) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigapora minuta* Ferrer & Herrera **Rev. Jard. Bot. Nac.** 1: 43-66. 1980.

Esporos globosos a subglobosos ou irregulares, 97-180 μ m diâm., cor marrom escuro esverdeado; célula esporogênica com 22-31 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 possui até 3 μ m espess. e C2 varia de 2,5-5 μ m espess., apresentando superfície ornamentada com numerosos espinhos de até 3 μ m alt. por 1 μ m larg. Quando maduros os esporos apresentam estruturas circulares com profundidade de até 2,5 μ m e diâm. externo e interno de até 5 μ m e 2 μ m, respectivamente. “Parede germinativa” com até 1 μ m espess.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número de “paredes germinativas”.

Scutellospora nigra (Redhead) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986. Basiônimo:
Basiônimo: *Gigaspora nigra* Redhead **Mycologia**. 71: 117-188. 1979.

Esporos globosos, 297-500µm diâm., cor vermelho-marrom a marrom escuro; célula esporogênica com 21-50µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com apenas uma camada laminada que apresenta 6-14µm espess., superfície com alvéolos de contorno circular em geral, com 2,5-12µm diâm. em geral. A “Parede germinativa” tem duas camadas com cerca de 1µm espess. cada.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número exato de “paredes germinativas”.

Scutellospora nodosa Blaszkowski **Mycologia** 83: 537-542. 1991.

Esporos globosos, subglobosos, algumas vezes ovóides, hialinos a amarelo pálidos e com 160–270x160–340µm (compr. por larg., respectivamente); célula esporogênica com 25-50µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 tem 1-2,5µm espess. e a superfície rugosa; essas estruturas apresentam 3,5-6,5µm alt. por 7-10,5µm larg. na base, sendo distantes umas das outras cerca de 2,5-5µm. C2 consiste de subcamadas muito finas e aderentes umas às outras, tem de 9,3-16,7µm espess. e torna-se vermelho-marrom em Melzer. Duas “paredes germinativas” estão presentes: a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1, com < 0,5µm e C2 com 0,5-0,7µm espess., esta torna-se laranja claro em Melzer). PG2 apresenta três camadas: C1 tem < 1µm espess. e torna-se laranja claro em Melzer; C2 tem 1,2-3,2µm espess. e torna-se vermelho claro em Melzer; C3 é plástica, sendo denominada amorfa, varia de 10-17,5µm espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo. Em Melzer essa camada apresenta coloração vermelho-púrpura escuro.

Scutellospora pellucida (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora pellucida* Nicol. & Schenck **Mycologia** 71: 178-198. 1979.

Esporos globosos a subglobosos, freqüentemente elípticos ou fortemente oblongos, 120-240µm diâm., cor hialina/branca a amarela-marrom; célula esporogênica com 32-45µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas: C1 é lisa e tem 1,8-5,0µm espess.; C2 consiste de subcamadas e tem de 3,0-8,8µm espess., torna-se vermelho-marrom escuro a preto em Melzer; C3 é uma fina camada flexível com menos de 1µm espess. e usualmente é vista apenas onde a parede do esporo se liga próximo ao “plug” de oclusão da célula esporogênica. Duas “paredes germinativas” estão presentes; a mais externa (PG1) é composta por duas camadas (C1 e C2). C1 tem menos de 0,5µm e C2, 1,0-2,8µm espess. PG2 também apresenta duas camadas: C1 tem 2,0-4,8µm espess. e

freqüentemente produz uma fraca coloração rósea em Melzer. C2 é plástica, sendo denominada amorfa. Varia de 4-18 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo e em Melzer torna-se vermelho-púrpura a vermelho-púrpura escuro.

Scutellospora persica (Koske & Walker) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora persica* Koske & Walker **Mycologia** 77: 702-720. 1985.

Esporos globosos a subglobosos, 240-360 μ m diâm., cor cobre claro ou escuro a creme escuro; célula esporogênica com 35-46 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 possui 0,7-1,8 μ m espess. e apresenta superfície com ornamentações que consistem de muitas “verrugas” redondas com 0,5 μ m larg. por 0,2-0,5 μ m alt.; C2 consiste de subcamadas e tem de 6,2-8,4 μ m espess. Esta camada torna-se laranja-marrom a vermelho-marrom em Melzer. Apenas uma “parede germinativa” presente, apresentando duas camadas: C1 tem menos de 0,5 μ m e C2 tem 0,6-1,2 μ m espess., ambas não reagem em Melzer.

Scutellospora projecturata Kramadibrata & Walker **Ann. Bot.** 86: 21-27. 2000.

Esporos globosos a subglobosos, 102-174x108–181 μ m (compr. por larg., respectivamente). e cor de ouro metálico a ocre/siena; célula esporogênica 32-60x29-47 μ m (compr. por larg., respectivamente). “Parede estrutural” do esporo com uma camada (C1) que consiste de subcamadas e apresenta superfície com proeminentes projeções retas ou em forma de gancho. Essa camada tem 1-2 μ m espess. e não reage em Melzer. Duas “paredes germinativas” presentes: a mais externa (PG1) é composta por apenas uma camada com menos que 1 μ m espess. e sem reação em Melzer; A PG2 apresenta três camadas; C1 tem 1,5-2 μ m espess. e não reage em Melzer, C2 é plástica, sendo denominada amorfa e tem espess. de cerca de 1 μ m em água, variando em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo. C3 também tem cerca de 1 μ m espess., porém não é amorfa. C2 e C3 tornam-se cor púrpura em Melzer.

Scutellospora reticulata (Koske, Miller & Walker) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora reticulata* Koske, Miller & Walker **Mycotaxon** 16: 429-435. 1983.

Esporos subglobosos a oblongos, 208-470x188-340 μ m (compr. por larg., respectivamente), cor laranja-marrom a vermelho-marrom escuro; célula esporogênica com 45-87x84-140 μ m (compr. por larg., respectivamente). “Parede estrutural” do esporo com três camadas: a externa (C1) tem 0,5-1 μ m de espess. e possui retículos; a superfície do esporo é coberta com espinhos que possuem 0,3-1,5 μ m diâm. na base; C2 tem 5-11 μ m espess. e C3 é fina, possuindo 0,3-0,7 μ m. Duas “paredes

germinativas”: a mais externa (PG1) é composta por uma camada de 1µm de espess. A parede mais interna (PG2) apresenta duas camadas; a mais externa (C1) é amorfa e tem cerca de 2µm espess., a mais interna (C2) possui cerca de 1µm espess.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número exato de “paredes germinativas”. A presença de duas “paredes germinativas” nessa descrição é baseada na nossa interpretação.

Scutellospora rubra Stürmer & Morton **Mycol. Res.** 103:949-954. 1999.

Esporos globosos a subglobosos, 140-220µm diâm., cor laranja-marrom escuro a vermelho-marrom; célula esporogênica com 18-35µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com três camadas: C1 é lisa e muito fina, C2 consiste de subcamadas e tem de 3,5-7,5µm espess., torna-se vermelho-preto em Melzer. C3 é uma fina camada flexível com menos de 1µm espess., vista usualmente apenas próximo ao “plug” de oclusão da célula esporogênica. Duas “paredes germinativas”: a mais externa (PG1) é composta por duas camadas: C1 tem menos que 0,5µm espess. e C2, 0,6-0,8µm; PG2 também apresenta duas camadas: C1 tem 0,5-0,6µm espess. e C2 tem de 0,6-1,4µm espess., tornando-se rosa-púrpura pálido a rosa-púrpura escuro em Melzer.

Scutellospora savannicola (Herrera & Ferrer) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora savannicola* Herrera & Ferrer **Rev. Jard. Bot. Nac.** 1: 43-66. 1980.

Esporos oblongos a elipsóides ou irregulares, 288-581x214-364µm (compr. por larg., respectivamente), hialinos a branco rosados a marrom róseos; célula esporogênica com menos de 30µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: a mais externa (C1) tem até 3µm espess. e a mais interna (C2) apresenta até 2,3µm. Duas “paredes germinativas”: a mais externa apresenta duas camadas: a camada externa (C1) tem menos de 1,5µm espess. e C2 menos de 1,3µm. PG2 tem cerca de 1µm espess.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número exato de “paredes germinativas”. A presença de duas “paredes germinativas” nessa descrição é baseada na nossa interpretação.

Scutellospora scutata Walker & Diederichs **Mycotaxon** 35: 357-361. 1989.

Esporos globosos a subglobosos, freqüentemente elípticos ou fortemente oblongos, 340-640µm diâm., cor hialina/branca a amarela-marrom; célula esporogênica com 47-90µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 é lisa com < 1µm espess. e C2 consiste de

subcamadas muito finas e aderentes umas às outras, tem de 3,5-16 μ m espess. Três “paredes germinativas”: a mais externa (PG1) é composta por duas camadas: C1 tem menos de 0,5 μ m espess. e C2, 4-9 μ m. PG2 também é composta por duas camadas: C1 tem menos de 0,5 μ m e C2, 3-6 μ m espess. e torna-se rosa a marrom-rósea em Melzer. PG3 apresenta duas camadas: C1 tem 3-5 μ m espess. e freqüentemente produz fraca coloração rósea em Melzer. C2 é plástica, sendo denominada amorfa, varia de 4-18 μ m espess. em PVLG, dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo; em Melzer torna-se vermelho-púrpura a vermelho-púrpura escuro.

Scutellospora spinosissima Walker, Cuenca & Sánchez **Ann. Bot.** 82: 721-725.1998.

Esporos globosos, subglobosos a elipsóides, 130-228x121-208 μ m (compr. por larg., respectivamente), cor creme-rosa pálido a ocre; célula esporogênica com 19-32 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas (C1 e C2); C1 é evanescente e tem cerca de 1 μ m espess., C2 é formada por subcamadas e tem cerca de 2 μ m espess., apresenta superfície com densos espinhos de 2-4 μ m alt. Duas “paredes germinativas” estão presentes: a mais externa (PG1) é composta por apenas uma camada com cerca de 1 μ m espess., não reagindo em Melzer; a interna (PG2) apresenta três camadas: C1 tem 1 μ m espess. e não reage ao Melzer, C2 é plástica, sendo denominada amorfa e tem cerca de 1,5-15 μ m espess., dependendo da pressão aplicada para quebrar o esporo, tornando-se púrpura em Melzer; C3 tem menos que 1 μ m espess. e torna-se vermelha púrpura em Melzer.

Scutellospora tricalypta (Herrera & Ferrer) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora tricalypta* Herrera & Ferrer **Rev. Jard. Bot. Nac.** 1: 43-66. 1980.

Esporos globosos a elipsóides, 257-456 μ m diâm., cor hialina rosada a marrom rósea; célula esporogênica com 14-47x20 μ m diâm. “Parede estrutural” do esporo com cerca de 9 μ m espess. Duas “paredes germinativas” (PG1 e PG2); a mais externa com aproximadamente 5 μ m e a mais interna com 3 μ m espess.

Obs. Não há relato da reação das camadas de parede em Melzer nem do número de camadas ou de “paredes germinativas”. A presença de duas “paredes germinativas” nessa descrição é baseada na nossa interpretação. Há relatos de que PG1 possui espinhos (Ferrer & Herrera 1980). Neste caso esta poderia ser uma das camadas da “parede estrutural”.

Scutellospora verrucosa (Koske & Walker) Walker & Sanders **Mycotaxon** 27: 169-182. 1986.

Basiônimo: *Gigaspora verrucosa* Koske & Walker **Mycologia** 77: 702-720. 1985.

Esporos globosos a subglobosos, 220-360µm diâm., cor palha pálido a laranja-marrom; célula esporogênica com 52-60µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: C1 possui 0,7-1,8µm espess. e apresenta superfície com ornamentações que consistem de “verrugas” a maioria com 0,5-1,0µm larg. por 0,5-1,2µm alt.; C2 consiste de subcamadas e tem de 6,2-8,4µm espess. Esta camada torna-se laranja-marrom a vermelho-marrom em Melzer. Apenas uma “parede germinativa”, com duas camadas: C1 tem menos que 0,5µm e C2, 0,6-1,2µm espess. Ambas não reagem em Melzer.

Scutellospora weresubiae Koske & Walker **Mycotaxon** 27: 219-235. 1986.

Esporos globosos a subglobosos ou irregulares, 125-265x135-414µm (compr. por larg., respectivamente), cor rosa pálido a rosa; célula esporogênica com 32-50µm diâm. “Parede estrutural” do esporo com duas camadas: a mais externa (C1) tem menos que 0,5µm espess. e apresenta superfície lisa; a interna (C2) consiste de subcamadas e varia de 3-15µm espess., tornando-se vermelha em Melzer. Duas “paredes germinativas”: a externa (PG1) é composta por duas camadas, cada uma com até 1µm espess.; a interna (PG2) também apresenta duas camadas: a externa (C1) tem 2-8µm espess. e a interna (C2) tem cerca de 0,5µm espess. e torna-se vermelha em Melzer.

Referências bibliográficas

- Abbott, L. K. 1982. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. **Australian Journal of Botany** 30: 485-499.
- Bentivenga, S. P. & Morton, J. B. 1994. Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. Pp. 283-308 In: F. L. Pflieger & R. G. Linderman (eds.). **Mycorrhizae and Plant Health**. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Bentivenga, S. P. & Morton, J. B. 1995. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia** 87: 719-731.
- Cooper, K. M. & Tinker, P. B. 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. **New Phytologist** 81: 43-52.
- Ferrer, R. L. & Herrera, R. A. 1980. El género *Gigaspora* Gerd. & Trappe (Endogonaceae) en Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional** 1: 43-66.

- Francis, R. & Read, D. J. 1995. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. **Canadian Journal of Botany** **73** (Supp.1): S 1301- S 1309.
- Franke, M. & Morton, J. B. 1994. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. **Canadian Journal of Botany** **72**: 122-134.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J.C. & Stalpers, J. A. 2001. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9th ed. CAB International, Oxon.
- Koske, R. E. & Walker, C. 1985. Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls. **Mycologia** **77**: 702-720.
- Kramadibrata, K.; Walker, C.; Schwarzott, D. & Schüßler, A. 2000. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. **Annals of Botany** **86**: 21-27.
- Lanfranco, L.; Bianciotto, V.; Lumini, E.; Souza, M.; Morton, J. B. & Bonfante, P. 2001. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytologist** **152**:169-179.
- Maia, L. C.; Kimbrough, J. W. & Benny, G. 1993. Ultrastructural studies of the spore wall of *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia** **86**: 883-889.
- Morton, J. B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon** **32**: 267-324.
- Morton, J. B. 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. **Mycologia** **82**: 192-207.
- Morton, J. B. 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. **Mycologia** **87**:127-137
- Redecker, D.; Kodner, R. & Graham, L. E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science** **289**: 1920-1921.
- Schenck, N. C. & Pérez, Y. 1990. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3th ed. Synergistic Publ., Gainesville.
- Schüßler, A.; Schwarzott D. & Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research** **105**: 1413-1421.
- Spain, L. S. & Miranda, J. C. 1996. *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Gigaporaceae (Glomales) from the cerrado region of Brazil. **Mycotaxon** **60**: 129-136.

- Stürmer, S. L. & Morton, J. B. 1997. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. **Mycologia** **89**: 72-81.
- Stürmer, S. L. & Morton, J. B. 1999. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. **Mycologia** **91**: 849-857.
- Walker, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall concepts in species descriptions. **Mycotaxon** **18**: 443-455.
- Walker, C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. **Agronomie** **12**: 887-897.
- Walker, C.; Cuenca, G.; Sánchez, F. 1998. *Scutellospora spinosissima* sp. nov., a newly described glomalean fungus from acidic, low nutrient plant communities in Venezuela. **Annals of Botany** **82**: 721-725.

Tabela 1. Comparativo dos caracteres usados na identificação de espécies de *Gigaspora*

<i>Gigaspora</i>	Cor do esporo			Diâmetro do esporo (μm)	Espessura da parede do esporo (μm)	Diâmetro da célula esporogênica (μm)	Reação da parede estrutural em Melzer
	H-B	A-O	AM				
<i>G. albida</i>	X verde			200-280	17-29	32-45	+
<i>G. decipiens</i>		X	X	280-440	18-63	51-63	+
<i>G. gigantea</i>		X verde		240-400	11-33	38-54	+
<i>G. margarita</i>		X	X	260-400	15-34	34-47	+
<i>G. rosea</i>	X rosa	X		160-280	10-31	32-45	+

H-B= hialino a branco; A-O= Amarelo a ouro; AM= amarelo-marrom

Tabela 2. Comparativo dos caracteres usados na identificação de espécies de *Scutellospora*

<i>Scutellospora</i>	Cor do esporo				Diâmetro do esporo (µm)	Espessura da parede do esporo (µm)	Diâmetro da célula esporogênica (µm)	Reação da parede ao Melzer		No. de "paredes germinativas"	Tipos de camadas das "paredes germinativas"		Parede ornam.
	H-B	A-O	AVM-M	P				EST	GER		A	B	
	<i>S. alborosea</i>	Xrosa							204-287		6 - 19	21-50	
<i>S. arenicola</i>		X	X		160 - 360 x 120 - 310	7,1 - 19,8	35 - 47	+	+	1	+	-	-
<i>S. armeniaca</i>		X	X		140 - 240	11,5 - 24,6	32 - 42	+	+	2	+	-	-
<i>S. auriglobosa</i>		X			323 - 438 x 323 - 469	13 - 30	70 - 100 x 40 - 50	?	?	2	-	-	-
<i>S. biornata</i>			X		120 - 490	7 - 29	30 - 65	+	+	1	-	+	+
<i>S. calospora</i>	X	X			120 - 220	7,5 - 18,5	22 - 28	-	+	2	+	-	-
<i>S. castanea</i>	X	X	*ocre		169 - 369 x 176 - 372	14 - 42	38 - 51	+	-	1	-	-	-
<i>S. cerradensis</i>	X	X			220 - 380	13,5 - 39	32 - 45	+	+	2	+	-	+
<i>S. coralloidea</i>			X		260 - 480	8,5 - 13	41 - 62	-	-	1	-	-	+
<i>S. crenulata</i>		X	Xocre		103 - 165 x 116 - 170	13 - 32	22 - 46 x 18,6 - 26,5	+	+	1	+	+	+
<i>S. dipapillosa</i>			X		135 - 180	7,5 - 17,5	27 - 40	?	-	1	-	-	+
<i>S. dipurpurascens</i>		X	X	X	140 - 240	7 - 17,5	21 - 30	-	+	2	+	-	-
<i>S. erythropha</i>				X	160 - 320	8,4 - 18	38 - 50	-	+	3	-	-	-
<i>S. fulgida</i>	X				120 - 240	6,5 - 9,5	20 - 27	+	-	1	-	-	-
<i>S. gilmorei</i>	X				250 - 480	< 18,4	27 - 40	?	?	2	?	?	-
<i>S. gregaria</i>			X		380 - 520	10 - 16	50 - 66	+	-	1	-	-	+
<i>S. hawaiiensis</i>			X		200 - 360 x 180 - 290	10,3 - 39,1	50 - 65	-	+	2	+	-	-

Continuação da tabela 2.

<i>Scutellospora</i>	Cor do esporo				Diâmetro do esporo (µm)	Espessura da parede do esporo (µm)	Diâmetro da célula esporogênica (µm)	Reação da parede ao Melzer		No. de "paredes germinativas"	Tipos de camadas das "paredes germinativas"		Parede ornam.
	H-B	A-O	AVM-M	P				EST	GER		A	B	
<i>S. heterogama</i>			X		120 - 200	9,5 - 17	24 - 28	+	+	2	-	-	+
<i>S. minuta</i>			X		97 - 180	5 - 9	22 - 31	?	?	1?	?	?	+
<i>S. nigra</i>			X	X	297 - 500	8 - 16	40 - 60 x 80 - 120	?	?	1	?	?	+
<i>S. nodosa</i>	X	X			160 - 270 x 160 - 340	23 - 42	25 - 50	+	+	2	+	-	+
<i>S. pellucida</i>	X	X			120 - 240	13,5 - 40	32 - 45	+	+	2	+	-	-
<i>S. persica</i>		X	X		240 - 360	8 - 12	35 - 46	+	-	1	-	-	+
<i>S. projecturata</i>		X	Xocre		102 - 174 x 108 - 181	5,5 - 7	32 - 60 x 29 - 47	-	+	2	+	-	+
<i>S. reticulata</i>			X	X	208 - 470 x 188 - 340	10 - 17	45 - 87 x 84 - 140	?	?	2	+	?	+
<i>S. rubra</i>			X		140 - 220	7 - 12	18 - 35	+	+	2	-	-	-
<i>S. savannicola</i>	X				288 - 581 x 214 - 364	4,5 - 9	< 30	?	?	1?	?	?	-
<i>S. scutata</i>	X	X			340 - 640	19,5 - 56	47 - 90	-	+	3	+	-	-
<i>S. spinosissima</i>		X	X		130-228 x 121-208	(7,5 - 21)	19 - 32	-	+	2	+	-	+
<i>S. tricalypta</i>			X	X	257 - 456	< 17	14 - 47 x 20	?	?	2?	?	?	-
<i>S. verrucosa</i>		X	X		220 - 360	8 - 12	52 - 60	+	-	1	-	-	+
<i>S. weresubiae</i>	Xrosa				125 - 265 x 135 - 414	8 - 26	32 - 50	+	+	2	-	-	-

H-B= hialino a branco; A-O= Amarelo a ouro; AVM-M= amarelo-marrom/vermelho-marrom a marrom; P= preto; Negrito= não considera a parede amorfa no PVLG, porém na água; EST= parede estrutural do esporo; GER= parede germinativa do esporo; A= parede amorfa; B= parede "beaded"; ?= não há dados disponíveis

CONCLUSÕES GERAIS

A realização deste trabalho, dentro das condições conduzidas, permitiu as seguintes conclusões:

- As análises filogenéticas corroboram a hipótese de que o gênero *Glomus* é polifilético.
- As árvores geradas tanto a partir de dados morfológicos, quanto moleculares, suportam a existência das famílias Archaeosporaceae e Paraglomeraceae, bem como a proximidade entre Acaulosporaceae e Gigasporaceae.
- Em nenhuma das árvores obtidas a partir de dados morfológicos, foi possível dar suporte a *Entrophospora* como gênero monofilético.
- *Entrophospora infrequens* e *E. schenkii* devem ter a posição reavaliada, possivelmente sendo inseridas em outra família.
- De acordo com as árvores filogenéticas obtidas a partir de dados morfológicos é possível que *Acaulospora myriocarpa* seja membro de Archaeosporaceae.
- As relações filogenéticas encontradas a partir de seqüências de LSU rDNA sugerem que *G. etunicatum* e *G. claroideum* não são táxons de Glomeraceae e devem ter a posição reavaliada.
- Foi confirmada a importância de primers espécie-específicos na identificação de táxons de Glomeromycota.
- É possível separar em chaves dicotômicas, usando caracteres morfológicos, as espécies de *Scutellospora*; no entanto o mesmo não se aplica para *Gigaspora* dada a similaridade morfológica entre os seus táxons.

ANEXOS

INSTRUCTIONS TO AUTHORS 2002

MYCOLOGIA publishes papers on all aspects of the fungi, including lichens. Subjects appropriate to the journal are physiology and biochemistry, ecology, pathology, development and morphology, systematics, cell biology and ultrastructure, genetics, molecular biology, evolution, applied aspects, and new techniques. Publication in MYCOLOGIA is for both members and nonmembers of the Mycological Society of America. Papers appropriate for the journal are: (i) regular articles reporting original research, (ii) notes or brief articles reporting research or new techniques, (iii) invited papers, (iv) reviews, and minireviews. Authors should consult the Editor before submitting a review manuscript.

Papers are usually limited to 10 printed pages, including tables and illustrations. Exceptions may be made at the discretion of the Editor-in-Chief. Regular articles will be published in the approximate order of their acceptance. After a manuscript has been accepted, the author will receive page proofs and a form for publication charges. Authors will be asked to pay page charges, currently \$40.00. However, payment of page charges is not a condition of acceptance for publication.

GENERAL INSTRUCTIONS

Submit manuscripts to the Editor-in-Chief in triplicate (three electrostatic copies, or an original on white bond paper plus two copies), along with a disk copy (PC-compatible, MS Word). Also enclose a letter requesting publication in MYCOLOGIA signed by the author(s). Manuscripts will be assigned to an Associate Editor and reviewed by at least two reviewers. Authors are invited to suggest names of reviewers for their papers. The Editor-in-Chief will make the final decision on acceptance. When preparing your manuscript consider that you will also submit a revised disk copy as well as hard copy after the review and revision process is completed. Initially prepare your manuscript as follows:

- Neatly typed, clean copy is required. Double space throughout (all parts, including title, addresses, footnotes, legends, tables, literature citations, etc.).
- Use line number guides (left margin) for review copies, but remove them from the final disk copy.
- Identify each page (other than the first) with the first author's name and the page number in the top right margin.
- Leave at least a 2.5 cm margin on all sides.
- All text must be left aligned so that the right margin is uneven (not justified).
- Do not divide words by hyphens at line ends.
- Do not place page breaks between sections except for tables. Tables should be removed from the final disk file.
- Paragraph indents should be consistent throughout the file. Use either the tab key or paragraph indent, not multiple spaces.
- Primary headings should be flush left; remove your word processor's "Center" command.
- Remove all extra vertical space above or below titles, headings or paragraphs. These will be produced by the typesetting codes at the press.
- Do not use hanging indents in the LITERATURE CITED. Place an extra line feed (paragraph mark) between references for improved legibility on the manuscript.
- Boldface, italic, small caps, subscript and superscript commands should be retained. These are normally the only word-processing commands used by the typesetter.

- Distinguish among hyphens (=keyboard hyphen), en dash (=two hyphens), em dash or long dash (=three hyphens) and minus sign (word processor special character). Use en dashes or two hyphens to indicate numerical or page ranges.
- Numbers never use commas, e.g. 1000, 20 500, 1.340 52.
- Use small caps in the words 'table(s), fig(s), and figure(s)'.
- Inquire of the Editor-in-Chief for instructions on how to submit electronic files for half-tone figures if you have digitized figures that require this. See details below for requirements.
- Copies of DNA sequence alignments must be submitted either as hard copies or on disk for review purposes. Alignments will not be published in Mycologia but must be deposited in TreeBASE or similar public database for final acceptance.
- Label the disks with first author's name, manuscript reference number, the computer type, the name and version of the program that created the file, and 'original' or 'revised' as appropriate.
- Microsoft Word or Word Perfect is preferred.
- Manuscripts requiring extensive alterations by the editor will be returned to the author for correction of the computer file.

Manuscripts and text.--Authors should follow the suggestions in the latest edition of the CBE Style Manual and are urged to have one or more colleagues read and criticize the manuscript prior to submitting it. When in doubt about style, abbreviations, or punctuation, refer to recent issues of MYCOLOGIA. A demonstration manuscript illustrating the appearance of manuscript copy follows these Instructions.

Articles include the following items, in this order: short title for running head, title, author(s) name(s) and address(es), abstract, key words, text (with desired headings), acknowledgments, literature cited, figure legends, footnotes and tables. Notes or articles of less than four printed pages, including illustrations, ordinarily will be published as brief articles. The manuscript format should be similar to regular articles, except that no primary headings are used other than to designate LITERATURE CITED. Secondary headings may be used and are encouraged for clarity of organization.

DETAILED INSTRUCTIONS

Short title.--Suggest a phrase of up to 5 main words for a running head.

Title.--Make title short but informative. Omit names of authors of taxa. Omit higher taxonomic categories (phylum, order, family); place these in the abstract or key words. Do not abbreviate. Capitalize only the first word and proper nouns; the rest is lower case.

Authors.--Place each author's name on a separate line followed by the address on a new line. Addresses are italicized and typed as one paragraph. Authors in sequence with the same address have the address after the last author in the sequence. Provide the email address of the corresponding author, if available, in a footnote following the figure legends.

Abstract.--Include an abstract (before the text) in all articles. Identify by the word ***Abstract:*** (note: bold italics) beginning at the left margin with the text immediately following on the same line. The abstract should be written as a single paragraph presenting the salient points of the article. It must stand alone and be informative without the need for reference to the text.

Key Words: Each article must be accompanied by a listing of several key words as an aid to abstracting journals and retrieval. Key words should supplement the title and not duplicate title words. Insert the key words *in alphabetical order* immediately after the abstract on a separate indented line beginning with the designation **Key Words:** (note: bold italics).

Headings.--Primary headings should begin at the left margin. Usual primary headings are INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGMENTS and LITERATURE CITED. Make separate RESULTS and DISCUSSION sections; do not combine into one section. Other headings, such as TAXONOMY and/or taxonomic names, may be used to suit the purposes of the paper. Start second-level headings at left margin--use only as necessary for clarity--italicize (except scientific names) follow by a period and two hyphens (or an en-dash). Third level headings are also italicized, but indented and followed by a period only.

Lists.--Numbered lists in paragraphs should use lower case Roman numerals in parentheses as (i), (ii), (iii) etc. They should be run in a continuous paragraph, not set off as separate paragraphs; see example below.

Abbreviations.--Abbreviations follow the CBE Style Manual. Commonly used abbreviations are as follows: (i) time--yr, mo, wk, d, h, min, s; names of months by first three letters, e.g. Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul (ii) vol--L, mL, μ L; (iii) length--km, m, cm, mm, μ m, nm; (iv) concentration in molarity--M, mM, μ M, nM, pM--differs from molecular amounts--mol, mmol, μ mol, pmol; (v) distinguish g (grams) from g (force of gravity) by italics for the latter; (vi) temperature--C as 28 C, not 28°C, use ° only for angular measures, latitude, and longitude; (vii) *P* = probability (uppercase italics). Notice that singular and plural forms are identical and periods are not used for standard abbreviations. Exceptions are Fig., Figs. Do not abbreviate state or province names, e.g. California, not CA; Ontario, not ON.

Footnotes.--Avoid footnotes in the text if at all possible. If used, number them consecutively and place at the end of the article after the figure legends. Do not use your word processor footnote or endnote command. Do not include acknowledgments in footnotes, except required institutional statements. Lengthy descriptions of tabular material should not be in footnotes to tables, but incorporated into the text. Footnotes to the text use superscript numbers. Footnotes to tables use superscript lowercase letters.

Scientific names.--Italicize only generic, infrageneric (subgenus, section), specific, and infraspecific taxa. Citation of nomenclatural authorities for taxa is optional except for taxonomic papers. When cited, authors of all specific and infraspecific taxa except *forma specialis* should be given, but only when first used in the text or in a table. If authors for taxa are cited in a table, do not repeat in the text. For abbreviation of authors' names, see P. M. Kirk and A. E. Ansell, *Authors of Fungal Names*, 1992.

New taxa, keys, and formal descriptions.--Place names of new taxa flush with left margin in boldface, not italics, followed by author(s) and status (e.g., sp. nov., stat. nov.) in light roman (neither bold nor italics). Follow with brief but descriptive Latin diagnosis (required for all new taxa except fossil forms and bacteria) in paragraph form. Following the English description, designate the type specimen and place of deposit. Authors are responsible for the accuracy of the Latin diagnosis; consult a Latin scholar; the Editor does not check diagnoses. An English description, in paragraph form, follows the Latin. Record measurements as length by width (or diam); place exceptional dimensions in parentheses: (10--12--15(--16.5) \times 5--

6.2 mm. Note spacing and en dashes (two hyphens). Dates preferably should be cited as (example) 10 Aug 1995 or 10-VIII-1995, not 8/10/95. Authors are urged to deposit voucher specimens and to cite those specimens appropriately. Failure to do so may delay the review and publication.

Type titles of keys in all capitals as a primary heading. Keys must be dichotomous, the couplets numbered, and block indented. Leads of first couplet begin at left margin, as do those of third, fifth, etc. Leads of second (fourth, sixth, etc.) are tab indented equal to five spaces. Turnover lines should be justified at left with the preceding line. Normally, keys with four or fewer couplets will be set in one column, while keys of five or more couplets will be set across two columns.

Citing collections.--The following standard format should be used:

Specimens examined. COUNTRY. STATE/PROVINCE: city/town, locality, map coordinates, elevation. Substrate, date (e.g., 10 Aug 1995 or 10-VIII-1995), collector number (italicize or underline collector and collector number) (HOLOTYPE, ISOTYPE etc designations go here when applicable. HERBARIUM). Use the standard recommended abbreviations for herbaria (Holmgren et al 1990. Index herbariorum, 8th ed. Regnum Vegetabile, vol 120). The word HERBARIUM is omitted.

Specimens and molecular sequence data.--Authors are urged to deposit voucher specimens and cultures in public herbaria and culture collections citing these in the paper. Molecular sequence data must be deposited in a molecular sequence repository. MYCOLOGIA will not publish nucleic acid sequences or sequence alignments other than short or very unique sequences. Hard copies or electronic copies on disc should be provided for review. Authors must deposit sequence alignments in TreeBASE at or in a similar public database and cite accession numbers. New sequences must be submitted to GenBank or a similar public database and accession numbers cited.

Illustrations.--Designate all illustrations (photographs, graphs, line drawings) as figures (abbreviate Fig., spell out Figure at beginning of sentence), and number consecutively in Arabic numerals. A plate of drawings or photographs may be treated as one figure with letters for each element or as several figures with each figure numbered consecutively. Do not place numbers on single figures that stand alone. Type figure captions consecutively, in paragraph form following the LITERATURE CITED. See recent issue of MYCOLOGIA for format. Plates and figures should be planned so that the figures are numbered consecutively in the approximate order that they are referenced in the text to allow proper placement of the figures in the printed paper.

Figures must be designed to fit a maximum of 8.2 cm (3.25", one column) or 17.1 cm (6.75", two columns) width by 23.4 cm (9.25") height *including space for the legend after reduction*. Plan figures to use the full one- or two-column width. Figures should be less than the maximum height to permit insertion of the figure legend beneath. Individual graphs usually will be reduced to one-column width. Maximum size of plate submitted, including margins, may not exceed 30 × 43 cm (12 × 17 inches).

Mount photographs on illustration or copy paper, leaving 2.5 cm margins for editorial notations. Trim photographs for composite figures and mount them together without space between. Do not add white rules; the Press will place these. Do not submit loose photographs

or line drawings intended for composite figures. Trim carefully to crop and provide straight margins. Do not include photographs and line drawings in the same composite figure. Write author's name and figure number on the front of each figure. A protective cover sheet should be put over the illustrations to minimize damage in transit.

Number or letter figures by using a lettering instrument or printed graphic art aids. Bars affixed to the figures are preferable to indicate magnifications. The bar scale is given in the legend, not on the figure. If magnifications are inserted in the text, any reduction or enlargement to fit the printed page space must be calculated for accurate presentation in the figure legend. Write magnifications as $\times 1200$, or $\times 45\ 100$, for example. Graphs or line drawings should be grouped consistent with ease of reading after reduction to the maximum plate size.

Numbers and letters for figures, graphs, and drawings should be approximately the same and style size as those in the printed text of MYCOLOGIA, i.e., 10 point type (about 2.5 mm tall). Times Roman or Helvetica are preferred. Use upper and lower case, not all capitals. Reduction or enlargement of numbers and letters should be taken into account when planning figures, graphs, and drawings if they will not be reproduced at the original size. Preferably, graphs and photographs should be done at actual size for printing.

In addition to the original figures (plates), authors must provide three good photographic copies of each original for review purposes. These should be equal, or nearly equal in quality to the originals. Electrostatic copies of photographs are usually unsatisfactory--except for high-quality color copy-machine copies--and will not be accepted. The reviewers copies are reduced to manuscript page size if the originals are larger. Originals may not exceed 30 \times 43 cm (12 \times 17 inches).

Electronic figure submission. Figures scanned or captured electronically must be gray-scale or color image files. Resolution for half-tone plates must be 450—600 dpi. The exact resolution of the files must be provided. Resolution of line art must be 600—1200 dpi. Composite half-tone plates must have the white rules placed between the figures. If figures are submitted electronically, they must be eps or tiff files, sent on CDs or Zip disks.

Tables.--Keep tables to a minimum. Before constructing a table, determine whether the data might be better treated in narrative form in the text. Almost all short tables can be put in such form. Each table begins on a separate page. Tables are numbered in Roman numerals, and the word Table with its number begins at the left margin. The title follows in paragraph form, double-spaced. Titles must be brief. Keep footnotes to an absolute minimum, using superscript lower case letters (not Arabic numerals or other symbols). Omit vertical lines. See MYCOLOGIA for use of horizontal separation lines.

Literature Cited.—Consult *The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*" 6th ed. for style. Cite references in the text by author-date (name-year system). All references must be cited in the text and any extras deleted. Journal citations and abbreviations must follow the RULES FOR ABBREVIATING TITLES in "Scientific style and format. *The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*" 6th ed., p 743—746. When in doubt, provide the complete (unabbreviated) title. Do not include personal communications, unpublished data, Web page URLs, manuscripts or partial page numbers from books and theses in Literature Cited; place such references in the text. Manuscripts must have been formally accepted for publication before they may be cited as "in press." A copy of the letter of acceptance is

required. Cite the journal name and volume number. Type references flush left with no hanging indent. Use three hyphens to replace repeated author(s) name(s). Use two hyphens or an en-dash to indicate page ranges.

Consult a recent issue of MYCOLOGIA for citation style. Examples of the most common forms of citation follow (note spacing and punctuation). See also additional examples in the demonstration manuscript that follows. Note that hanging indents should not be used; the press will set these. To increase readability of the LITERATURE CITED in the manuscript, place an extra line feed (paragraph mark) between references. These are easily removed from the computer file.

Blackwell M, Malloch D. 1989. *Pyxidiophora*: life histories and arthropod association of two species. Can J Bot 67:2552--2562.

---, ---. 1990. Discovery of a *Pyxidiophora* with *Acariniola*-type ascospores. Mycol Res 94:415--417.

Heath IB. 1987. Fluorescent staining of fungal nuclei. In: Fuller MS, Jaworski A. eds. Zoosporic fungi in teaching and research. Athens, Georgia: Southeastern Publishing Corp. p 169--171.

Hetrick BAD, Wilson GWT, Todd TC. 1990. Differential responses of C3 and C4 grasses to mycorrhizal symbiosis, P fertilization, and soil microorganisms. Can J Bot 68: in press.

Lehnen LP Jr. 1988. Development and cytochemistry of kinetosome-associated organelles in *Saprolegnia ferax* [PhD Dissertation]. Oxford, Ohio: Miami Univ. 171 p.

Ridgway R. 1912. Color standards and color nomenclature. Washington, DC: Publ. by the author. 43 p., 53 pl.

Singer R. 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed. Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books. 981 p.

Mycorrhiza

Visit our homepage at:

<http://link.springer.de/journals/myco>

Instructions for authors

1. The author(s) transfer(s) the copyright to their article to Springer-Verlag, effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form (printing, electronic media or other); it also covers translation rights for all languages and countries. For U.S. authors the copyright is transferred to the extent transferable.

Manuscripts must be written in English.

Please submit manuscripts in triplicate, typed double-spaced; (printed on only one side of the sheet) with one set of original illustrations. **Manuscripts must be accompanied by the "Copyright Transfer Statement" (the form is regularly published in this journal).**

Short notes must not exceed 6 manuscript pages ca. 26 880 characters (plus 1 table, 1 illustration and legend) and should be accompanied by a brief explanation of their novelty and significance.

Rejected manuscripts will be returned to the authors only if they contain important original comments from the referees, unless specifically requested by the authors. Original illustrations will always be returned.

Manuscripts in electronic form. Authors are strongly encouraged to send the final version of their manuscript – after acceptance for publication – in electronic form. Please follow the special technical instructions as printed in most issues of this journal.

Manuscripts from the Americas, East and Southeast Asia and Australasia should be submitted to:

Prof (Frank) Andrew Smith
University of Adelaide
School of Earth and Environmental Sciences
Soil and Land Systems
GLEN OSMOND, SA 5005, Australia
Fax: (+61)883036511
e-mail: andrew.smith@adelaide.edu.au

Manuscripts from all other countries should be submitted to:

Vivienne Gianinazzi-Pearson
UMR 1088 INRA-U. Bourgogne and FRE
CNRS 2625 Plante-Microbe-Environnement
INRA-CMSE
BP 86510
21065 Dijon cédex, France
Fax: (+33) (0) 380 69 37 53
e-mail:
Vivienne.Gianinazzi-Pearson@epoisses.inra.fr

2. The **title page** should include:

- name(s) of author(s)
- title of paper
- affiliation(s)
- any footnotes referring to the title
- address for correspondence

To facilitate communication, between the authors, editors and publisher, the author(s) should also furnish a fax number and e-mail address on this page.

3. The material must be arranged as follows:

- Abstract
- Key words (up to 5)
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgement(s)
- References
- Tables
- Figure legends

For details of presentation, a recent issue of the journal should be consulted.

4. **Footnotes** to the title of the paper appear without a symbol; those to the text are numbered consecutively: footnotes to tables should be with lowercase letters, except those referring to statistical values, where asterisks are used.

5. **Genus and species** names should be in italics. Authorities must be given for all cultures, strains or isolates used in the published work and these should be identified by a culture collection number for use by others.

6. **Symbols** should be used consistently in figures, tables and text (lowercase or capital letters, arabic or roman numerals).

7. **Tables** must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text at the end of the paper. Each table should have a short title.

8. **Statistical analyses** of data should be given, with the test of significance used and the estimate of probability.

9. **References.** Only work that is cited in the text and that has been accepted for publication should be listed at the end of the paper in alphabetical order under the first author's name. Papers by two authors should be listed alphabetically according to the second author's name. Publications by three or more authors should be listed chronologically. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, c, etc. is added to the year both in the text and in the list of references.

Examples:

- Sylvia DM (1992) Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds) *Techniques for the study of mycorrhiza*. (Methods in microbiology, vol 24) Academic Press, London, pp 53–65
- Tam PCE (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 5:181–187
- Varma A, Hoek B (eds) (1995) *Mycorrhiza*. Structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York

References should be cited in the text as follows:

"Marks and Kozłowski (1973)" or "(Harley 1984)." If there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

10. **Illustrations** must be restricted to the minimum needed to clarify the text. Previously published illustrations are usually not accepted. Data given in graphs or tables should not be repeated in the text. All figures, whether photographs, graphs, or diagrams, must be mentioned in the text, and the top of the figure, the title of the paper, the author's name, and the figure number should be marked lightly on the reverse side in soft pencil. All figures are to be numbered consecutively throughout and submitted separately. The figures should match either the column width (8.6 cm) or the printing area (17.6x23.6 cm). Whenever possible, several figures should be grouped into a plate.

Illustrations prepared in digital form must be in accordance with the technical instructions for manuscripts and illustrations in electronic form that are published in this journal.

10.1 **Line drawings.** High-quality prints or good originals should be submitted. The inscriptions should be clearly legible. Letters 2 mm high are recommended. Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings. Computer-drawn lines and curves must be smooth.

10.2 **Halftone illustrations.** Sharp, well-contrasted photographic prints trimmed at right angles and in the desired final size should be submitted. If reduction is absolutely necessary, the scale desired should be indicated. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

10.3 For **color illustrations** the authors will be expected to make a contribution (€ 485 or US \$ 435, plus 16% VAT per article) towards the extra costs.

11. **Legends** must be short and appended to the text. They should provide a brief, self-sufficient description of each illustration.

12. **Proofreading.** In the interest of rapid publication, the author(s) will receive the page proofs only for the correction of typographical errors. The corrected proofs must be returned within 3 days of receipt. Should extensive alterations be necessary, correction costs may be charged to the author(s).

13. **Fifty offprints** of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form with the corrected proofs. You are then entitled to receive a pdf file of your article for your own personal use.

14. **Electronic supplementary material.** Data such as black and white or colour illustrations, large tables, animations, video clips, or sound recordings, that are not essential for the understanding of a printed article but yet of interest can be put on Springer-Verlag's server and will be accessible free of charge on the contents site of this journal. Such material has to be submitted in electronic form (see the special instructions that are regularly published in this journal) and will also be reviewed. Reference to this material will be given with the printed article.



Springer