**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de
cana-de-açúcar**

Lucas Carvalho Basilio de Azevedo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2008**

Lucas Carvalho Basilio de Azevedo
Engenheiro Agrônomo

Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. **MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas.

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Azevedo, Lucas Carvalho Basilio de
Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar /
Lucas Carvalho Basilio de Azevedo. - - Piracicaba, 2008.
110 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cana-de açúcar 2. Ecologia do solo 3. Micorriza 4. Raízes 5. Sequenciamento genético
I. Título

CDD 633.61
A994c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICO

A Deus;

Aos meus pais, Marlene e Erasmo, aos meus irmão, Mateus, Ana Julia e Maria Luiza;

Aos meus avós, tios e tias;

Pelo apoio e incentivos recebidos, sendo essenciais para essa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa no início do Curso, à FAPESP pela bolsa concedida no restante do curso, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo para estágio no exterior por 5 meses.

Ao Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais, pela orientação e incentivo ao longo do curso.

Ao Dr. Prof. Ari Jumpponen (Kansas State University, Manhattan, KS, USA), por ter me acolhido e me recebido nos EUA, pela amizade, pela sua constante confiança em nosso trabalho e pelo seu incentivo à vida profissional.

Ao Dr. Prof. Sidney Luiz Stürmer por ter realizado o árduo trabalho de identificação dos esporos de FMAs, parte essencial desse trabalho.

Ao Dr. Prof. Francisco de Sousa, por disposição em ajudar com discussões e esclarecimentos sobre os trabalhos pela internet.

À Prof. Dra. Elke J.B.N. Cardoso pela concessão do material do laboratório de Microbiologia do Solo e material da Coleção de FMAs, além do constante apoio, disposição para atender aos alunos e pela confiança depositada em mim.

À parte essencial de minha vida, portanto, desse trabalho também:

Meu Pai Erasmo, minha Mãe Marlene, meus irmãos Mateus, Ana Julia e Maria Luiza, aos meus avós Florinda, Naziozeno (*in memorian*) e Quitéria, aos meus tios Maria Elena, Malu, Ismael (*in memorian*), Raquel, Israel e Maria Aparecida que sempre me incentivaram, acreditando e investindo em mim.

Agradeço especialmente à Simone, por sua confiança, apoio, paciência e por sua companhia e incentivo.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia Luis Fernando Baldesin, Wladimir Rosignolo e, especialmente, à Denise de Lourdes C. Mescolotti pela ajuda nos experimentos em laboratório.

Ao Dr. José Pereira Silva Júnior, pela amizade, esclarecimentos e ajuda na elaboração do projeto.

Aos colegas e amigos durante a jornada de doutorado: Adriano Lucheta, Alessandra de Paula, Alexandre Martines, André Nakatani, Carolina Baretta, Christie Monteiro, Daniel Lammel, Daniele Takahashi, Denise Santos, Dilmar Baretta, Eduardo Armas, Elaine Malosso,

Flávio Alves, Flávio de Paula, Gisele Lopes, Giselle Gomes, Hélio, Jackson Lange, Julianio Cury, Karina Cenciani, Luiz Fernando Romanholo, Magnus, Marcela Arnaldo, Márcio Moraes, Pablo Hardoim, Rafael Armas, Rafael Leal, Rafaela, Robinson Moresca, Simão Lindoso, Sandra, Soraya Kiriachek, Winston, todos estagiários e demais amigos não mencionados aqui.

Aos amigos que encontrei e que me acolheram em Manhattan: Adelaide, Altair, Ana, Anand, Daniel, Dave, David, Fellipe, Flávia, German, Greg, Keerthi, Lia, Leila, Lorena, Maria, Michael, Nicolas, Renata, Thais, William

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão bibliográfica.....	12
2.1.1 Micorrizas Arbusculares.....	12
2.1.2 Estudo de comunidades de fungos micorrízicos arbusculares.....	13
2.1.3 Taxonomia e identificação molecular de fungos micorrízicos arbusculares.....	16
2.2 Material e métodos	19
2.2.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes	19
2.2.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs	24
2.2.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita.....	27
2.2.3.1 Análises químicas do solo	28
2.2.3.2 Extração de esporos de FMAs do solo	29
2.2.3.3 Colonização micorrízica intrarradicular	29
2.2.3.4 Análise do gene rRNA 18S fúngico em raízes de cana-de-açúcar	30
2.2.3.4.1 Amplificação do gene rRNA 18S de fungos gerais e FMAs.....	30
2.2.3.4.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs em cana-de-açúcar	31
2.2.3.4.3 Purificação dos <i>amplicons</i>	32
2.2.3.4.4 Clonagem dos amplicons do gene rRNA 18S	33
2.2.3.4.5 Extração do DNA plasmidial.....	33

2.2.3.4.6 Sequenciamento dos clones do gene rRNA 18S	34
2.2.3.4.7 Análise de sequências do gene rRNA 18S	35
2.3 Resultados e Discussão.....	36
2.3.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes	36
2.3.2 Desenho e validação de iniciadores específicos para grupos de FMAs	41
2.3.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita.....	56
2.3.3.1 Atributos químicos do solo.....	56
2.3.3.2 Produtividade da cana-de-açúcar.....	59
2.3.3.3 Fungos micorrízicos arbusculares no solo.....	60
2.3.3.4 Colonização micorrízica intrarradicular	70
2.3.3.5 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS7e F1Ra em raízes de cana-de-açúcar	73
2.3.3.6 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS31 e AM1 em raízes de cana-de-açúcar	78
2.3.3.7 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores específicos para grupos de FMAs em raízes de cana-de-açúcar.....	83
3 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101

RESUMO

Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs, filo Glomeromycota) formam associações simbióticas com a maioria das plantas vasculares. Normalmente, as hifas dos FMAs crescem no solo e colonizam o interior das raízes. No entanto, não se sabe se as espécies mais abundantes detectadas no solo, por meio da identificação com base na morfologia dos esporos assexuais, são também as mais abundantes no interior das raízes, devido às dificuldades para a identificação dos FMAs com base nas estruturas intrarradiculares. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade de FMAs em cana-de-açúcar sob dois manejos de colheita por meio da identificação das espécies que estão no solo na forma de esporos assexuais e aquelas que estão nas raízes usando o sequenciamento de clones do gene rRNA 18S. Amostras de solo e raízes de cana-de-açúcar de três variedades e dois manejos de colheita: SEM QUEIMA prévia e COM QUEIMA prévia à colheita, foram coletadas em um experimento localizado no município de Novo Horizonte, SP. Foram utilizadas três abordagens para a identificação dos FMAs no interior das raízes: emprego de (1) iniciador específico para fungos em geral, (2) iniciador específico para FMAs e (3) iniciadores específicos para grupos de FMAs. O número de esporos por 50 g de solo, a riqueza de espécies observada e estimada e a diversidade de esporos não diferiram significativamente entre os manejos SEM QUEIMA e COM QUEIMA. Efeitos significativos de variedades de cana-de-açúcar ou na interação dos fatores manejo e variedade não foram observados. A análise de ordenação com base nos esporos identificados também não indicou separação das amostras em função dos tratamentos. Entretanto, plantas do tratamento sob manejo SEM QUEIMA apresentaram as maiores taxas de colonização micorrízica arbuscular, quando comparadas às plantas do tratamento sob manejo COM QUEIMA. Esses dados indicam que a taxa de colonização micorrízica arbuscular é um indicador mais sensível à mudança de manejo de colheita da cana-de-açúcar do que os outros indicadores avaliados. Após a extração de DNA das raízes, o uso dos iniciadores específicos para fungos em geral, para FMAs e iniciadores específicos para grupo de FMAs não resultou em sequências de Glomeromycota. Mesmo assim, a comunidade de fungos associados às raízes detectada por sequenciamento do gene rRNA 18S foi avaliada. Os resultados indicam que a estrutura da comunidade fúngica associada às raízes de cana-de-açúcar diferiu significativamente entre os manejos de colheita SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia, apesar de não haver diferenças na riqueza e índices de diversidade de unidades taxonômicas operacionais observadas. Em geral, estudos adicionais devem ser feitos para otimizar as condições para amplificação do gene rRNA 18S de FMAs para melhor entender a ecologia dos mesmos.

Palavras-chave: Micorriza arbuscular, rRNA18S, Ecologia, Fungos

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi communities in soil and sugarcane roots

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, Glomeromycota) form mutualistic symbioses with most land plants. AMF hypha generally grow through the soil and colonize the cortical tissue of the plant roots. However, it is not known whether the most abundant species in the soil, determined based on the morphology of asexual spores are the most abundant inside the roots, due the difficulties in identifying AMF based on intraradical structures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the AMF community structure in sugarcane rhizosphere and roots under two harvesting managements, based on spores in the soil and sequencing of 18S rRNA gene clones, respectively. Sugarcane rhizosphere soil and roots were sampled from three varieties, under two harvesting managements: without pre-harvesting burning and with pre-harvesting burning, at an experimental field located in Novo Horizonte (São Paulo, Brazil). Three approaches were used to identify AMF inside the roots: (1) using fungi-specific primers, (2) using AMF-specific primers and (3) using AMF group-specific primers. The number of spores in the soil, the observed and estimated species richness and the diversity of AMF spores in the treatments without and with pre-harvesting burning were not statistically different. Statistically significant effects of sugarcane varieties or the interaction of the factors Harvesting Management and Varieties were not observed. Ordination analysis based on the identified spores did not show clustering by treatments. However, intraradical root colonization rates were higher in the treatment without pre-harvesting burning, as compared to the treatment with pre-harvesting burning. These data indicate that intraradical colonization rate may be used as a more sensitive indicator of environmental changes due to harvesting management, as compared to the other indicators evaluated. The use of fungi-specific, AMF-specific and AMF group-specific primers did not allow the detection of Glomeromycota in the sugarcane roots sampled from the field experiment. Nonetheless, the fungal communities associated with sugarcane roots detected by 18S rRNA gene clone sequencing were evaluated. The results indicate that the fungal communities associated with sugarcane roots from the treatments without and with pre-harvesting burning were statistically different, even though no differences in operational taxonomic unit richness and diversity indices were observed. In general, additional studies are necessary to optimize AMF 18S rRNA gene amplification for a better understanding of their ecology.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza; 18S rRNA; Ecology; Fungi

1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam associações simbióticas com a maioria das plantas vasculares terrestres (SMITH; READ, 1997), incluindo algumas de importância econômica para o homem (O'CONNOR; SMITH; SMITH, 2002). A associação micorrízica geralmente propicia melhor desenvolvimento vegetal devido ao aumento de absorção de água e nutrientes, principalmente fósforo (P) pelas hifas do FMA. O fungo recebe, em troca, fotoassimilados e fatores de crescimento necessários para completar o seu ciclo de vida (SMITH; BARKER, 2002).

Entre as plantas que formam micorrizas arbusculares, está a cana-de-açúcar, uma cultura de grande importância econômica no Brasil (MAPA, 2008). A expansão das áreas cultivadas com cana-de-açúcar tem sido incentivada pelo interesse na produção de álcool para uso como combustível alternativo. Previamente à colheita, parte dessa área cultivada é queimada, podendo contribuir para o aumento de gases poluentes e responsáveis pelo efeito estufa. Assim, a prática de colheita da cana-de-açúcar sem queima vem ganhando interesse, por causar menores impactos ambientais. No entanto, os efeitos dessa alteração do manejo da cultura de cana-de-açúcar sobre a microbiota dos solos são poucos conhecidos.

O uso da microbiota edáfica como indicador de impactos ambientais tem sido extensivamente discutidos (NIELSEN; WINDING, 2002; LAMBAIS et al., 2005; BUNEMANN; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, 2006; FLIEßBACH et al., 2007; FRANCHINI et al., 2007). Nesse contexto, alterações na estrutura da comunidade de FMAs poderiam ser indicadores de estresses ambientais. No entanto, para o eficiente uso dos FMAs como indicadores de estresses ambientais, é necessário identificar as espécies presentes no ecossistema, tanto em associação com o vegetal como no solo. A identificação dos FMAs é normalmente feita com base na morfologia dos esporos, pois as estruturas intrarradiculares de diferentes espécies não podem ser diferenciadas morfológicamente. O uso de técnicas moleculares é uma alternativa para superar essas dificuldades e viabilizar o estudo da ecologia dos FMAs. Para a investigação de comunidades de FMAs, iniciadores específicos para amplificar fragmentos do gene rRNA e/ou espaços intergênicos têm sido usados (HIJRI et al., 2006; SANTOS-GONZÁLEZ; FINLAY; TEHLER, 2007; LEE; LEE; YOUNG, 2008).

Entretanto, a amplificação de fragmentos do gene rRNA 18S de FMAs por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) ainda é limitada, pois os iniciadores existentes não amplificam o DNA

de todos os organismos do filo Glomeromycota. Essa ineficiência pode ser resultado do baixo número de sequências do gene rRNA 18S disponíveis para o desenho de iniciadores específicos. Alternativamente, se iniciadores mais genéricos fossem usados, a aplicação dos métodos de sequenciamento em larga escala do gene rRNA 18S (rDNA) de amostras ambientais poderia contornar o problema de especificidade dos iniciadores.

Assim, os objetivos deste estudo são: (1) avaliar métodos de extração de DNA e desenvolver métodos de amplificação por PCR e sequenciamento de clones de fragmento do gene rRNA 18S para a análise de comunidades de FMAs; (2) investigar a diversidade e a estrutura das comunidade de FMAs no solo rizosférico e raízes de cana-de-açúcar, utilizando a técnica desenvolvida neste estudo em condições de campo e, (3) determinar os efeitos da queima da cana-de-açúcar prévia à colheita na diversidade e estrutura das comunidades de FMAs.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Micorrizas Arbusculares

As micorrizas arbusculares (MAs) são associações entre certos fungos do solo e uma grande parte das plantas vasculares. Esta associação é encontrada em cerca de 70% de espécies vegetais, e está distribuída em vários ecossistemas terrestres (SMITH; READ, 1997). As MAs têm importância para a nutrição vegetal, e ocorrem na maioria das espécies cultivadas pelo homem (BURROWS; PFLEGER, 2002; O'CONNOR; SMITH; SMITH, 2002).

Os FMAs pertencem ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes, a qual possui 4 ordens, 10 famílias e 13 gêneros, com aproximadamente 180 espécies descritas (SCHÜSSLER, 2008). Esses fungos colonizam o córtex das raízes crescendo inter- e intracelularmente. Em certo momento da simbiose há uma intensa divisão dicotômica do ápice da hifa no interior de células corticais, formando o arbúsculo, estrutura possivelmente responsável pela troca de nutrientes entre os simbioses (BONFANTE-FASOLO, 1984). Em estádios mais tardios da colonização há formação de vesículas, estruturas intrarradiculares com suposta função de reserva de lipídios, e formação de esporos no solo ou no interior das raízes.

Os FMAs, em associação com o vegetal, conectam o solo com as raízes, aumentando o volume de solo explorado, e ultrapassando a zona de depleção de alguns nutrientes. Assim, os benefícios nutricionais são proporcionados pela maior absorção de elementos minerais, especialmente aqueles pouco móveis no solo, como P, além de Zn e Cu (COLOZZI-FILHO; BALOTA, 1994; SIQUEIRA, 1996). Dessa forma, em consequência da melhoria do estado nutricional da planta, a associação micorrízica pode trazer uma série de benefícios para o hospedeiro vegetal, como a redução dos estresses de origem biótica e abiótica (QUILAMBO et al., 2005; COLLA et al., 2008) e aumento da taxa fotossintética (SHENG et al., 2008). Há evidências de que as MAs aumentam também a absorção de água (ALMEIDA, 1985; AL-KARAKI; MCMICHAEL; ZAK, 2004; AUGÉ et al., 2004), conferindo às plantas maior tolerância ao estresse hídrico. O micélio crescendo no solo contribui para o aumento da agregação das partículas do solo, por meio do enovelamento das hifas e produção de glomalina (NÓBREGA et al., 2001). A intensidade e a qualidade dos efeitos das MAs nas plantas e solo

dependem da interação entre os genomas da planta, do fungo, e destes com o ambiente. Porém, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, principalmente P, a maior eficiência simbiótica promove uma maior conservação de nutrientes no agroecossistema. Sendo a simbiose mutualista, os FMAs também se beneficiam, recebendo fotoassimilados que necessitam para completar seu ciclo de vida. Dessa forma, a base do mutualismo das MAs é a transferência bidirecional de nutrientes entre os simbiontes (SMITH; BARKER, 2002).

As MAs são especialmente importantes nos ecossistemas de regiões tropicais, uma vez que nos solos dessas regiões, boa parte do P está fortemente associada a óxidos de ferro e alumínio, acarretando uma baixa disponibilidade para as plantas. O estudo da ecologia dos FMAs nos solos apresenta, no entanto, uma série de limitações, impostos principalmente pela impossibilidade de se cultivar os FMAs *in vitro*.

2.1.2 Estudo de comunidades de fungos micorrízicos arbusculares

Os estudos de comunidades de FMAs tem aumentado ao longo dos anos (KOYDE; MOSSE, 2004) em face dos efeitos benéficos das MAs para a nutrição das plantas e para a conservação de ecossistemas. Segundo demonstrado por Heijden et al. (1998), o aumento da riqueza de espécies de FMAs no solo aumenta a diversidade vegetal, a entrada de nutrientes e a produtividade do ecossistema. Por outro lado, existem indicativos de que a comunidade vegetal também pode influenciar as comunidades de FMAs (JOHNSON et al., 2003). Por suas funções nos ecossistemas, as comunidades de FMAs podem ser usadas para monitorar alterações na qualidade do solo em função de eventos de práticas de manejo agrícola (NIELSEN; WINDING, 2002; LAMBAIS et al., 2005; FLIEßBACH et al., 2007).

Alguns dos distúrbios impostos ao ambiente podem causar alterações nas comunidades de FMAs que perduram durante anos, dependendo de como ela é manejada. Moreira et al. (2007) utilizaram atributos ecológicos, com base nas comunidades de FMAs na forma de esporos no solo, para distinguir uma floresta nativa de uma área reflorestada com Araucária há 18 anos, e tendo pasto sob as árvores. As duas áreas foram discriminadas com base em análise discriminante canônica, sendo que o índice de Diversidade de Shannon de FMAs foi o atributo ecológico que mais contribuiu para a distinção da área de floresta nativa e a área reflorestada. Foram identificadas 27 espécies de FMAs nas duas áreas, sendo que a área natural apresentou maior

diversidade e número total de esporos do que a área reflorestada. Os autores sugerem que a ausência de distúrbios e a maior diversidade de plantas tenha contribuído para a maior diversidade e abundância de FMAs.

As práticas agrícolas podem influenciar de forma significativa a composição da comunidade de FMAs na forma de esporos no solo. Mathimaran et al. (2007) avaliaram os efeitos de cinco anos de rotação de culturas sobre a comunidade de FMAs em um Ferralsol no Kenya. Havia dois tratamentos de plantio: rotação de milho com crotalária, e plantio contínuo de milho; e dois tratamentos de adubação: com ou sem adubação fosfatada. Os autores acessaram a comunidade por meio da extração e identificação de esporos e por sequenciamento da subunidade maior do gene rRNA de esporos de cultura armadilha. A diversidade de FMAs não foi afetada pelos manejos de plantio ou pela adubação de P. No entanto, a abundância relativa de espécies foi maior para o tratamento com rotação de cultura.

Em determinadas situações, a mudança do manejo da lavoura pode não levar a mudanças na comunidade de FMAs. O efeito do manejo de cultivo convencional e orgânico de pomares e viveiros de citros sobre as comunidades de FMAs foi avaliado por Focchi et al. (2004). Em 36 amostras de 6 pomares, dois viveiros e uma área de mata nativa, foram recuperadas 26 espécies de FMAs. Os autores não encontraram diferenças nas comunidades de FMAs em função do manejo adotado, embora práticas conservacionistas, como rotação de culturas, possam contribuir para o aumento da diversidade e riqueza de FMAs no solo (DOUDS; JANKE; PETERS, 1993; ROSALES; VALDÉZ, 1996).

Outro fator que pode causar alterações da estrutura da comunidade de FMAs é a queima da biomassa vegetal. Eom et al. (1999) estudaram a comunidade fúngica em uma pradaria dos EUA de 9 anos sob diferentes tratamentos: regimes de queima, corte da cobertura vegetal e adubações nitrogenadas e/ou fosfatadas. Os autores coletaram esporos para identificação morfológica e raízes para determinação da colonização micorrízica e verificaram que a queima anual diminuiu a diversidade de FMAs, mas não a abundância de esporos e a colonização intrarradicular. As interações dos tratamentos de queima, roçagem da cobertura vegetal e adubação resultaram em mudanças de diversidade e abundância de FMAs, mostrando que essas práticas influenciam os fatores do solo, como teor de N e umidade, os quais podem alterar a comunidade de FMAs (EOM et al., 1999).

Poucos trabalhos existem na literatura que tenham estudado a interação de FMAs com cana-de-açúcar. Paula et al. (1991) estudaram a interação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* com *Glomus clarum* em três culturas, incluindo a cana-de-açúcar. Os autores verificaram que a inoculação do FMA junto com uma mistura de bactérias diazotróficas resultou em maior colonização micorrízica e maior população de *G. diazotrophicus* na parte aérea da cana-de-açúcar, o que evidencia um sinergismo entre os dois microrganismos. Gosal, Gupta e Gosal (2001) verificaram que a inoculação com FMAs em cana-de-açúcar micropropagada aumentou a sobrevivência após transplante das plantas para o solo em relação às plântulas não micorrizadas.

Alguns trabalhos investigaram a influência dos FMAs no desenvolvimento da cana-de-açúcar em condições de campo. Foi observada que a resposta dessa cultura à MA, aos 83 dias após o plantio, é baixa (KELLY et al., 2001; 2005). Por outro lado, Reddy et al. (2004) verificaram aumento do crescimento da cana-de-açúcar com inoculação de alguns FMAs, aos 40 e 80 dias após o plantio. Em outro estudo, foi observado que a produção de cana-de-açúcar é maior com a inoculação de FMAs somente em tratamentos com adubação inferior de nitrogênio, fósforo e potássio, comparada à cana-de-açúcar sem inoculação (QUILLOY; LANSANG, 1992)

Apesar desses trabalhos com cana-de-açúcar, nenhum deles avaliaram os efeitos dos FMAs na produção final e na qualidade do produto, como os teores de açúcar. Além do que na maior parte dos estudos foi aplicada apenas uma variedade de cana-de-açúcar. Existe apenas um artigo (REIS; PAULA; DÖBEREINER, 1999) e uma dissertação de mestrado (ANDREOLA, 1982) investigando a comunidade de FMAs em cana-de-açúcar em condições de campo. Reis, Paula e Döbereiner (1999) estudaram 14 variedades de cana-de-açúcar em diversas lavouras no estado do Rio de Janeiro e em Pernambuco. Esses autores encontraram um total de 18 espécies de FMAs na forma de esporos e indicações de que a prática da queima do canavial antes da colheita pode reduzir a diversidade de FMAs. Andreola (1982) analisou um ensaio de adubação nitrogenada e fosfatada e aplicação de vinhaça em cana-de-açúcar, sobre um Latossolo no município de Araras, SP, ao longo de 13 meses. O autor verificou maiores números de esporos e taxa de colonização micorrízica arbuscular nos meses com maior precipitação pluviométrica. Já a aplicação de vinhaça e a adubação nitrogenada e fosfatada não mudaram o número de esporos no solo e a taxa de colonização micorrízica arbuscular. Assim, os resultados de Andreola (1982) mostram variação de esporos e taxa de colonização micorrízica em função da pluviosidade, e ausência de resposta à aplicação de vinhaça ou adubos fosfatados e nitrogenados.

Portanto, considerando os poucos trabalhos no assunto, e a importância da cultura para o Brasil, é também importante o conhecimento sobre a comunidade de FMAs associada à cana-de-açúcar e os efeitos sofridos por essa comunidade em razão de mudanças de manejo ou alterações do ambiente.

2.1.3 Taxonomia e identificação molecular de fungos micorrízicos arbusculares

A taxonomia dos FMAs é feita com base na morfologia e ontogenia de esporos assexuais, como tamanho, cor, forma, número de paredes, características da hifa de sustentação, etc (Figura 1). Devido à semelhança das estruturas fúngicas intrarradiculares não é possível a identificação de espécies com base nas mesmas. Assim, existem vários limitantes para o estudo da ecologia dos FMAs em condições de campo. A morfologia e a produção dos esporos são dependentes do estágio fisiológico da planta hospedeira e das condições ambientais. A magnitude da esporulação no solo pode não refletir o grau de colonização das raízes. Assim, uma espécie de FMA pode esporular abundantemente no solo, mas colonizar uma pequena proporção do sistema radicular da planta. Em contraste, uma espécie que colonize uma grande proporção do sistema radicular pode não produzir um grande número de esporos (REDECKER; HIJRI.; WIEMKEN, 2003). Essas informações sugerem que as espécies mais abundantes na forma de esporos no solo podem não representar as mais abundantes no interior das raízes (CLAPP et al., 1995 e ROSENDAHL; STUKENBROCK, 2004). As dificuldades nos estudos de ecologia de FMAs tornam-se ainda maiores devido ao fato dos mesmos serem biotróficos obrigatórios e não serem passíveis de cultivo *in vitro*. O uso de culturas armadilhas ou raízes transformadas para a multiplicação de FMAs seria uma alternativa, mas essa abordagem é trabalhosa e geralmente demanda longo tempo, além de existir a possibilidade de seleção de espécies de FMAs pela planta hospedeira usada (CARRENHO; TRUFEM; BONONI, 2002).

Os esforços para identificar espécies, conhecer a diversidade e a dinâmica de comunidades de FMAs são cada vez maiores devido aos seus impactos na organização e produção de ecossistemas, incluindo agroecossistemas. Para contornar tais problemas, uma alternativa seria o uso de técnicas moleculares independentes de cultivo (REDECKER; HIJRI.; WIEMKEN, 2003; STUKENBROCK; ROSENDAHL, 2005; HEMPEL; RENKER; BUSCOT, 2007). Por meio da análise de certas regiões do DNA de FMAs é possível estabelecer relações filogenéticas entre

diferentes filotipos encontrados em amostras de solo e/ou raízes e definir a dinâmica populacional da área de estudo, por exemplo. Com o emprego da técnica da PCR, é possível produzir relativamente grandes quantidades de DNA para análise, a partir de amostras com concentrações ínfimas de DNA total. Assim, o uso da PCR revolucionou os estudos de filogenia e diversidade genética de FMAs, já que os mesmos não podem ser cultivados axenicamente. Análises genéticas têm permitido a identificação de FMAs em raízes colonizadas, bem como a definição das relações filogenéticas de isolados de FMAs na forma de esporos (RENKER et al., 2003; SHEPHERD et al., 2007; CROLL et al., 2008).

Figura 1 – Características morfológicas utilizadas para a identificação taxonômica de FMAs. **A**, esporo de *Glomus etunicatum*, mostrando a hifa de sustentação (“subsuming hypha”) e uma camada da parede do esporo (“L2”); **B**, esporos de *Glomus claviforme* em esporocarpio, mostrando a rede de hifas (“hyphal plexus”); **C**, placa (ou escudo) de germinação presente em esporo de *Scutellospora scutata*; **D**, detalhe de ornamentação da parede externa de um esporo de *Acaulospora denticulata*. Fonte: INVAM (2008)

Sequências do gene rRNA 18S têm sido utilizadas para a identificação taxonômica de FMAs (HELGASON et al., 1998; ROSENDAHL; STUKENBROCK, 2004), a qual,

normalmente, coincide com a taxonomia baseada em morfologia dos esporos (MORTON; REDECKER, 2001; SCHWARZOTT; WALKER; SCÜSSLER, 2001; WALKER et al., 2004). Alternativamente, os espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*), sequências que separam os genes rRNA 18S, 5.8S e 25S/28S, também podem ser utilizados para estudos filogenéticos. Porém, as sequências dos ITS de FMAs são altamente variáveis devido à grande variabilidade genética dos núcleos dos esporos (SANDERS et al., 1995; LLOYD-MACGILP et al., 1996), o que pode inviabilizar a identificação de espécies com base nessas sequências.

O uso de PCR para amplificar fragmentos do gene rRNA 18S de FMAs ainda é limitado. O iniciador AM1 (HELGASON et al., 1998), geralmente utilizado nos estudos de comunidades de FMAs, não amplifica o DNA de todas as espécies de FMAs, e pode amplificar o DNA de alguns fungos que não pertencem ao filo Glomeromycota (REDECKER, 2000; DOUHAN et al., 2005 LEE; LEE; YOUNG, 2008). Outro iniciador utilizado para estudos de ecologia/filogenia de FMAs é o VANS1. Porém esse iniciador é complementar a uma região não muito conservada do gene rRNA 18S de Glomeromycota (SIMON; LALONDE; BRUNS, 1992; SCHÜSSLER et al., 2001) e pode não amplificar o DNA de todas as espécies de Glomeromycota. A eficiência dos iniciadores para PCR depende do número de sequências de diferentes espécies usadas para defini-los. De acordo com as bases de dados integradas pelo Centro Nacional de Informação para Biotecnologia (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), no ano de 2006 existiam cerca de 3.800 sequências do gene rRNA 18S de fungos Glomeromycota depositadas, e aproximadamente 49.000 sequências de fungos de outros filos. Já em 2008, aproximadamente 6.500 sequências do gene rRNA 18S de Glomeromycota e 86.000 sequências de fungos de outros filos estavam disponíveis.

Uma vez que as informações sobre sequências do gene rRNA 18S na base de dados do NCBI têm aumentado constantemente, com maior número tanto de sequências alvo como não-alvo, o desenho de novos iniciadores específicos mais eficientes se torna possível. No entanto, como o filo Glomeromycota é bastante diverso para os genes rRNA, uma alternativa seria o desenho de iniciadores para grupos específicos de FMAs, com menor diversidade genética.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes

Para o estudo de comunidades de FMAs colonizando as raízes das plantas é necessária a extração do DNA total das raízes colonizadas, o qual é composto de DNA da planta e DNA de fungos e outros microrganismos associados às raízes. Os métodos de extração de DNA de plantas utilizam diferentes processos para a lise de membranas, para a liberação e a purificação desses ácidos nucleicos da amostra. Considerando-se a complexidade do DNA total extraído de raízes coletadas no campo, os diferentes métodos de extração de DNA podem apresentar eficiências variáveis. Dessa forma, foram testados cinco métodos de extração de DNA de raízes visando a análise de FMAs a elas associadas. Foi avaliada a concentração, pureza e a viabilidade de amplificação do DNA total obtido, utilizando-se raízes de *Brachiaria* sp. inoculadas com diferentes espécies de FMAs.

As plantas foram previamente inoculadas com diferentes espécies de FMAs e cultivadas em vasos contendo solo esterilizado em autoclave. Os FMAs utilizados foram:

- *Acaulospora scrobiculata*
- *Glomus clarum*
- *Gigaspora rosea*
- *Paraglomus brasilianum*
- *Glomus etunicatum*
- *Gigaspora rosea* e *Scutellospora heterogama*

Foram utilizados cinco métodos para extração de DNA das raízes colonizadas por FMAs (Quadro 1), sendo dois deles com kits comerciais e outros três adaptados de procedimentos documentados na literatura, conforme descrito abaixo.

Antes da extração de DNA, as raízes foram lavadas quatro vezes com água destilada para remoção de impurezas mais grosseiras, homogeneizadas e maceradas em nitrogênio líquido com o uso de almofariz e pilão de porcelana. Cada amostra foi dividida em 5 alíquotas, de mesma massa fresca (200 a 500 mg), e transferidas para tubos de polietileno. Assim, foi utilizada a mesma quantidade de material vegetal de cada amostra de raízes para cada um dos 5 métodos de extração de DNA.

Métodos	
1	Kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia)
2	Kit UltraClean Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA USA)
3	Método adaptado de Edwards et al. (1997)
4	Método adaptado de Doyle e Doyle (1990)
5	Método adaptado de Redecker (2000)

Quadro 1 – Métodos utilizados para extração de DNA de raízes de braquiária colonizadas por FMAs

Método 1: kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia). O DNA total da amostra de raízes foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. No microtubo de lise foram adicionadas as raízes maceradas e 800 μL de solução de lise para tecidos vegetais (CLS-VF) mais 100 μL da solução PPS. Cada microtubo de lise continha granada finamente moída e 2 esferas de cerâmica. O microtubo foi agitado em um homogeneizador *FP120Fast Prep Cell Disruptor* (Bio 101, Vista, Califórnia) por 20 segundos com velocidade de 4m.s^{-1} . As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 g. 600 μL da fase superior foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados 600 μL da solução com matriz de ligação e prosseguiu-se com inversão dos tubos por 20 vezes e incubação a temperatura ambiente com leve agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O pélete foi ressuscitado em 500 μL da solução de lavagem SEWS. A solução foi transferida para o filtro *Spin Filter*®, o qual foi acoplado a um microtubo. Este conjunto foi centrifugado por duas vezes a 13.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado. O filtro foi, então, transferido para novo tubo e adicionaram-se 50 μL da solução DES sobre a matriz de ligação contida no tubo. A matriz foi ressuscitada cuidadosamente para hidratação e solubilização do DNA. Essa mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, e centrifugou-se a 13.000 g por um minuto para recuperar o DNA eluído com DES. O DNA obtido foi armazenado a -20°C .

Método 2: Kit UltraClean Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA USA). O DNA foi extraído de acordo com o manual do fabricante, com modificações, conforme descrito a seguir. As raízes maceradas foram transferidas para tubo contendo a solução de lise

Bead. A mistura foi agitada gentilmente e adicionaram-se 60 μL da Solução 1. Depois de inverter o tubo por várias vezes, este foi incubado a 70° C por 10 minutos. Adicionaram-se 200 μL de Solução IRS (Solução de Remoção de Inibidor) e a solução foi homogeneizada no homogeneizador *FP120Fast Prep Cell Disruptor* (Bio 101, Vista, Califórnia) por 20 segundos com velocidade de 4 m.s^{-1} . O tubo foi centrifugado a 10.000 g por 30 segundos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 250 μL da Solução 2. A solução foi homogeneizada em vortex por 5 segundos e o tubo incubado a 4° C por 5 minutos para depois ser centrifugado a 10.000 g por 1 minuto. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde se adicionaram 1,3 mL da Solução 3 e a solução foi homogeneizada em vortex por 5 segundos, 700 μL foram transferidos para o filtro do kit, e o conjunto filtro-tubo foi centrifugado à 10.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e adicionaram-se mais 700 μL de solução ao mesmo filtro. Em seguida, o tubo foi centrifugado à 10.000 g por 1 minuto. O processo foi repetido até que todo o sobrenadante fosse filtrado. Foram adicionados, então, 300 μL da Solução 4 sobre o filtro, centrifugou-se a 10.000 g por 30 segundos. O filtrado foi descartado e centrifugou-se novamente por 1 minuto. Para recuperar o DNA, o filtro foi transferido para um novo tubo e adicionaram-se 50 μL da Solução 5 no centro do filtro. O conjunto filtro-tubo foi centrifugado a 10.000 g por 30 segundos e, depois, o filtro foi descartado. A solução de DNA obtida foi armazenada a -20° C.

Método 3: Método adaptado de Edwards (1997). Às raízes maceradas, foram adicionados 800 μL de solução tampão de Etil Xantana de Potássio (6,25 mM de Etil Xantana de Potássio - PEX; 100 mM de tris-HCl, pH 7,5; 700 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8,0). As suspensões foram homogeneizadas em vortex e incubadas a 65 °C por uma hora. Depois da incubação, foram adicionados 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e a mistura foi emulsificada em vortex. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 minutos. Uma alíquota de 650 μL do sobrenadante foi coleta e transferida para um novo tubo. A essa solução, foram adicionados mais 650 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. A mistura foi emulsificada e centrifugada a 12.000 g por 2 minutos. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para novo tubo e misturada com 650 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). As misturas foram homogeneizadas novamente em vortex e centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos. Um volume de 500 μL do sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e igual volume (500 μL) de isopropanol, para

precipitação do DNA. A precipitação do DNA foi feita por uma hora a 4 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500 µL de etanol 70% ao pélete formado. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 minutos. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo, ressuspendido em 100 µL de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM de EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20 °C.

Método 4: Método adaptado de Doyle; Doyle (1990). Em cada microtubo de 1,5 mL, contendo as raízes maceradas, foram adicionados 650 µL da solução tampão de extração (2 % de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM de EDTA, pH 8,0; 1 % de polivinilpirrolidona, PVP). Os microtubos foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 55° C por 50 minutos. Foram adicionados 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitou-se em vórtex até formar uma emulsão. Centrifugaram-se as amostras por 5 minutos a 12.000 g para separação do sobrenadante. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo microtubo, onde se adicionou o mesmo volume de isopropanol para precipitação de DNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 g. Os péletes formados foram lavados duas vezes com etanol 70 %, com centrifugação a 12.000 g por 2 minutos, para remoção de sais. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo, ressolubilizado em 50 µL de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM de EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20 °C.

Método 5: Método adaptado de Redecker (2000). A cada alíquota de raízes maceradas, foram adicionados 300 µL de NaOH 0,25M. Os microtubos foram incubados a 90 °C por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de Tris-HCl 0,5 M e 300 µL de HCl 0,25 M e procedeu-se a incubação por 10 minutos a 90 °C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O DNA foi precipitado adicionando-se o mesmo volume de isopropanol. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 g. Os péletes de DNA foram lavados por duas vezes com etanol 70 %, seguido de centrifugação a 12.000 g por 2 minutos, para remoção de sais. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo, ressolubilizado em 50 µL de água ultrapura e armazenado a -20 °C.

O DNA extraído por diferentes métodos foi quantificado em gel por meio de comparação com marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) após eletroforese. A imagem do gel de agarose (1%) foi analisada com o programa *Fragment Analysis Application version 1.1* (Molecular Dynamics, GE Healthcare). O DNA também foi quantificado por espectrofotometria

à 260 nm (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989). O cálculo da concentração de DNA na amostra foi feito de acordo com a equação

$$[\text{DNA}] = (50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \times D) \times (A_{260} - A_{320}),$$

Onde,

D = fator de diluição da amostra;

A_{260} = absorbância a 260 nm;

A_{320} = absorbância a 320 nm.

A pureza do DNA foi determinada pela relação das absorbâncias a 260 e 280 nm (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

As amostras de DNA de raízes de braquiária foram adicionalmente submetidas à PCR, com o objetivo de determinar se o DNA era amplificável. Para isso, foram utilizados os pares de iniciadores NS1 e NS8, complementares ao gene rRNA 18S (WHITE et al., 1990), e os iniciadores SSU-Glom1 e LSU-Glom1, complementares à região ITS (RENKER et al., 2003). A amplificação do DNA foi feita em solução contendo 0,4 μM de cada iniciador, 200 μM de cada um dos nucleotídeos (dNTPs), 1,5 mM de MgCl_2 (para o par de iniciadores NS1 e NS8) ou 2,0 mM de MgCl_2 (para o par de iniciadores SSU-Glom1 e LSU-Glom1), 1,5 U de DNA polimerase Taq e 1x o tampão de reação, totalizando um volume de 30 μL . Os fragmentos de rDNA 18S (iniciadores NS1 e NS8) foram amplificados, após a desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, em 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento do iniciador a 53°C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, seguidos de um período final de extensão de 10 minutos a 72° C. A região ITS (iniciadores SSU-Glom1 e LSU-Glom1) foi amplificada após desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, em 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos, seguidos de extensão a 72 °C por 10 minutos. Para todos os ensaios, empregou-se uma reação controle negativo, sem DNA. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e visualizados após coloração com SYBR Green.

O experimento para comparação dos métodos de extração de DNA teve um delineamento inteiramente aleatorizado. Para cada método, as repetições constituíram-se das 6 amostras de raízes com diferentes espécies de FMAs inoculadas. Os dados de concentração de DNA, e da

relação da absorbância a 260 e 280 nm foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados foram transformados para $x^{0.5}$ para normalização.

2.2.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório do Professor Ari Jumpponen (Division of Biology, Kansas State University, USA).

Com o objetivo de se desenhar iniciadores para amplificar DNA de FMAs, sequências do gene rRNA 18S foram obtidas da base de dados do NCBI. Nessa etapa, não foram utilizadas sequências de origem ambiental, pois o desenho dos iniciadores deveria se basear em organismos identificados. Para que os iniciadores fossem discriminatórios contra outros grupos de fungos, também se utilizou sequências do gene rRNA 18S de fungos dos filos Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota e Chytridiomycota. Essas sequências foram utilizadas como não-alvo na validação dos iniciadores. A entrada para a busca no NCBI foi “(Glomeromycota AND 18S) NOT (environmental OR uncultured)” para as sequências de FMAs, e “(Grupo de Fungo AND 18S AND AFTOL) NOT (internal)” para cada um dos 4 grupos citados acima, como: “(Basidiomycota AND 18S AND AFTOL) NOT (internal)” para Basidiomycota. O termo “internal” foi utilizado para se excluir sequências da região ITS no banco de dados. Foram coletadas 100 sequências do gene rRNA 18S de FMAs e 59 sequências de fungos não-micorrízicos arbusculares.

Todas as sequências foram importadas para o programa *Sequencher 4.6* para o alinhamento e formação de contigs. A formação desses contigs permitiu a separação em grupos baseados nas diferenças das sequências dos organismos, portanto, baseado na filogenia. Inicialmente, os parâmetros de alinhamento foram ajustados da seguinte forma: o algoritmo de agrupamento (Assembly Algorithm) utilizou os dados impuros (Dirty Data) para haver mais rigor na formação de agrupamentos e para evitar a inserção de grandes “gaps”. Foi utilizado o ReAligner (ANSON; MYERS, 1997) para otimizar “gaps” como pequenos insertos. A percentagem mínima de coincidência das sequências (*Minimum Match Percentage*) foi 100 %, enquanto a cobertura mínima (*Minimum Overlap*) foi 100 %. A percentagem mínima de similaridade das sequências foi iniciada com o maior valor para se detectar e se eliminar as sequências idênticas, visando a formação de um banco de dados com sequências únicas apenas.

Depois do primeiro alinhamento com 100 % de similaridade, séries de alinhamentos foram feitos com o parâmetro de percentagem mínima de similaridade diminuindo um ponto percentual a cada alinhamento. O valor da cobertura mínima permaneceu a 100 % para excluir a possibilidade de alinhamento de regiões incorretas. Assim, os contigs para os grupos de sequências de Glomeromycota, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, *Glomus* grupo A e *Glomus* grupo B foram usados para o desenho dos iniciadores que amplificassem o seu DNA alvo.

Para a obtenção das sequências consenso de cada grupo, fez-se o alinhamento no programa *Multalin* (CORPET, 1988). No desenho dos iniciadores, empregaram-se as sequências consenso dos grupos de FMAs nos programas *Beacon Designer 7.02* (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA) e *Primer3 v.0.4.0* (ROZEN; SKALETISKY, 2000), além da busca manual dos iniciadores. Na busca manual, procuraram-se as regiões consenso para os grupos de FMAs e que fossem dissimilares às sequências não-alvo.

Após se encontrarem os possíveis iniciadores específicos, eles foram validados quanto à especificidade, utilizando o BLAST. Nessa etapa, a especificidade foi considerada quando a similaridade e a cobertura para sequências alvo foram de 100 %, e quando esses valores foram menores para sequências não-alvo. Assim, a análise de similaridade foi feita utilizando-se as seguintes entradas para busca no BLAST: Glomeromycota, o grupo de espécies de cada iniciador e Eucariotos sem Glomeromycota. Os iniciadores ainda foram alinhados com as sequências alvo e não-alvo para confirmar a especificidade, a similaridade e a posição de alinhamento no programa *Multialin*. Depois, avaliou-se a temperatura de desnaturação (*melting temperature*), o tamanho do oligonucleotídeo, a formação de grampos e o autopareamento utilizando-se o programa *Oligo Analyzer* (Copyright (C) 2000-2002 Teemu Kuulasmaa). Por fim, procedeu-se os ensaios de amplificação de DNA alvo por meio de PCR, utilizando-se os iniciadores grupo-específicos como *Forward* e um iniciador modificado de Borneman e Hartin (2000) como *Reverse* (Tabela 1). Após a verificação em alinhamentos com sequências de Glomeromycota, o iniciador nu-SSU-1196 (BORNEMAN; HARTIN, 2000) foi alterado com degeneração de uma base “C” por “C ou T” (Y). Essa degeneração permitiu obter 100 % de similaridade entre as sequências de FMAs testadas.

Tabela 1 – Iniciadores grupo-específicos para FMAs

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Especificidade	Referência
ACAU220	GGG GTT TCC CAT TGG TGR ATC AT	Acaulosporaceae	Esse estudo
GLOMB652	TAA GGG GTA TGA ACT GGT GTA G	<i>Glomus</i> Grupo B	Esse estudo
GLOMB673	GTC AAT TTC TCA CCT TCT GGA G	<i>Glomus</i> Grupo B	Esse estudo
GIGA202	AAA CCA ATA RCC TTC GGG TTT C	Gigasporaceae	Esse estudo
GIGA615	TAG TTG AAT TTC GGG GTT CTA C	Gigasporaceae	Esse estudo
GLOMA189	TTA GAT AAA AAA CCA ATA TCG GG	<i>Glomus</i> Grupo A	Esse estudo
GLOMA690	CGT AAT GCC ATT AAT TTG GTG T	<i>Glomus</i> Grupo A	Esse estudo
nu-SSU-1196 modificado	TCT GGA CCT GGT GAG TTT YC	Fungi	Modificado de Borneman; Hartin (2000)

Para validação dos iniciadores, utilizaram-se amostras de DNA de FMAs provenientes de vasos de multiplicação obtidos de culturas do INVAM (West Virginia University). As espécies de FMAs utilizadas pertencem aos 4 grupos de FMAs: *Acaulospora lacunosa* e *A. longula* (Acaulosporaceae), *Glomus claroideum* (*Glomus* grupo B), *Glomus caledonium* (*Glomus* grupo A), *Scutellospora castanea* e *S. calospora* (Gigasporaceae). O DNA total foi extraído a partir do substrato dos vasos de multiplicação, que continham esporos e raízes colonizadas, utilizando-se o *Ultra Clean Soil DNA Kit* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA).

Para otimizar as condições da amplificação do DNA alvo para cada iniciador desenhado, foram testados os gradientes de: concentração de DNA, temperatura de pareamento dos iniciadores, concentração de MgCl₂, concentração de dNTPs, concentração de iniciadores, concentração da enzima DNA Polimerase Taq, além da presença ou ausência de BSA (Albumina de Soro Bovino). As condições da PCR otimizadas foram: 5,0 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 U da DNA polimerase Taq, 1x tampão para a DNA polimerase, sem o uso de BSA, para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação foi 94 °C por 2 minutos para a desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 61 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, e um passo de extensão final a 72 °C por 8 minutos.

Previamente aos ensaios com amostras ambientais, a habilidade dos iniciadores em amplificar o DNA alvo foi testada em amostras de DNA extraídos de raízes de cana-de-açúcar e

Brachiaria sp. inoculadas com FMAs e cultivadas em casa-de-vegetação. Amostras de DNA de raízes de uma pradaria dos Estados Unidos também foram utilizadas para verificar a eficiência e a especificidade dos iniciadores em amostras do campo. Essas amostras foram coletadas de um experimento em pradaria conduzido na *Konza Prairie Biological Station* (estação de estudos biológicos da Kansas State University em Manhattan, KS - <http://www.konza.ksu.edu/konza/>), com comunidade vegetal dominada por espécies nativas, como *Andropogon gerardii*, *Panicum virgatum* e *Sorghastum nutans*. As amostras são de dois tratamentos: sem adubação nitrogenada e com aplicação de 10 g de N por m² (JUMPPONEN et al., 2005). O DNA dessas amostras foi extraído com o kit MoBio *Ultra Clean Soil DNA Kit*.

Foi necessário utilizar a *nested* PCR para a amplificação do DNA alvo nas amostras provenientes da pradaria. Na primeira PCR foram utilizados os iniciadores NS1 e NS8 (WHITE, 1990). A amplificação foi feita com desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; e extensão final a 72 °C por 8 minutos. Na segunda PCR, utilizaram-se os iniciadores grupos específicos desenhados nesse trabalho com as mesmas condições descritas acima para o DNA de raízes de vasos de multiplicação. Os produtos de PCR das amostras ambientais, amplificados com o uso dos iniciadores grupo-específicos, foram ligados em vetor TOPO (Invitrogen) e clonados em *Escherichia coli*. Para o sequenciamento do DNA alvo, os insertos foram amplificados a partir das colônias de *E. coli* e foram selecionados a partir do padrão de bandas após a digestão com as endonucleases *AluI* e *HinfI*. Os clones que apresentaram os mesmos padrões de bandas foram considerados iguais. Escolheram-se apenas 1 a 3 representantes para o sequenciamento, dependendo do número de clones com o mesmo padrão. As sequências foram obtidas utilizando-se sequenciador capilar de alta capacidade da *High-Throughput Sequencing Solutions*, empresa administrada pela Universidade de Washington, EUA.

2.2.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita

As amostras de solos e raízes de cana-de-açúcar foram coletadas para a extração de esporos, para a determinação da colonização intrarradicular e para a identificação de sequências do gene rRNA 18S de FMAs nas raízes. Para tanto, utilizou-se uma área experimental do Centro

de Tecnologia Canavieira (CTC), localizada na Usina São José da Estiva (21°30'45"S e 49°13'08"W), no município de Novo Horizonte, SP. O experimento foi instalado em 16/04/2004, sobre um latossolo vermelho-amarelo, com dois tratamentos de manejo de colheita: SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia; e três variedades de cana-de-açúcar: (1) SP813250, (2) SP801842 e (3) RB72454. As variedades foram plantadas com espaçamento de 1,5 m entre linhas, com seis repetições em blocos aleatorizados. Anteriormente à implantação do experimento na área, houve o cultivo de cana-de-açúcar variedade SP711406, com 10 cortes e queima previamente à cada colheita, seguido de um cultivo de soja. A amostragem foi feita aos 84 dias após a primeira colheita da cana-de-açúcar, em 15/12/2005, na profundidade de 0-10 cm, sob as três variedades de cana-de-açúcar. A produtividade, em toneladas de colmos por hectare (TCH), também foi calculada para as três variedades.

2.2.3.1 Análises químicas do solo

As amostras de solo coletadas foram secas ao ar para a análise de pH, H+Al, Al, Ca, Mg, K, P, Carbono orgânico (CO), soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (CTC) e saturação da CTC por bases (Quadro 2).

Atributo	Método ou extrator	Referência
pH	Medido em CaCl ₂ 0,01M	Raij et al., 2001
H+Al	pH em SMP	Raij et al., 2001
Al trocável	KCl 1M e titulação com NaOH 0,025M	Raij et al., 2001
Ca, Mg trocáveis e P	Resina trocadora de íons	Raij et al., 2001
K trocável	Melich 1	Silva, 1999
Carbono orgânico (CO)	Colorimetria	Raij et al., 2001
Soma de bases (SB)	Somatória de Ca, Mg, K	-
CTC (pH 7,0)	Somatória de H+Al, Ca, Mg, K	-
Saturação por bases da CTC (V%)	Saturação = (Ca, Mg, K)*100/CTC	-

Quadro 2 – Metodologias utilizadas para a análise química do solo

A CTC a pH 7,0 foi calculada somando-se os teores de H + Al, Ca, Mg e K. Depois,

foram calculadas as porcentagens da saturação da CTC por Ca, Mg, K e por Al (m) da seguinte forma: Saturação do Elemento (%) = (teor do Elemento/CTC)*100.

2.2.3.2 Extração de esporos de FMAs do solo

Os esporos dos FMAs foram extraídos do solo por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação por duas vezes em solução de sacarose 70 %, a 560 g por 2 minutos. Os esporos foram identificados conforme descrito no *International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhiza Fungi* (INVAM, 2007). Para a análise estatística, o número de esporos foi transformado para $(x + 0,5)^{0,5}$. O índice de diversidade de Shannon, o recíproco do índice de Simpson, as estimativas de riqueza de espécies e a estimativa de cobertura de amostragem foram realizadas com o uso do programa SPADE (CHAO; SHEN, 2003). O índice de equitabilidade de Pielou foi calculada de acordo com Magurran (1988).

Para determinar a influência das variáveis ambientais na variabilidade de ocorrência das espécies de FMAs sob cana-de-açúcar, foi realizada uma análise de redundância canônica (RDA), utilizando-se o programa “*Canoco for windows 4.5*”, com transformação dos dados para $\log x$ e avaliação da análise por meio do teste de permutação de Monte-Carlo. Na RDA a ordenação das amostras é condicionada diretamente pelas variáveis ambientais e, assim, permite medida direta da relação entre as variáveis ambientais e as espécies detectadas. Para eliminar a colinearidade de dados e selecionar as variáveis que melhor explicaram de forma significativa a variabilidade dos dados, utilizou-se “*Forward selection*” na RDA. Dados de presença e ausência de espécies de FMAs foram utilizados para os cálculos.

2.2.3.3 Colonização micorrízica intrarradicular

Para a avaliação da colonização intrarradicular pelos FMAs, as raízes de cana-de-açúcar foram lavadas e imersas em KOH 10% por uma noite. Depois, foram aquecidas a 60°C em KOH 10% por 10 minutos para clarificação. Após a clarificação, as estruturas fúngicas foram coradas por 3 minutos a 90°C com tinta de caneta comercial Parker® 5% diluída em solução de ácido acético 5% e lactoglicerol 10%. A colonização das raízes foi analisada sob microscópio estereoscópio pelo método da placa reticulada, segundo Giovannetti e Mosse (1980). Os dados

foram transformados para $\arcsen(x + 1)^{0.5}$ para as análises estatísticas.

2.2.3.4 Análise do gene rRNA 18S fúngico em raízes de cana-de-açúcar

O DNA das amostras de raízes do campo foi extraído com o objetivo de amplificar e clonar fragmentos do gene rRNA 18S de FMAs. O DNA foi extraído com kit comercial Fast DNA (Bio101, Vista) após a lavagem das raízes com água desionizada e maceração em nitrogênio líquido. A clonagem do gene rRNA 18S de FMAs foi realizada usando três abordagens. A primeira abordagem foi com a utilização de iniciadores específicos para um segmento do gene rRNA 18S conservado em fungos (NS7 e F1Ra). Assim, após o sequenciamento de clones, poderíamos detectar as populações de fungos em geral, incluindo as populações de FMAs. A segunda abordagem teve como objetivo amplificar parte do gene rRNA 18S de fungos do filo Glomeromycota, utilizando-se o iniciador AM1, descrito como específico para FMAs (HELGASON et al., 1998). A terceira abordagem foi desenhar iniciadores específicos para amplificar fragmentos do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs nas amostras de raízes de cana-de-açúcar do campo. Para o desenho dos iniciadores, inicialmente procurou-se obter sequências de FMAs mantidos em vasos de multiplicação. As abordagens e métodos utilizados estão descritos em detalhes abaixo.

2.2.3.4.1 Amplificação do gene rRNA 18S de fungos gerais e FMAs

O gene rRNA 18S fúngico foi amplificado por *nested* PCR com os iniciadores universais para eucariotos NS1 e NS8 (WHITE et al., 1990) na primeira reação de amplificação. Os produtos da primeira PCR foram diluídos 50 vezes e utilizados em uma segunda reação de amplificação com o par de iniciadores NS7 e F1Ra (SOUZA et al., 2004) para amplificar DNA de fungos em geral, e os iniciadores NS31 e AM1 para amplificar DNA de Glomeromycota. A primeira reação de amplificação foi realizada com DNA total extraído das raízes em solução contendo 0,4 μ M de cada um dos iniciadores (NS1 e NS8), 200 μ M de cada um dos nucleotídeos (dNTPs), 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 U da enzima (DNA polimerase Taq) e 1x o tampão de reação, totalizando um volume de 30 μ l. Após desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, os fragmentos de rDNA 18S foram amplificados em 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos,

pareamento do iniciador a 53°C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, seguidos de um período final de extensão de 10 minutos a 72° C.

A segunda reação de amplificação foi realizada com o produto de amplificação da primeira reação diluído em solução contendo 0,4 µM de cada um dos iniciadores (NS7 e F1Ra ou NS31 e AM1), 200 µM de cada um dos nucleotídeos (dNTPs), 1,0 mM de MgCl₂, 2 U da enzima (DNA polimerase Taq) e 1x o tampão de reação, totalizando um volume de 20 µl. A amplificação com os iniciadores NS7 e F1Ra foi feita após desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, em 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62°C por 28 segundos, 72 °C por 1 minuto, seguidos de 5 minutos a 72° C para extensão final. A amplificação com os iniciadores NS31e AM1 foi feita após desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos em 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos (aumentando 1segundo por ciclo), e seguido de extensão final a 72° C por 5 minutos. Os amplicons, corados com SYBR Green, foram visualizados em gel de agarose 1%, após eletroforese.

2.2.3.4.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs em cana-de-açúcar

Os iniciadores desenhados foram utilizados para avaliar a estrutura das comunidades de FMAs em raízes de cana-de-açúcar sob os manejos SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia à colheita. O DNA total extraído das raízes usando o método 1 (kit Bio101) foi amplificado com os iniciadores NS31 e AM1 para comparação da eficiência dos mesmos. As condições para a amplificação utilizando os iniciadores aqui desenhados foram as mesmas descritas acima para as raízes da pradaria. A ligação dos amplicons, transformação de *E. coli*, clonagem e extração de DNA plasmidial foi feita conforme descrito acima para os iniciadores NS7 e F1Ra e para NS31 e AM1. Para as raízes de cana-de-açúcar, 20 clones obtidos com cada iniciador e de cada um dos tratamentos de colheita foram sequenciados. O sequenciamento de ampliconsobtidos de raízes de cana-de-açúcar foi feito em sequenciador automático ABI 3100, utilizando-se o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI Prism 3100, Applied Biosystems). As sequências foram analisadas para detecção de quimeras no programa *Chimera Check* utilizando o mesmo método descrito acima.

Na análise de BLAST, as sequências obtidas de cada iniciador foram avaliadas separadamente. Tanto as sequências obtidas do NCBI para o desenho de iniciadores, como as sequências de cana-de-açúcar do campo foram alinhadas por meio do ClustalW, no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), e manualmente ajustadas para a análise filogenética. As sequências ambientais obtidas com o emprego do iniciador ACAU220 foram alinhadas em 624 posições, sendo 304 parsimônia-informativas. As sequências do iniciador GIGA202 foram alinhadas em 586 posições, sendo 313 parsimônia-informativas. Alinharam-se as sequências de GLOMA690 em 298 posições, com 115 parsimônia-informativas. Por fim, as sequências do iniciador GLOMB673 foram alinhadas em 498 posições, sendo 239 parsimônia-informativas. As relações filogenéticas entre as sequências fúngicas foram inferidas por meio da análise de *neighbor joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) no programa MEGA 4.0. Sequências do gene rRNA 18S de milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*) e *Homo sapiens* foram utilizadas como outgroup. Na análise de NJ, os “Gaps” e “missing data” sofreram deleção completa, o modelo de substituição foi o de Jukes-Cantor com taxas uniformes entre sites. A robustez da topologia inferida foi testada com 1000 replicatas de “bootstrap”.

As sequências obtidas com todos os iniciadores em raízes de cana-de-açúcar foram alinhadas em 256 posições, sendo 124 parsimônio-informativas. Utilizou-se o programa DOTUR para o agrupamento de sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), para a análise de diversidade e para a obtenção da curva de rarefação de sequências. As sequências com uma similaridade > 99 % foram consideradas pertencentes à mesma UTO. Foi feita comparação entre as bibliotecas de sequências por meio do programa webLIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001), utilizando-se as matrizes de distâncias evolutivas calculadas.

2.2.3.4.3 Purificação dos *amplicons*

Os *amplicons* foram purificados dos géis de agarose com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

As bandas de DNA foram excisadas do gel de agarose e colocadas em microtubo de 1,5 mL, adicionando-se 1 µL de uma solução tampão de captura (GE Healthcare) por mg de gel. O microtubo foi agitado vigorosamente em vortex e incubado a 60°C até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Após a dissolução total da agarose, a amostra foi centrifugada por 30

segundos a 12.000 g e incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Uma alíquota de aproximadamente 300 µL da amostra foi transferida para a coluna de purificação, incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugada por 30 segundos a 12.000 g. Este processo foi então repetido com o volume restante da amostra. O líquido que passou pela coluna durante a centrifugação foi descartado e adicionou-se à coluna 500 µL de tampão de lavagem (GE Healthcare), seguido de uma incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugação por 30 segundos a 12.000 g. A coluna foi então transferida para um microtubo de 1,5 mL. Para eluição do DNA adicionou-se 50 µL de TE (pH 8,0) diretamente na matriz da coluna, incubando-se por 10 minutos, e em seguida centrifugou-se por 30 segundos a 8.000 g. O DNA recuperado no microtubo foi novamente centrifugado por 90 segundos a 8.000 g, para remover a resina remanescente. A solução de DNA foi então transferida para novo microtubo de 1,5 mL. A qualidade do DNA foi determinada após eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 X) e coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes). O marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão de tamanho e quantidade de DNA.

2.2.3.4.4 Clonagem dos amplicons do gene rRNA 18S

Os amplicons de parte do gene rRNA 18S foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos amplicons ao plasmídeo foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM DDT; 1 mM ATP; 5% polietilenoglicol, PEG) e 3 U de DNA ligase T4. A solução foi incubada a 4 °C durante 16 horas. Em seguida, células competentes de *E.coli* DH5α foram transformadas por meio de choque térmico utilizando-se os produtos da reação de ligação. As células transformadas foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB-ágar) contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo, 20 µg mL⁻¹). As bactérias contendo plasmídeos recombinantes foram selecionadas para cultivo em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) durante 22 horas a 38 °C, sob agitação horizontal a 300 rpm.

2.2.3.4.5 Extração do DNA plasmidial

Após o cultivo das bactérias contendo o plasmídeo recombinante em microplacas, as

suspensões celulares foram centrifugadas por 6 minutos a 4.000 g, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pélete obtido foi lavado com 240 µL de uma solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose, centrifugado a 20°C por 6 minutos e 4.000 g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 80 µL da solução tampão, e em seguida, as células foram ressuspensas por agitação. Para uma microplaca de fundo “U” contendo 1 µL de RNase em cada cavidade (10 mg mL⁻¹) foram transferidos 60 µL de cada suspensão de células. Em cada poço da placa foram adicionados 60 µL da solução de lise (NaOH 0,2 N e SDS 1%), a placa foi selada, a suspensão homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 µL de solução contendo 3M de acetato de potássio, 10% de ácido acético glacial, misturando por inversão. A placa foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente, e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos (4.000 g, 20°C). O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22) fixada sobre uma placa de fundo “V” de 250 µL, e o conjunto centrifugado (sem a tampa) por 4 minutos a 4.000 g e 4 °C. Ao filtrado adicionou-se 110 µL de isopropanol gelado e em seguida centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 g a 4 °C. O precipitado de DNA foi então lavado com 180 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4.000 g por 5 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se por 1 minuto a 900 g e 4 °C. Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi ressolubilizado em 80 µL de água ultrapura esterilizada, durante toda a noite, e armazenado a -20 °C. O DNA foi quantificado através de espectrofotometria a 260 nm, e sua integridade determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 X).

2.2.3.4.6 Sequenciamento dos clones do gene rRNA 18S

Para o sequenciamento dos clones de fragmentos do gene rRNA 18S utilizou-se 200-500 ng de DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'), 2 µL de *DYEnamic ET Terminator* (GE Healthcare), 2 µL de solução tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf), com as seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a

60 °C. Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% gelado. As suspensões foram centrifugadas a 4.000 g por 45 minutos, e o pélete lavado com etanol 70%, a temperatura ambiente. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas, ressuspensionado em formamida e desnaturado a 96°C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2.3.4.7 Análise de sequências do gene rRNA 18S

A similaridade com sequências de DNA existentes no banco de dados do GenBank foi determinada pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no NCBI (ALTSCHUL et al., 1990). A existência de quimeras foi determinada usando o *Chimera Check version 2.7* do "Ribosomal Database Project" (RDP) (MAIDAK et al., 1999). Foi considerado que as sequências são potencialmente quiméricas se elas têm um ponto de quebra de quimera distinto >20 no *Chimera Check*. Para se confirmar a indicação do programa *Chimera Check*, as sequências foram re-analisadas usando-se o BLAST depois da exclusão dos nucleotídeos anteriores e posteriores ao ponto de quebra da quimera. Se um dos dois segmentos, isto é, o anterior ou o posterior ao ponto de quebra, foi mais similar a outro organismo do que o organismo mais similar à sequência original completa, então a sequência foi considerada como quimera.

Para a análise filogenética, as sequências foram agrupadas por UPGMA, com distância-*p*. Cada grupo foi formado com valor de corte de 0,4 % de distância entre as sequências. Uma sequência representativa de cada grupo formado foi utilizada para construção da árvore filogenética por neighbor-joining (NJ), utilizando-se o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004), após alinhamento das sequências no programa ClustalW e ajuste manual. O alinhamento das sequências foi feito com deleção completa dos "gaps" e a matriz de distância foi calculada utilizando-se o parâmetro Jukes-Cantor como modelo de substituição, assumindo taxa uniforme de substituição para sítios variáveis. A robustez da topologia inferida por NJ foi testada por 1000 repetições de *bootstrap* (PEER; WACHTER, 1994).

Para o agrupamento de sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), empregou-se o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para isso, foi utilizada uma matriz de distância evolutiva calculada com o programa DNADIST, com algoritmo de

Jukes-Cantor, após alinhamento das sequências dos clones das bibliotecas da amostra de raízes de cana-de-açúcar SEM QUEIMA e da amostra COM QUEIMA prévia à colheita. As sequências com uma similaridade > 99 % foram consideradas pertencentes à mesma UTO. A estimativa de riqueza de UTOs, pelos métodos não-paramétricos ACE-1 (CHAO; LEE, 1992) e e Chao1 (CHAO, 1984), dos índices de diversidade de Shannon, recíproco do índice de Simpson e a cobertura de amostragem foram realizadas com o programa SPADE (CHAO; SHEN, 2003). A comparação estatística das bibliotecas de clones foi feita por meio do programa webLIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001), utilizando as matrizes de distâncias evolutivas calculadas anteriormente.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes

O DNA total extraído das raízes de braquiária inoculadas com FMAs após a eletroforese pode ser visto na Figura 2. As amostras extraídas com o método adaptado de Redecker (2000) foram as únicas a não apresentar bandas no gel. As concentrações de DNA obtidas com cada método são apresentadas na Figura 3. Pode-se observar com base no desvio padrão, que o método que apresenta menor variação na quantidade de DNA extraída entre amostras é o kit MoBio, seguido pelo kit Bio101. Os métodos adaptados de Edwards et al. (1997), de Doyle e Doyle (1990) e de Redecker (2000) apresentaram maior variabilidade entre as amostras. Porém, a concentração dada pela comparação com marcador molecular diferiu em ordem e em magnitude da concentração determinada com base na absorbância.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose (2%) do DNA total extraído de raízes de braquiária colonizadas com FMAs, usando 5 diferentes métodos de extração. A espécie de FMA inoculada nas raízes de braquiária está descrita acima do grupo de amostras. LM - marcador de massa Low DNA Mass Ladder; 1 – extração de DNA com kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia); 2 – extração de DNA com kit UltraClean Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA USA); 3 – extração de DNA com método adaptado de Edwards et al. (1997); 4 – extração de DNA com método adaptado de Doyle & Doyle (1990); 5 – extração de DNA com método Adaptado de Redecker (2000)

As amostras extraídas pelos métodos do kit Bio101, adaptado de Edwards et al. (1997) e adaptado de Doyle e Doyle (1990) apresentaram DNA de melhor qualidade, com base na relação A_{260}/A_{280} (Figura 4). Na Figura 4 é possível observar maior variabilidade na relação A_{260}/A_{280} para as amostras do kit MoBio, seguidas do kit Bio101, protocolo adaptado de Edwards (1997), Doyle e Doyle (1990) e de Redecker (2000). Apesar disso, as amostras do kit Bio101 foram as que apresentaram maior eficiência na amplificação do gene rRNA 18S por PCR (Tabelas 2 e 3). A eficiência na amplificação não seguiu a ordem de concentração de DNA inicial de qualquer um dos meios de quantificação, tampouco apresentou maior frequência de amplificação as amostras com valores de A_{260}/A_{280} mais próximos a 1,8. Apesar de menor quantidade de DNA em relação ao extraído pelos métodos adaptados de Edwards et al. (1997) e de Doyle e Doyle (1990), a eficiência de amplificação foi maior para as amostras obtidas com o Kit Bio101. Utilizando-se o par de iniciadores NS1 e NS8 não foi possível amplificar o DNA das amostras extraídas com o método adaptado de Redecker (2000) ou com o adaptado de Edwards et al. (1997) (Tabela 2). A

maior frequência de amplificação foi obtida com o DNA extraído com kit Bio101 (83 %), seguida pelo DNA extraído com o método adaptado de Doyle e Doyle (1990) (67 %) e, finalmente, pelo DNA extraído com o kit MoBio (50 %). A avaliação do gel de agarose após eletroforese do DNA extraído sugere que esses resultados podem estar relacionados a impurezas presentes na amostra. Após a eletroforese, nota-se um efeito de arraste nas amostras mais concentradas, sendo mais intenso nas amostras de DNA obtidas com os métodos adaptados de Edwards et al. (1997) e de Doyle e Doyle (1990).

Quando se utilizou o par de iniciadores SSU Glom1 e LSU Glom1, o mínimo de 3 amostras de DNA de um total de 5 de cada método apresentou amplificação positiva (Tabela 3). Novamente, a maior frequência de amplificação foi observada com as amostras de DNA extraído pelo kit Bio101 (100 %), seguidas do método adaptado de Edwards et al. (1997) e de Doyle e Doyle (1990) (83 %), e pelo kit MoBio e o método adaptado de Redecker (2000) (67 %). Sendo assim, o método usando o kit Bio101 foi o escolhido para as extrações de DNA das raízes de cana-de-açúcar em condições do campo.

Figura 3 – Concentração de DNA de raízes de braquiária extraído com os 5 métodos. A - concentração determinada por comparação com marcador de massa; B - concentração medida a partir da absorvância a 260 nm. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo Tukey ($p < 0,05$). O DNA extraído com o método adaptado de Redecker (2000) não foi visualizado no gel após a eletroforese

Figura 4 – Valores da relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) do DNA extraído de raízes de *Brachiaria* sp. As barras representam o desvio padrão

Pode-se concluir que as quantificações de DNA por comparação com marcador de massa e por espectrofotometria nem sempre refletem a quantidade e a viabilidade de amplificação do DNA em amostras ambientais, com uma comunidade microbiana diversa. Sendo assim, em estudos de amostras ambientais não é adequado se fazer generalizações sobre a metodologia mais eficiente para a quantificação do DNA ou para a avaliação de sua qualidade. O ideal seria um estudo prévio para determinar as melhores condições de extração e quantificação para a investigação pretendida.

Tabela 2 - Amplificação do fragmento do gene rRNA 18S de amostras de DNA extraído de raízes de braquiária utilizando os iniciadores NS1 e NS8

Método	FMA inoculado						FA (%)
	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. rosea</i>	<i>G. clarum</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>P. brasilianum</i>	<i>G. rosea e S. heterogama</i>	
Kit Bio101	+	+	+	+	-	+	83
Kit MoBio	-	+	+	-	-	+	50
Adaptado de Edwards et al. (1997)	-	-	-	-	-	-	-
Adaptado de Doyle & Doyle (1990)	+	+	-	+	-	+	67
Adaptado de Redecker (2000)	-	-	-	-	-	-	-
FA (%)	40	60	40	40	-	60	

FA - Frequência de amplificação.

Tabela 3 - Amplificação do fragmento do gene rRNA 18S de amostras de DNA extraído de raízes de braquiária utilizando os iniciadores SSU Glom1 e LSU Glom1

Método	FMA inoculado						FA (%)
	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. rosea</i>	<i>G. clarum</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>P. brasilianum</i>	<i>G. rosea e S. heterogama</i>	
Kit Bio101	+	+	+	+	+	+	100
Kit MoBio	-	+	+	-	+	+	67
Adaptado de Edwards et al. (1997)	+	+	+	+	-	+	83
Adaptado de Doyle & Doyle (1990)	-	+	+	+	+	+	83
Adaptado de Redecker (2000)	+	-	+	+	-	+	67
Freq (%)	60	80	100	80	60	100	

FA - Frequência de amplificação.

2.3.2 Desenho e validação de iniciadores específicos para grupos de FMAs

Para a obtenção de sequências do gene rRNA 18S de FMAs comuns a ecossistemas brasileiros, inicialmente foram utilizadas espécies isoladas da coleção de FMAs do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ, mantidas em plantas multiplicadoras em casa-de-vegetação. A amplificação com os pares de iniciadores NSF4 e NSR1787 ou NS1 e NS8 do DNA extraído de esporos das espécies *Gigaspora margarita*, *Gigaspora rosea*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus intraradices*, *Glomus formasanum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Paraglomus brasilianum* apresentou aproximadamente 30% de eficiência. No entanto, a clonagem desses fragmentos em *E. coli* não foi possível. Considerando-se que existe um bom número de sequências do gene rRNA 18S de espécies de FMAs comuns em ecossistemas brasileiros depositadas nos bancos de dados públicos, e que o dispêndio de recursos e tempo para otimização da técnica não é compensador, decidiu-se usar tais sequências depositadas para desenho de iniciadores específicos para grupos de FMAs. Desse modo, nesse trabalho, foram desenhados iniciadores específicos para os grupos de FMAs mais frequentes em amostras ambientais: Acaulosporaceae, Gigasporaceae, *Glomus* Grupo A e *Glomus* Grupo B.

As sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores são apresentadas na Tabela 4. Essas foram alinhadas e agrupadas em função de sua similaridade usando-se o programa Sequencher 4.6. A família Acaulosporaceae formou um agrupamento a 96 % de similaridade, o *Glomus* Grupo B formou um agrupamento a 95 %, Gigasporaceae a 94 % e *Glomus* Grupo A a 93 % de similaridade.

A formação de um agrupamento somente com as sequências de Glomeromycota não foi possível, porque a diversidade de sequências entre os FMAs é alta ao ponto de o agrupamento apresentar sequências de outros fungos. Isto é uma das limitações para se desenhar um iniciador que seja específico para todos os fungos de Glomeromycota. A razão para isso é a divergência dos grupos basais de Archaeosporaceae e Paraglomeraceae. A Figura 5 apresenta a análise filogenética das sequências do gene rRNA 18S representativas dos grupos e que foram utilizadas para o desenho de iniciadores.

Tabela 4 – Sequências de fungos alvo e não-alvo obtidas do banco de dados do NCBI para o desenho de iniciadores específicos para amplificarem o gene rRNA 18S de Glomeromycota

(continua)			
Organismo	Grupo	Filo	Acesso
<i>Acaulospora laevis</i>	Acaulosporaceae	Glomeromycota	[AJ250847.1]
<i>Acaulospora laevis</i>	Acaulosporaceae	Glomeromycota	[Y17633.2]
<i>Acaulospora longula</i>	Acaulosporaceae	Glomeromycota	[AJ306439.1]
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	Acaulosporaceae	Glomeromycota	[AJ306442.1]
<i>Entrophospora colombiana</i>	Acaulosporaceae	Glomeromycota	[AB220170.1]
<i>Gigaspora albida</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852600.1]
<i>Gigaspora albida</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852599.1]
<i>Gigaspora decipiens</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[U96146.1]
<i>Gigaspora gigantea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852602.1]
<i>Gigaspora gigantea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852601.1]
<i>Gigaspora gigantea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[EF014362.1]
<i>Gigaspora margarita</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852605.1]
<i>Gigaspora margarita</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852604.1]
<i>Gigaspora margarita</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852603.1]
<i>Gigaspora margarita</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AM181144.1]
<i>Gigaspora margarita</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AM181143.1]
<i>Gigaspora rosea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852608.1]
<i>Gigaspora rosea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852607.1]
<i>Gigaspora rosea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852606.1]
<i>Gigaspora rosea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[X58726.1]
<i>Scutellospora aurigloba</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ276093.2]
<i>Scutellospora aurigloba</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ276092.2]
<i>Scutellospora calospora</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306446.1]
<i>Scutellospora calospora</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306445.1]
<i>Scutellospora calospora</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306443.1]
<i>Scutellospora castanea</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AF038590.1]
<i>Scutellospora cerradensis</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AB041345.1]
<i>Scutellospora cerradensis</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AB041344.1]
<i>Scutellospora fulgida</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306435.1]
<i>Scutellospora gilmorei</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ276094.2]
<i>Scutellospora gregaria</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ871275.1]
<i>Scutellospora gregaria</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ871274.1]
<i>Scutellospora heterogama</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306434.1]
<i>Scutellospora heterogama</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AY635832.1]
<i>Scutellospora heterogama</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[U36593.1]
<i>Scutellospora heterogama</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ852609.1]
<i>Scutellospora nodosa</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306437.1]
<i>Scutellospora projecturata</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ242729.1]
<i>Scutellospora reticulata</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ871273.1]
<i>Scutellospora spinosissima</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306436.1]
<i>Scutellospora weresubiae</i>	Gigasporaceae	Glomeromycota	[AJ306444.1]
<i>Glomus caledonium</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[Y17653.2]
<i>Glomus caledonium</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[Y17635.3]
<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ276084.2]
<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ852597.1]
<i>Glomus coremioides</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ249715.1]
<i>Glomus coronatum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ276086.2]
<i>Glomus fasciculatum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[Y17640.2]
<i>Glomus fragilistratum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ276085.2]
<i>Glomus geosporum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ245637.2]
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ301859.1]

Tabela 4 – Sequências de fungos alvo e não-alvo obtidas do banco de dados do NCBI para o desenho de iniciadores específicos para amplificarem o gene rRNA 18S de Glomeromycota

(continuação)			
Organismo	Grupo	Filo	Acesso
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ852526.1]
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AY635831.1]
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[DQ322630.1]
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[X58725.1]
<i>Glomus manihotis</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[U36590.1]
<i>Glomus manihotis</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[Y17648.3]
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ306438.1]
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AY635833.1]
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[U96143.1]
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[U96144.1]
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[U96145.1]
<i>Glomus sinuosum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ133706.1]
<i>Glomus verruculosum</i>	<i>Glomus</i> grupo A	Glomeromycota	[AJ301858.1]
<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ852598.1]
<i>Glomus cf. etunicatum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[Y17644.2]
<i>Glomus luteum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[U36591.1]
<i>Glomus claroideum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AF139732.1]
<i>Glomus viscosum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[Y17652.2]
<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[Y17639.2]
<i>Glomus luteum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276089.3]
<i>Glomus lamellosum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276087.2]
<i>Glomus claroideum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276080.2]
<i>Glomus claroideum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276079.2]
<i>Glomus claroideum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276075.2]
<i>Glomus lamellosum</i>	<i>Glomus</i> grupo B	Glomeromycota	[AJ276083.3]
<i>Archaeospora leptoticha</i>	Ambisporaceae	Glomeromycota	[AB015052.1]
<i>Archaeospora leptoticha</i>	Ambisporaceae	Glomeromycota	[AB220172.1]
<i>Archaeospora leptoticha</i>	Ambisporaceae	Glomeromycota	[AJ006466.1]
<i>Archaeospora leptoticha</i>	Ambisporaceae	Glomeromycota	[AJ301861.1]
<i>Acaulospora trappei</i>	Archaeosporaceae	Glomeromycota	[AJ006800.1]
<i>Acaulospora trappei</i>	Archaeosporaceae	Glomeromycota	[AJ006801.1]
<i>Archaeospora trappei</i>	Archaeosporaceae	Glomeromycota	[AM114274.1]
<i>Archaeospora trappei</i>	Archaeosporaceae	Glomeromycota	[Y17634.3]
<i>Diversispora spurca</i>	Diversisporaceae	Glomeromycota	[AJ276077.2]
<i>Diversispora spurca</i>	Diversisporaceae	Glomeromycota	[Y17650.2]
<i>Glomus versiforme</i>	Diversisporaceae	Glomeromycota	[AJ276088.3]
<i>Glomus versiforme</i>	Diversisporaceae	Glomeromycota	[X86687.3]
<i>Glomus fulvum</i>	Glomeraceae	Glomeromycota	[AM418543.1]
<i>Pacispora scintillans</i>	Pacisporaceae	Glomeromycota	[AJ619955.1]
<i>Pacispora scintillans</i>	Pacisporaceae	Glomeromycota	[AJ619954.1]
<i>Pacispora scintillans</i>	Pacisporaceae	Glomeromycota	[AJ619953.1]
<i>Glomus occultum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[AJ006798.1]
<i>Glomus occultum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[AJ006799.1]
<i>Paraglomus brasilianum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[AJ301862.1]
<i>Paraglomus occultum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[AJ276081.3]
<i>Paraglomus occultum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[AJ276082.2]
<i>Paraglomus occultum</i>	Paraglomeraceae	Glomeromycota	[DQ322629.1]
<i>Geosiphon pyriformis</i>	não-alvo	Glomeromycota	[AJ276074.2]
<i>Geosiphon pyriformis</i>	não-alvo	Glomeromycota	[AM183923.1]
<i>Geosiphon pyriformis</i>	não-alvo	Glomeromycota	[X86686.2]
<i>Geosiphon pyriformis</i>	não-alvo	Glomeromycota	[Y15904.3]

Tabela 4 – Sequências de fungos alvo e não-alvo obtidas do banco de dados do NCBI para o desenho de iniciadores específicos para amplificarem o gene rRNA 18S de Glomeromycota

(continuação)			
Organismo	Grupo	Filo	Acesso
<i>Geosiphon pyriformis</i>	não-alvo	Glomeromycota	[Y15905.3]
<i>Buellia dialyta</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ973009.1]
<i>Capnodium coffeae</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ247808.1]
<i>Capnodium salicinum</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ677997.1]
<i>Capronia munkii</i>	não-alvo	Ascomycota	[EF413603.1]
<i>Capronia pilosella</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ823106.1]
<i>Cladonia caroliniana</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY584664.1]
<i>Diaporthe eres</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ471015.1]
<i>Geoglossum nigrum</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY544694.1]
<i>Ophioparma lapponica</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ973005.1]
<i>Orbilina auricolor</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ471001.1]
<i>Orbilina vinosa</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ471000.1]
<i>Peziza proteana f. sparassoides</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY544703.1]
<i>Peltula umbilicata</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ782887.1]
<i>Peziza vesiculosa</i>	não-alvo	Ascomycota	[DQ470995.1]
<i>Taphrina wiesneri</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY548293.1]
<i>Xylaria acuta</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY544719.1]
<i>Xylaria hypoxylon</i>	não-alvo	Ascomycota	[AY544692.1]
<i>Amanita brunneascens</i>	não-alvo	Basidiomycota	[AY707096.1]
<i>Lactarius lignyotus</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ457626.1]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	não-alvo	Basidiomycota	[AY657015.1]
<i>Puccinia poarum</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ831029.2]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ832194.1]
<i>Rhodotorula hordea</i>	não-alvo	Basidiomycota	[AY657013.1]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ832199.1]
<i>Sphenospora kevorkianii</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ354520.1]
<i>Tilletiaria anomala</i>	não-alvo	Basidiomycota	[AY803752.1]
<i>Trechispora sp.</i>	não-alvo	Basidiomycota	[AY803753.1]
<i>Tremella aurantia</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ836000.1]
<i>Udeniomyces puniceus</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ836006.1]
<i>Uromyces appendiculatus</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ354510.1]
<i>Ustilago tritici</i>	não-alvo	Basidiomycota	[DQ846895.1]
<i>Chytridiomyces hyalinus</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ536487.1]
<i>Cladochytrium replicatum</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AY546683.1]
<i>Cyllumyces aberensis</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ536481.1]
<i>Gaertneriomyces semiglobiferus</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AF164247.2]
<i>Olpidium brassicae</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ322624.1]
<i>Physoderma maculare</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ536489.1]
<i>Polychytrium aggregatum</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AY601711.1]
<i>Rhizidium endosporangiatum</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ536484.1]
<i>Rhizophlyctis harderi</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AF164272.2]
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AY635829.1]
<i>Rhizophyidium elyensis</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[DQ536479.1]
<i>Rozella allomyces</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AY635838.1]
<i>Spizellomyces punctatus</i>	não-alvo	Chytridiomycota	[AY546684.1]
<i>Basidiobolus ranarum</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635841.1]
<i>Coemansia reversa</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY546685.1]
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635843.1]
<i>Endogone lactiflua</i>	não-alvo	Zygomycota	[DQ536471.1]
<i>Endogone pisiformis</i>	não-alvo	Zygomycota	[DQ322628.1]
<i>Entomophthora muscae</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635820.1]

Tabela 4 – Sequências de fungos alvo e não-alvo obtidas do banco de dados do NCBI para o desenho de iniciadores específicos para amplificarem o gene rRNA 18S de Glomeromycota

Organismo	Grupo	Filo	(conclusão) Acesso
<i>Mortierella sp.</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635828.1]
<i>Orphella haysii</i>	não-alvo	Zygomycota	[DQ322626.1]
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635837.1]
<i>Rhizopus stolonifer</i>	não-alvo	Zygomycota	[DQ536474.1]
<i>Rhopalomyces elegans</i>	não-alvo	Zygomycota	[AY635834.1]
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	não-alvo	Zygomycota	[DQ322627.1]

Nessa análise, verifica-se que membros das classes Archaeoporales e Paraglomerales formam clades mais distantes filogeneticamente dos demais Glomeromycota, o que está de acordo com outros estudos filogenéticos com base no gene rRNA 18S desses fungos (REDECKER; MORTON; BRUNS, 2000). Além disso, com as sequências desse estudo e utilizando o programa Sequencher 4.6, foi observado que esses dois grupos basais de FMAs estão associados com outros fungos em um agrupamento a 90 % de similaridade, enquanto as sequências restantes de FMAs formam um agrupamento distinto. Há formação de um agrupamento com todos as sequências de FMAs a 89 % de similaridade, mas esse também inclui sequências de vários outros fungos. Ainda assim, uma sequência consenso formada somente por Glomeromycota foi obtida após alinhamento das sequências com o programa *Multalin* e utilizada para o desenho de iniciadores. No entanto, não há uma região conservada no gene rRNA 18S de Glomeromycota que exclua outros fungos. Portanto, a divergência de sequências do gene rRNA 18S dentro do grupo de Glomeromycota impossibilita o desenho de iniciadores específicos para amplificar uma região do gene rRNA 18S comum a todos os FMAs.

Ao contrário do presente trabalho, Lee, Lee e Young (2008) desenharam os iniciadores AML1 e AML2, específicos para todos os fungos de Glomeromycota, inclusive os grupos basais Archaeosporales e Paraglomerales. No entanto, verifica-se 100 % de similaridade quando alinha-se o iniciador AML1 com sequências de fungos não-alvo do banco Genbank, tais como as sequências do gene rRNA 18S de *Taphrina wiesneri* (Ascomycota, acesso AY548293.1), *Amanita brunnescens* (Basidiomycota, acesso AY707096.1), *Rhizidium endosporangiatum* (Chytridiomycota, acesso DQ536484.1) e *Endogone pisiformis* (Zygomycota, acesso DQ322628.1) (dados não mostrados). O AML2 pode ser usado alternativamente como o segundo iniciador (reverso) na reação de amplificação, apesar de ele apresentar as 7 primeiras bases na extremidade 3' similar a alguns fungos não-alvo (dados não mostrados).

Figura 5 – Relações filogenéticas entre os diferentes fungos micorrízicos arbusculares determinadas por neighbor-joining, com base nas sequências dos genes rRNA 18S. Essas são sequências representativas dos grupos utilizados para o desenho de iniciadores. Os números sobre os ramos indicam a percentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. A barra representa duas substituições a cada 100 nucleotídeos. Os nomes dos iniciadores desenhados nesse trabalho estão grafados em itálico e negrito, abaixo do nome dos seus grupos – Gigasporaceae, Acaulosporaceae, *Glomus* grupo A e *Glomus* grupo B. As linhas transversais tracejadas indicam famílias ou grupos e as linhas cheias indicam os filos

O baixo número de sequências e espécies de Diversisporaceae e Pacisporaceae disponíveis nos bancos de dados públicos é insuficiente para o desenho de iniciadores específicos, por essa razão, esses dois grupos de FMAs não foram considerados para o desenho dos iniciadores grupo-específicos.

Desenho de iniciadores grupo-específicos. Utilizando os programas *Beacon Designer 7.02*, *Primer3* e a busca manual, foram encontradas por volta de 150 sequências de oligonucleotídeos com potencial para serem usadas como iniciadores. Para os ensaios de PCR, sete desses oligonucleotídeos foram selecionados com base na avaliação de especificidade utilizando o BLAST e o alinhamento com sequências alvo e não-alvo, e segundo as propriedades dos iniciadores avaliadas no programa Oligo Analyzer. O programa *Beacon Designer 7.02* não possibilitou o desenho de iniciadores específicos. As sequências dos sete iniciadores selecionados são apresentadas na Tabela 5, juntamente com suas respectivas temperaturas de desnaturação (T_m), calculada com o programa Oligo Analyzer, e tamanho esperado dos amplicons quando utilizados com o iniciador nu-SSU-1196 modificado.

Nas Figuras 6 a 11 são mostrados os alinhamentos dos iniciadores com as sequências alvo e diversas sequências não-alvo, representadas pelos grupos filogenéticos Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Fanerógamas e *Homo sapiens*.

Tabela 5 – Iniciadores selecionados e suas respectivas temperaturas de desnaturação (T_m) e tamanho de amplicons esperados quando utilizados com o iniciador nu-SSU-1196 modificado

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Especificidade	T _m (°C)	Tamanho esperado do amplicon (pb)
ACAU220	GGG GTT TCC CAT TGG TGR ATC AT	Acaulosporaceae	64.6	995
GLOMB652	TAA GGG GTA TGA ACT GGT GTA G	<i>Glomus</i> Grupo B	60.3	565
GLOMB673	GTC AAT TTC TCA CCT TCT GGA G	<i>Glomus</i> Grupo B	60.3	544
GIGA202	AAA CCA ATA RCC TTC GGG TTT C	Gigasporaceae	60.3	987
GIGA615	TAG TTG AAT TTC GGG GTT CTA C	Gigasporaceae	58.4	574
GLOMA189	TTA GAT AAA AAA CCA ATA TCG GG	<i>Glomus</i> Grupo A	55.7	1018
GLOMA690	CGT AAT GCC ATT AAT TTG GTG T	<i>Glomus</i> Grupo A	56.5	517

ACAU220	GGGGTTTCCCATTTGGTGRATCAT
<i>Acaulospora longula</i>	TTTTGGGGTTTCCCATTTGGTGGATCATATAACTTT
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	GCAAGGGGTTTCCCATTTGGTGAATCATATAACTTT
<i>Acaulospora laevis</i>	GCAAGGGGTTTCCCATTTGGTGAATCATATAACTTT
<i>Entrophospora colombiana</i>	GCAAGGGGTTTCCCATTTGGTGAATCATATAACTTT
<i>Scutellospora heterogama</i>	-CTTCGGGTTTCAC--TTGGTGATTCATGATAACTTT
<i>Pacispora scintilans</i>	TTCG-GGGTTTC-CTTTGGTGATTCATGATAACTTT
<i>Glomus intraradices</i>	GCAACCGA-TTC-CTTTGGTGATTCATAATAACTTT
<i>Glomus etunicatum</i>	GCAACCAACTAAACCTTTGGTGATTCATGATAACTTT
<i>Paraglomus brasilianum</i>	TATGCCCG--AA-CTGTGGTGAATCATGATAACTTG
<i>Archaeospora leptoticha</i>	TTCGGGCGAGTCCC--TTGGTGATTCATGGTAACCTTT
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-CTCGCCGCTCCC--TTGGTGATTCATAATAACTTC
<i>Rhizidium endosporangiatum</i>	-GCAACCGTTCT--TTGGTGATTCATGGTAACCTTT
<i>Chytriumyces hyalinus</i>	---AAACGGTTCT--TTGGTGATTCATAGTAACCTTT
<i>Capnodium coffeae</i>	-CCCTTCGGGGTCAATGGTGAATCATATAACTTA
<i>Ustilago tritici</i>	-CTCCTCGGAGTT--TGGCGATTCATAATAACTTC
<i>Rhizopus stolonifer</i>	TAAACCTGTTTC--TTGGTGAATCATATAATTA
<i>Endogone pisiformis</i>	-AACCACATC---TGGTGATTCATAATAACTTT
<i>Cladonia caroliniana</i>	-CCCTTCGGGGTCTTTGGTGATTCATAATAACTTC
<i>Zea mays</i>	TCTGCCCCCGGAT--CCGATGATTCATGATAACTTG
<i>Glycine max</i>	TCTGCCTGTTGCT--TTGATGATTCATGATAACTCG

Figura 6 – Local de ancoramento do iniciador ACAU220 (5'→ 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. O iniciador e o local de iniciação nas sequências alvo são mostrados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador estão marcadas em cinza

GIGA202	AAACCAATARCCTTCGGGTTTC
<i>Scutellospora heterogama</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora calospora</i>	AGAT-GAAAAACCAATAGCCTTCGGGTTTCAC-----TTGGTG
<i>Scutellospora projecturata</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTCAC-----TTGGTG
<i>Gigaspora gigantea</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-C----TTGGTG
<i>Gigaspora margarita</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-C----TTGGTG
<i>Gigaspora rosea</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-C----TTGGTG
<i>Scutellospora gilmorei</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora fulgida</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora spinosissima</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora gregaria</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora weresubiae</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AT----ATGGTG
<i>Scutellospora cerradensis</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Gigaspora albida</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-C----TTGGTG
<i>Scutellospora nodosa</i>	AGGT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTCAG----TTGGTG
<i>Scutellospora castanea</i>	AGAT-AAAAACCAATAACCTTCGGGTTTC-AC----TTGGTG
<i>Scutellospora aurigloba</i>	AGAT-AAAAACCAATAGCCTTCGGGTTTCAC----TTGGTG
<i>Pacispora scintillans</i>	AGATAAAAAACCAATAGCCTTCGGGTTTC--TCCT-TTGGTG
<i>Glomus intraradices</i>	AGATAAAAAACCAATATCGGGCAACCGAT--TCCC-TTGGTG
<i>Acaulospora longula</i>	AGATAAAAAACCAATAACTCCTTTTGGGGTTTCCCATTTGGTG
<i>Glomus etunicatum</i>	AGATAAAAAACCAACAGTTGGGCAACCAACTAAACCTTTGGTG
<i>Paraglomus brasilianum</i>	AGATAAAAGCCAAACCGGCTTATGCCGGAAC---GTGGTG
<i>Archaeospora leptoticha</i>	AGATACAAAACCAATCTGCTCTCGGGCGAGTCCC-TTGGTG
<i>Capnodium coffeae</i>	AGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCAA-----T-GGTG
<i>Cladonia caroliniana</i>	AGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCC-----TTGGTG
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AGATAAAAAACCGACGCGGCTCGCCGCTCCC-----TTGGTG
<i>Endogone pisiformis</i>	AGATAAAAAACCAACGTGGGCAACCACTCAT-----CTGGTG
<i>Ustilago tritici</i>	AGAT-AAAAACC-ATCCTCTCGGAGT-----TTGGTG
<i>Chytriumyces hyalinus</i>	AGATAAAAAACCAACCCGGGAACGGTT-C-T-----TTGGTG
<i>Rhizidium endosporangiatum</i>	AGATAAAAAACCAACCCGGGCAACCGGTTCT-----TTGGTG
<i>Rhizopus stolonifer</i>	AGAT--AAAACCAACGCGGGGTAAACCTGTTTC--TTGGTG
<i>Zea mays</i>	AGATAAAAGGCTGACGCGGCTCTGCCGCGGAT--CCGATG
<i>Glycine max</i>	AGATAAAAGGTCAACAAGGCTCTGCCTG-TTGCT-TTGATG
<i>Homo sapiens</i>	AGAT-CAAAACCAACCCGGTCAACCCCTCTCCGGCCCCGGCC

Figura 7 – Local de ancoramento do iniciador GIGA202 (5'→ 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. O iniciador e o local de iniciação nas sequências alvo são mostrados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador estão marcadas em cinza

GIGA615	TAGTTGAATTCGGGGTTCTAC
<i>Scutellospora heterogama</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCCACCGTTG
<i>Scutellospora calospora</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora projecturata</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Gigaspora gigantea</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Gigaspora margarita</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Gigaspora rosea</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora gilmorei</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora fulgida</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora spinosissima</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora gregaria</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora weresubiae</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora cerradensis</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Gigaspora albida</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTCTACCGTTG
<i>Scutellospora nodosa</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGAAATTTTACCGTTG
<i>Scutellospora castanea</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTTACCGTTG
<i>Scutellospora aurigloba</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGATTCTACCGTCG
<i>Pacispora scintillans</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGAAATTTTATATCG
<i>Glomus intraradices</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGGTTAGTAGGTTG
<i>Acaulospora longula</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGATTTGTAGTTG
<i>Glomus etunicatum</i>	GCTCGTAGTTGAATTCGGGATTGACACATCG
<i>Paraglomus brasilianum</i>	GCTCGTAGTTGAACCTTCAGGCCTGGCTGGACG
<i>Archaeospora leptoticha</i>	GCTCGTAGTTGAATTTGGGCTGGGCGGGCG
<i>Capnodium coffeae</i>	GCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCG
<i>Cladonia caroliniana</i>	GCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGACCG
<i>Pleurotus ostreatus</i>	GCTCGTAGTTGAACCTTCAGACCTGGCTGGGCG
<i>Endogone pisiformis</i>	GCTCGTAGTTGAATTTAGCTCTGGCTGGGCG
<i>Ustilago tritici</i>	GCTCGTAGTTGAAGTTTGGTCCTCGGACGCTGG
<i>Chytrium hyalinus</i>	GCTCGTAGTTGAATTTGGGCCGGGTTGAAG
<i>Rhizidium endosporangium</i>	GCTCGTAGTTGAATTTGGGCCTGGGCTGGGCG
<i>Rhizopus stolonifer</i>	GTCCGTAGTCAAACCTTAGTCTT--ACTGGCG
<i>Zea mays</i>	GCTCGTAGTTGGACCTTGGGCCGGGCGGGTG
<i>Glycine max</i>	GCTCGTAGTTGGACCTTGGGTTGGGTGATCG
<i>Homo sapiens</i>	GCTCGTAGTTGGATCTTGGGAGCGGGGGGCG

Figura 8 – Local de ancoramento do iniciador GIGA615 (5'→ 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. O iniciador e o local de iniciação nas sequências alvo são mostrados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador estão marcadas em cinza

GLOMB652	TAAGGGGTATGAACCTGGTGTAG
<i>Glomus luteum</i>	TGCCTTAAGGGGTATGAACCTGGTGTAGTCAATTTCTCACCTTCTGGAG--AACC
<i>Glomus lamellosum</i>	TGCCTTAAGGGGTATGAACCTGNTGTACTCAATTTCTCACCTTCTGGAG--AACC
<i>Glomus etunicatum</i>	TGCCTTAAGGGGTATGAACCTGGTGTAGTCAATTTCTCACCTTCTGGAG--AACC
<i>Glomus viscosum</i>	TGCCTTAAGGGGTATGAACCTGGTGTAGTCAATTTCTCACCTTCTGGAG--AACC
GLOMB673	GTCAATTTCTCACCTTCTGGAG
<i>Pacispora scintillans</i>	AATCAACAGG--TTCGTACTGATTTTAAAGAAATTTCT--ACCTTCTGGAG--AACC
<i>Glomus intraradices</i>	ATGCCCTCTGG--TATGTACTGGTCTCACTGATTCCT--CCTTCTTATGAACC
<i>Acaulospora longula</i>	GGCTTAACCTG--TCCGTATTGACTTGATGGATTCTT--ACCTTC--TGAGTAACC
<i>Scutellospora heterogama</i>	GGG--CTATTG--TCTGTACTGGTGTGTGGAATTTCT--ACCTTCTGGG--AACC
<i>Paraglomus brasilianum</i>	GCCTTCCGGG--TGAGTACTGTCTGTGGTCGGGTCTACCTTCTGGG--AAGC
<i>Archaeospora leptoticha</i>	ACCT--TCTGG--TGAGCACTGTTCCGACGCCGGGCTATCTCTCTGGTGAAC
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CG--CTTAACGG--CGTGTACTGT--CT--GGCTGGGCCTACCTCTTGGTG--AGCC
<i>Rhizidium endosporangium</i>	CGCCGCAA--GG--TGAGCACTGCT--C--CGGTCTGG--TCTTTCTTCTGGGGATC
<i>Chytrium hyalinus</i>	TGCC--AATGG--CATGTACT--T--TCGGCC--TGG--TCTTTCTTCTGGGGAAC
<i>Endogone pisiformis</i>	TGCCTTTACGG--TGGGTACTACT--TTGGCTGGGGTTACCTTCTGGTG--AGCT
<i>Rhizopus stolonifer</i>	GGTCTTCAATTGACC--AAGCTCAATGCT--TGCCGGAGACTCCATCTTCTATTA--GG
<i>Cladonia caroliniana</i>	CGCCTCACCGCT--GCACTGGC--TCGGCCGGGCTTCTCTCTGGG--AACC
<i>Ustilago tritici</i>	TGCTTCATTG--CATGTACTTG--GC--GGTCCGAGACTTCTCTCTGGTGAACG
<i>Capnodium coffeae</i>	CGCCTCACCGCT--GTACTGGT--CCGGCCGGGCTTCTCTCTGGG--AACC
<i>Zea mays</i>	CGCCGTACGGG--CA--GAACCGA--CCGGCTCGA--C--CCTTCTCTGGGCGA
<i>Glycine max</i>	CGCC--TCCGGTGT--GCACCGGT--CGGCTCTTCCCTTCTGGCCGGGAT--GCGC
<i>Homo sapiens</i>	CGCCGCGAGGCGAGCCACGCCCGT--CCCGCCCTTGCCT--CTCGGCGCCCC

Figura 9 – Locais de ancoramento dos iniciadores GLOMB652 e GLOMB673 (5'→ 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. Os iniciadores e os locais de de iniciação nas sequências alvo são grafados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador GLOMB652 estão marcadas em cinza, e marcadas em preto para o iniciador GLOMB673

GLOMA189	TTAGATAAAAAACCAATATCGGG
<i>Glomus manihotis</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-AAACCGA
<i>Glomus clarum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-AAACCGA
<i>Glomus intraradices</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus verruculosum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus caledonium</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus fragislistratum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus mosseae</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus coronatum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus geosporum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Glomus sinuosum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGGGCAACCTG
<i>Glomus coremioides</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATATCGGG-CAACCGA
<i>Acaulospora longula</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATAAATCC-TTTTGGG
<i>Glomus etunicatum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAACAGTTGGGCAACCAA
<i>Paraglomus brasilianum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAACC-C-GG-CTTA-TG
<i>Archaeospora leptoticha</i>	TATTTATTAGATACAAAACCAATCTCGT--CTTCGGG
<i>Scutellospora heterogama</i>	TATTTATTAGATAAAAA-CCAATAAC---CTTCGGG
<i>Pacispora scintilans</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAATA--GCC-CTTCGGG
<i>Pleurotus ostreatus</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCGACGC--GG-CT-CGCC
<i>Rhizidium endosporangiatum</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAACC-CGGG-CAACCGG
<i>Chytrium hyalinus</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAACC-CGG--AAACGG
<i>Endogone pisiformis</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAACGT--GGC-AACCAC
<i>Zea mays</i>	CATTTATTAGATAAAAGGCTGACG-CGGG-CTCTGCC
<i>Glycine max</i>	CATTTATTAGATAAAAGGTCAACA-CAGG-CTCTGCC
<i>Rhizopus stolonifer</i>	CAC TTATTAGATAAAA--CCAACG-CGGG-GTAAAC
<i>Cladonia caroliniana</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAAT--GCC-CTTCGGG
<i>Ustilago tritici</i>	TATTTATTAGATAAAAA-CCA-TC-CTC--CTCGGAG
<i>Capnodium coffeae</i>	TATTTATTAGATAAAAAACCAAT--GCC-CTTCGGG

Figura 10 – Local de ancoramento do iniciador GLOMA189 (5' → 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. O iniciador e o local de iniciação nas sequências alvo são mostrados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador estão marcadas em cinza

GLOMA690	CGTAATGCCATTAATTTGGTGT
<i>Glomus manihots</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Glomus clarum</i> (1)	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Glomus clarum</i> (2)	GAAC TGAATGTCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Glomus intraradices</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Glomus verruculosum</i>	AAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT CACGGGG
<i>Glomus caledonium</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT CACGGGG
<i>Glomus fragilistratum</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT CACGGGG
<i>Glomus mosseae</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT TACGGGG
<i>Glomus coronatum</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT CACGGGG
<i>Glomus geosporum</i>	GAAC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT CACGGGG
<i>Glomus sinuosum</i>	GAGC CGTAATGCCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Glomus coremioides</i>	GAGC CGTAATGTCATTAATTTGGTGT TGCGGGG
<i>Acaulospora longula</i>	TAACC AGC ATGCTATTAAGTTAGTG CGTTGGGG
<i>Pacispora scintilans</i>	GAAC CTTAATGTCATTTATTGATGTTT TGGGA
<i>Glomus etunicatum</i>	GAAC CCGATGCCCTTAATTGGGTGT CACGGGG
<i>Paraglomus brasilianum</i>	GAAG CGTCATGGCCTTAACCGGCCGT TGGCGGGG
<i>Archaeospora leptoticha</i>	GAGAC CGCATGCCCTTCGCTGGGTGT TCGGGG
<i>Scutellospora heterogama</i>	GAAC TATCATGTTATTAATTTAGCGT GGTAGGA
<i>Pleurotus ostreatus</i>	GAGC CGCGTGCCCTTTATT -GGTGTGCGTTGG
<i>Rhizidium endosporangium</i>	GATCTAGCGTGCGCTTCACT--GTGTGCGTTAG
<i>Chytridiomyces hyalinus</i>	GAACACGTGTGCACTTACTGTGTGTGCGTGGG
<i>Endogone pisiformis</i>	GAGCT GGCATGTTCTTAAC TGGATGTGTCAGGG
<i>Ustilago tritici</i>	-GAACGGCCG-- CCTTCG ---GGTGTCC--G
<i>Capnodium coffeae</i>	GAACCG-CATGCCCTTCACTGGGCGTGTGTGGG
<i>Cladonia caroliniana</i>	-AACCG-CATGGCCTTCATT-GGTCTGTGTTGGG
<i>Rhizopus stolonifer</i>	GTTCA TTAGGGGAAAATCTCTAGGG GTTTTTTT
<i>Zea mays</i>	ATGCGCTCCTGGCCTTAAC TGGCCGGT CGTGC
<i>Glycine max</i>	ATGCGCTCCTGCTTAACTGGCCGGT CGTGC
<i>Homo sapiens</i>	GCCCC CTCGATGCTCTAGCT GAGTGTCCCGCG

Figura 11 – Local de ancoramento do iniciador GLOMA690 (5' → 3') nas sequências do gene rRNA 18S de FMAs e outros organismos. O iniciador e o local de iniciação nas sequências alvo são mostrados em negrito. Similaridades das sequências dos organismos e do iniciador estão marcadas em cinza

Utilizando-se as amostras de DNA de FMAs provenientes de vasos de multiplicação em casa-de-vegetação, verificou-se que a temperatura de 61 °C foi adequada para o pareamento dos iniciadores desenhados e para a eficiente amplificação do gene rRNA 18S (Figura 12). Quando testados com amostras de DNA de FMAs não-alvo, os iniciadores utilizados não permitem a amplificação do DNA (Figura 13). O iniciador ACAU469 mostrou-se inespecífico (Figura 13) e o iniciador GLOMA348 apresentou pouca repetibilidade nas reações de amplificação. Em razão disso, esses dois iniciadores foram excluídos das análises posteriores. Foram feitas tentativas para a amplificação por meio de PCR *multiplex*, onde todos os 4 iniciadores foram usados ao mesmo tempo. Entretanto, não foi possível a amplificação.

Nas amostras de raízes de *Brachiaria* sp. e de cana-de-açúcar inoculadas com FMAs em casa-de-vegetação, os iniciadores também amplificaram especificamente o DNA alvo (Figura 12). No entanto, em amostras de raízes ambientais do experimento com gramíneas em pradaria dos EUA, foi necessária a utilização de *nested* PCR para a amplificação do gene rRNA 18S usando os iniciadores grupo-específicos. Sugere-se que esse fato seja decorrente da baixa

concentração do DNA alvo em relação ao DNA total das amostras. Com exceção dos iniciadores para Gigasporaceae, todos os outros iniciadores amplificaram DNA de amostras de raízes da pradaria. No entanto, a concentração de amplicons obtida com o iniciador ACAU220 foi baixa e não foi possível sua clonagem e sequenciamento. Os produtos de PCR usando DNA das amostras de raízes de pradaria foram clonados e sequenciados para verificar a especificidade dos iniciadores e determinar a estrutura da comunidade de FMAs. Pela análise de similaridade e filogenética, os iniciadores GLOMA189 e GLOMA690 amplificaram especificamente o DNA de *Glomus* grupo A em raízes de pradaria (Figuras 14 e 15).

Figura 12 – Amplificação por PCR do DNA de raízes de plantas cultivadas em casa-de-vegetação e inoculadas com FMAs. **1**, *Brachiaria* sp. inoculada com *Acaulospora scrobiculata* (Acaulosporaceae); **2**, *Brachiaria* sp. inoculada com *Gigaspora rosea* (Gigasporaceae); **3**, *Brachiaria* sp. inoculada com *Glomus clarum* (*Glomus* grupo A); **4**, *Brachiaria* sp. inoculada com *Glomus etunicatum* (*Glomus* grupo B); **5**, *Brachiaria* sp. inoculada com *G. rosea* e *Scutellospora heterogama*; **6**, cana-de-açúcar inoculada com mistura de FMAs (*G. clarum*, *Glomus intraradices*, *G. rosea*, *Paraglomus* sp., *Acaulospora* sp.); **7**, cana-de-açúcar não-inoculada; **8**, Controle negativo da primeira reação de PCR; **9**, Controle negativo da segunda reação de PCR; **10**, DNA de *Glomus caledonium* (*Glomus* grupo A) de vaso de multiplicação; **11**, DNA de *Acaulospora longula* (Acaulosporaceae) de vaso de multiplicação; **12**, DNA de *Scutellospora calospora* (Gigasporaceae) de vaso de multiplicação; **13**, DNA de *Glomus claroideum* (*Glomus* grupo B) de vaso de multiplicação; **M**, marcador molecular *PCR markers* (Promega); **pb**, tamanho, em pares de base, dos fragmentos do marcador molecular

Figura 13 – Amplificação do gene rRNA 18S por PCR em soluções contendo mistura de DNA não-alvo para cada iniciador. **Canaletas 1** – Iniciador ACAU220 e **2** – Iniciador ACAU469, específicos para Acaulosporaceae, em DNA de *Glomus claroideum*, *G. caledonium*, *Scutellospora calospora*, *Agaricus* sp., *Saccharomyces* sp.; **Canaletas 3** – Iniciador GLOMB652 e **4** – Iniciador GLOMB673, específicos para *Glomus* grupo B, em DNA de *Acaulospora longula*, *G. caledonium*, *S. calospora*, *Agaricus* sp., *Saccharomyces* sp.; **Canaletas 5** – Iniciador GLOMA189, **6** – Iniciador GLOMA348 e **7** – Iniciador GLOMA690, específicos para *Glomus* grupo A, em DNA de *A. longula*, *G. claroideum*, *S. calospora*, *Agaricus* sp., *Saccharomyces* sp.; **Canaletas 8** – Iniciador GIGA202 e **9** – Iniciador GIGA615, específicos para Gigasporaceae, em DNA de *A. longula*, *G. claroideum*, *G. caledonium*, *Agaricus* sp., *Saccharomyces* sp. **M** – Marcador molecular *PCR Markers* (Promega). **pb**, tamanho, em pares de base, dos fragmentos do marcador molecular

Figura 14 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de pradaria, utilizando o iniciador GLOMA189 e sequências de FMAs, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a porcentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. A barra representa uma substituição a cada 100 nucleotídeos. As sequências de raízes com adubação nitrogenada estão grafadas em preto e negrito, e das raízes sem adubação estão grafadas em vermelho e negrito

Figura 15 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de pradaria, utilizando o iniciador GLOMA690 e sequências de FMAs, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a porcentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. A barra representa uma substituição a cada 100 nucleotídeos. As sequências de raízes com adubação nitrogenada estão grafadas em preto e negrito, e das raízes sem adubação estão grafadas em vermelho e negrito

Dessa forma, confirma-se a especificidade dos iniciadores GLOMA189 e GLOMA690 para amplificação do grupo alvo *Glomus* grupo A. No entanto, os iniciadores GLOMB652, GLOMB673 e AM1 apresentaram viés de especificidade, amplificando apenas sequências relacionadas a Ascomycota, segundo as análises por BLAST (dados não mostrados). Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Jumpponen et al. (2005), os quais amplificaram as mesmas amostras de DNA, utilizando os iniciadores NS31 e AM1. Nesse primeiro trabalho, verificou-se que todas as sequências obtidas do referido gene eram relacionadas a *Glomus* grupo

A.

Portanto, na análise final após o sequenciamento dos amplicons de raízes da pradaria, os iniciadores GLOMA189 e GLOM1690 foram confirmados como específicos e funcionais em amostras ambientais. Os iniciadores GLOMB652, GLOMB673, GIGA202 e GIGA615 foram funcionais com amostras de raízes inoculadas com um único FMA, em condições de casa-de-vegetação, mas em amostras ambientais, os iniciadores GLOMB652 e GLOMB673 foram inespecíficos e os iniciadores GIGA202 e GIGA615 não amplificaram o DNA. Como não foi possível a clonagem e sequenciamento do fragmento amplificado com o iniciador ACAU220, não se pode afirmar se esse iniciador é funcional ou não.

2.3.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita

2.3.3.1 Atributos químicos do solo

Dos atributos químicos do solo avaliados, os valores de pH foram os que apresentaram diferenças significativas entre os manejos de colheita avaliados, enquanto a soma de bases (SB) e saturação por Mg foram afetados pela interação dos fatores manejo e variedade de cana-de-açúcar (Tabela 6). O solo sob o manejo SEM QUEIMA apresentou valor de pH ligeiramente maior (5,9 versus 5,8) (Tabela 7). Com relação à SB, o solo sob a variedade RB72454 SEM QUEIMA e sob a variedade SP801842 COM QUEIMA apresentaram valores 1,13 e 1,11 vezes maiores, respectivamente, em relação ao solo sob RB72454 COM QUEIMA (Tabela 8). O solo sob a variedade SP801842 SEM QUEIMA apresentou valor de % Mg 1,13 vezes maior em relação ao solo sob SP813250 SEM QUEIMA.

Apesar de maior aporte de material vegetal ao solo, os teores de carbono orgânico no solo não diferiram entre os tratamentos sob os dois manejos de colheita. Tal resultado pode ser devido ao pouco tempo decorrido após a colheita, sendo que a palhada ainda estava sobre o solo na época de amostragem. Provavelmente, parte do carbono não foi incorporado à matéria orgânica do solo mesmo 84 dias após a colheita. Nenhuma das 36 amostras apresentou Al trocável. Isso se deve ao fato de o pH estar próximo de 6,0, onde todo o Al se precipita, e também aos altos teores das bases Ca, Mg e K, sendo que a saturação da CTC por esses elementos variou de 68 % a 72 %.

Tabela 6 - Teste de F na análise da variância dos atributos químicos do solo para os fatores Manejo, Variedade e Interação Manejo x Variedade

Variáveis	Manejo	Variedade	Manejo*Variedade
Solo			
pH	*	ns	ns
H+Al (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns
Ca (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns
Mg (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns
K (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns
P (mg.kg ⁻¹)	ns	ns	ns
C orgânico (g.kg ⁻¹)	ns	ns	ns
CTC (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns
Soma de Bases	ns	ns	**
Saturação por bases (V%)	ns	ns	ns
Saturação por Ca (%)	ns	ns	ns
Saturação por Mg (%)	ns	ns	**
Saturação por K (%)	ns	ns	ns
Saturação por Na (%)	ns	ns	ns

ns – não significativo. * - p < 0,05; ** - p < 0,01

Tabela 7 - Valores médios das variáveis analisadas sob os manejos SEM QUEIMA (SQ) e COM QUEIMA (CQ) prévia à colheita

Variáveis	SQ	CQ
Solo		
pH	5,9 ± 0,22 A	5,8 ± 0,21 B
H+Al (mmol _c .kg ⁻¹)	12,2 ± 1,0 A	12,8 ± 1,00 A
Ca (mmol _c .kg ⁻¹)	18,5 ± 1,8 A	18,3 ± 2,97 A
Mg (mmol _c .kg ⁻¹)	7,6 ± 0,86 A	7,5 ± 0,92 A
K (mmol _c .kg ⁻¹)	4,1 ± 0,86 A	3,8 ± 0,75 A
P (mg.kg ⁻¹)	12,1 ± 4,56 A	13,7 ± 4,09 A
C orgânico (g.kg ⁻¹)	8,6 ± 1,99 A	9,1 ± 1,16 A
SB (mmol _c .kg ⁻¹)	30,2 ± 2,53 A	29,7 ± 3,89 A
CTC (mmol _c .kg ⁻¹)	42,4 ± 2,55 A	42,5 ± 3,88 A
Saturação por bases (V%)	71,0 ± 2,76 A	69,4 ± 3,28 A
Saturação por Ca (%)	43,6 ± 1,87 A	42,8 ± 1,83 A
Saturação por Mg (%)	17,8 ± 2,39 A	17,6 ± 3,55 A
Saturação por K (%)	9,6 ± 1,58 A	9,0 ± 1,16 A

Os valores correspondem à Média ± Desvio Padrão (seis repetições).

Letras iguais dentro da linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey-Kramer (P≤0.05).

SB - Soma das bases Ca⁺, Mg⁺ e K⁺.

Tabela 8 - Valores médios dos atributos químicos do solo na interação dos fatores Manejo de Colheita e Variedade

Atributo	SQ			CQ		
	SP813250	SP801842	RB72454	SP813258	SP801842	RB72454
pH	5,9 ± 0,23 a	6,0 ± 0,17 a	6,0 ± 0,25 a	5,8 ± 0,15 a	5,7 ± 0,23 a	5,8 ± 0,26 a
H+Al (mmol _c .kg ⁻¹)	12,8 ± 1,17 a	11,7 ± 0,82 a	12,2 ± 0,75 a	12,5 ± 0,55 a	13,0 ± 1,26 a	12,8 ± 1,17 a
Ca (mmol _c .kg ⁻¹)	18,2 ± 0,98 a	18,0 ± 1,10 a	19,3 ± 2,73 a	18,3 ± 3,14 a	19,7 ± 2,07 a	16,8 ± 3,31 a
Mg (mmol _c .kg ⁻¹)	7,0 ± 0,63 a	7,8 ± 0,41 a	7,8 ± 1,17 a	7,7 ± 0,82 a	7,5 ± 0,55 a	7,3 ± 1,37 a
K (mmol _c .kg ⁻¹)	4,0 ± 0,90 a	3,7 ± 0,72 a	4,5 ± 0,88 a	3,8 ± 0,84 a	3,8 ± 0,85 a	3,8 ± 0,68 a
P (mg.kg ⁻¹)	11,2 ± 0,98 a	11,7 ± 6,68 a	13,3 ± 4,68 a	13,3 ± 3,61 a	13,2 ± 3,76 a	14,5 ± 5,32 a
C orgânico (g.kg ⁻¹)	9,1 ± 0,60 a	7,4 ± 2,40 a	9,4 ± 2,12 a	8,3 ± 0,70 a	9,9 ± 1,00 a	8,9 ± 1,20 a
SB (mmol _c .kg ⁻¹)	29,2 ± 1,47ab	29,7 ± 1,21ab	31,7 ± 3,72 a	30,0 ± 4,15ab	31,2 ± 2,32 a	28,0 ± 4,77 b
CTC (mmol _c .kg ⁻¹)	42,0 ± 1,41 a	41,3 ± 1,63 a	43,8 ± 3,66 a	42,5 ± 4,14 a	44,2 ± 2,32 a	40,8 ± 4,71 a
Saturação por bases (V%)	69,4 ± 3,26 a	71,5 ± 1,27 a	72,2 ± 2,91 a	70,0 ± 3,20 a	70,1 ± 3,23 a	68,1 ± 3,60 a
Saturação por Ca (%)	43,3 ± 1,85 a	43,5 ± 1,79 a	44,0 ± 2,02 a	42,9 ± 1,83 a	44,5 ± 1,99 a	41,0 ± 1,95 a
Saturação por Mg (%)	16,7 ± 2,37 b	18,9 ± 1,72 a	17,8 ± 3,25ab	18,0 ± 3,08ab	17,0 ± 3,53ab	17,9 ± 3,68ab
Saturação por K (%)	9,4 ± 1,61 a	8,9 ± 1,01 a	10,4 ± 1,31 a	9,1 ± 0,63 a	8,7 ± 1,03 a	9,3 ± 1,53 a

Os valores correspondem à Média ± Desvio Padrão (seis repetições).

Letras iguais dentro da linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey-Krumer (P≤0.05).

SB - Soma das bases Ca⁺, Mg⁺ e K⁺.

A palhada deixada sobre o solo em manejo de colheita de cana-de-açúcar sem queima prévia pode influenciar os atributos físicos, químicos e biológicos do solo. No entanto, os trabalhos sobre alteração dos atributos químicos em função apenas da palhada aplicada no solo são escarços na literatura. Por isso, essa área de pesquisa carece de estudos mais aprofundados para se conhecer os efeitos da aplicação de palhada sobre os processos bioquímicos e físicos no solo.

2.3.3.2 Produtividade da cana-de-açúcar

O uso ou não da prática da queima previamente à colheita da cana-de-açúcar pode mudar o equilíbrio do agrossistema, por afetar, entre outras coisas, a estrutura da comunidade microbiana, afetando alguns processos bioquímicos importantes. O depósito de palha sobre o solo pode também interferir na produtividade da cana-de-açúcar (RESENDE et al., 2006). No entanto, no presente estudo, a produtividade da cana-de-açúcar não diferiu entre os dois manejos de colheita, entre as variedades ou entre as interações dos fatores manejo e variedade ($p>0,05$). No primeiro corte, a cana-de-açúcar colhida com manejo SEM QUEIMA apresentou uma produtividade de $127,4 \text{ Mg.ha}^{-1}$, enquanto que a colhida COM QUEIMA prévia apresentou uma produtividade de $138,6 \text{ Mg.ha}^{-1}$ (Tabela 9).

Tabela 9 - Produtividade, em Mg.ha^{-1} , das três variedades de cana-de-açúcar sob os dois manejos de colheita

Variedade	Manejo		Média
	SEM QUEIMA	COM QUEIMA	
SP813250	$135,0 \pm 7,3$	$134,1 \pm 14,2$	$134,6 \pm 10,1$
SP801842	$122,6 \pm 9,5$	$143,5 \pm 14,1$	$133,0 \pm 15,7$
RB72454	$124,7 \pm 1,7$	$138,4 \pm 13,8$	$131,5 \pm 11,5$
Média	$127,4 \pm 8,3$	$138,6 \pm 12,8$	$133,0 \pm 12,0$

Os dados representam média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média.

Apesar de maior aporte de material orgânico na forma de palhada, o qual pode variar de 7 a $15 \text{ Mg.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ na colheita mecanizada (CAMPOS, 2003), isso não foi suficiente para causar

mudanças no sistema de modo a aumentar a produção pelo menos no período avaliado. Tal resultado pode ser devido ao pouco tempo com manejo SEM QUEIMA, tendo havido apenas uma colheita após implantação do experimento e, desse modo, havendo pouca influência da palhada que foi depositada sobre o solo. Isso é demonstrado pela ausência de diferença no teor de carbono orgânico do solo entre o cultivo COM QUEIMA e o SEM QUEIMA prévia da cana-de-açúcar (Tabela 7). Além do teor de carbono, a maioria dos atributos químicos também não respondeu com os tratamentos de manejo de colheita. Mudanças de produtividade também não foram encontradas no primeiro corte da cana-de-açúcar em um ensaio de longa duração, em que Resende et al. (2006) mostram que aumentos na produtividade de cana-de-açúcar COM QUEIMA em relação à SEM QUEIMA apareceram somente na terceira colheita de um ciclo de produção de sete cortes e a partir da segunda colheita no segundo ciclo de seis cortes. Segundo os autores, as diferenças de produtividade dos dois manejos foram mais fortes no segundo ciclo, indicando que essas diferenças devem-se ao efeito cumulativo do aporte de material orgânico no solo ao longo dos anos, a partir do primeiro ciclo.

2.3.3.3 Fungos micorrízicos arbusculares no solo

O número de esporos no solo rizosférico nos diferentes tratamentos é apresentado na Figura 16. Não houve diferenças significativas (Tukey, $p > 0,05$) na densidade de esporos entre os dois manejos de colheita, entre as variedades de cana-de-açúcar ou na interação dos fatores manejo e variedade. O número médio de esporos por 50 g de solo variou de 23 no tratamento da variedade RB72454 COM QUEIMA a 34 no tratamento da variedade SP813250 SEM QUEIMA. O número médio de esporos está dentro da ampla faixa (19 a 815 esporos.50ml⁻¹) encontrada por Reis, Paula e Döbereiner (1999) em um estudo sobre comunidades de FMAs na forma de esporos no solo sob diversas lavouras de cana-de-açúcar.

Figura 16 – Número de esporos de FMAs no solo sob as variedades SP813250, SP801842 e RB72454 de cana-de-açúcar sob manejo SEM QUEIMA (barras cinzas) e COM QUEIMA (barras pretas). Tratamentos com mesma letra não diferiram pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

No presente trabalho, foram observados 33 morfotipos de FMAs no solo rizosférico de cana-de-açúcar, sendo 26 no manejo SEM QUEIMA e 24 no manejo COM QUEIMA. Destes, 18 morfotipos são comuns aos dois tratamentos. Dentre os esporos, foram recuperadas espécies dos gêneros *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora*, *Glomus* (inclusive *Glomus* grupo A – *Glomus mosseae* e *Glomus clarum*; e *Glomus* grupo B – *Glomus lamellosum*), *Paraglomus* e *Scutellospora* (Figura 17). Dentre o gênero *Archaeospora*, houve apenas esporos de *A. Trappei* em uma amostra de solo sob a variedade RB72454 no tratamento SEM QUEIMA. O tratamento com a variedade SP813250 SEM QUEIMA foi o único a não apresentar espécies do gênero *Paraglomus*. Alguns dos esporos são mostrados na Figura 18. Do filo Glomeromycota, não foram encontrados esporos dos gêneros *Ambispora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Intraspora*, *Kuklospora* e *Pacispora*.

O número de 33 espécies encontradas sob cana-de-açúcar está dentro da faixa encontrada em ecossistemas naturais ou manejados, de acordo com os trabalhos levantados por Douds e Millner (1999). Porém, a maior abrangência de espécies vegetais pode resultar em maior número de espécies de FMAs no solo. Blaszkowski (1994) recuperou 34 espécies de FMAs em ecossistema com 20 espécies de plantas hospedeiras. Andreola (1982), por outro lado, recuperou 7 espécies de FMAs em canaviais no município de Araras, SP. Em outro estudo, Reis, Paula e Döbereiner (1999) encontraram 18 espécie em 35 amostras coletadas sob 14 variedades de cana-

de-açúcar em três diferentes localidades. Andreola (1982) recuperou 7 espécies em cana-de-açúcar de um ensaio com tratamentos de aplicação de vinhaça e adubação nitrogenada e fosfatada. Portanto, as espécies recuperadas no presente trabalho podem indicar uma alta riqueza de espécies de FMAs no solo sob cana-de-açúcar do experimento avaliado.

Figura 17 – Número de morfotipos de FMAs por gênero recuperados de solo sob três variedades de cana-de-açúcar (SP813250, SP801842 e RB72454) com manejo SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia

As espécies de FMAs identificadas na forma de esporos e a frequência relativa de ocorrência nas amostras de solo são mostradas na Tabela 10. As espécies exclusivas do manejo SEM QUEIMA são *Acaulospora* sp. 3, *Acaulospora* sp. 6, *Glomus clarum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus mosseae*, *Glomus* sp. 10, *Scutellospora* sp. e *S. verrucosa*. Já as espécies que ocorrem apenas no manejo COM QUEIMA são *Acaulospora* sp. 2, *Acaulospora* sp. 5, *Acaulospora* sp. 7, *Glomus coremioides*, *Glomus* sp. 8, *Glomus* sp. 9 e *Paraglomus occultum*. As espécies com maior média de frequência (> 50 %) nas amostras de solo sob a cana-de-açúcar, em ordem decrescente, são *S. pellucida*, *A. morrowiae*, *Glomus* sp. 1, *A. scrobiculata*, *G. macrocarpum* e *Glomus* sp. 6. Pode-se notar que as espécies com frequências maiores do que 50 % nas amostras de cana-de-açúcar também apresentam as maiores médias de densidades de esporos (Tabela 11). São elas, em ordem decrescente: *Glomus* sp. 6, *Glomus macrocarpum*, *Glomus* sp.1, *S. pellucida*, *A. scrobiculata* e *A. morrowiae*. Essas 6 espécies dominam a comunidade, pois representam 79 %

dos esporos recuperados do solo sob cana-de-açúcar. Assim, essas espécies mais abundantes e frequentes nas amostras indicam que há a dominância de poucas espécies na comunidade de esporos de FMAs no solo.

No levantamento de Reis, Paula e Döbereiner (1999), foram encontradas espécies dos gêneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Paraglomus* e *Scutellospora*, sendo que as espécies predominantes nas três localidades estudadas foram: *Acaulospora* sp. 1 (denominação dos autores), *S. heterogama*, *Glomus etunicatum*, *Paraglomus occultum* e *Gigaspora margarita*. Provavelmente os diferentes históricos e características das áreas onde as 35 amostras foram coletadas por Reis, Paula e Döbereiner (1999) influenciaram na estrutura da comunidade de FMAs na forma de esporos, a qual diferiu daquela reportada no presente trabalho. É provável que a cana-de-açúcar não promova a seleção de espécies de FMAs no solo, já que as estruturas de comunidades de FMAs nos diferentes solos sob cana-de-açúcar não estão relacionadas. No entanto, tanto no presente estudo como no de Reis, Paula e Döbereiner (1999) e de Andreola (1982), há o predomínio de espécies do gênero *Glomus* dentre os gêneros de FMAs encontrados nas amostras.

Tabela 10 – Frequência de ocorrência (%) de espécies de FMAs em amostras de solo coletadas sob três variedades de cana-de-açúcar (SP813250, SP801842 e RB72454) com manejo SEM QUEIMA (SQ) e COM QUEIMA prévia (CQ)

Espécies	SQ			CQ			Média ¹
	SP813250	SP801842	RB72454	SP813258	SP801842	RB72454	
<i>Acaulopora mellea</i>	25	66	25	40	-	25	30,2
<i>Acaulopora morrowiae</i>	25	66	50	100	66	100	67,8
<i>Acaulopora scrobiculata</i>	75	33	50	80	33	75	57,7
<i>Acaulopora</i> sp. 1	25	33	-	-	33	25	19,3
<i>Acaulopora</i> sp. 2	-	-	-	-	33	-	5,5
<i>Acaulopora</i> sp. 3	-	-	25	-	-	-	4,2
<i>Acaulopora</i> sp. 4	-	33	25	20	-	-	13,0
<i>Acaulopora</i> sp. 5	-	-	-	-	33	-	5,5
<i>Acaulopora</i> sp. 6	-	-	25	-	-	-	4,2
<i>Acaulopora</i> sp. 7	-	-	-	-	-	25	4,2
<i>Archaeospora trappei</i>	-	-	25	-	-	-	4,2
<i>Gigaspora</i> sp.	25	33	25	60	33	25	33,5
<i>Glomus clarum</i>	25	-	-	-	-	-	4,2
<i>Glomus coremioides</i>	-	-	-	20	-	-	3,3
<i>Glomus lamellosum</i>	-	-	25	-	-	-	4,2
<i>Glomus macrocarpum</i>	50	33	50	60	66	75	55,7
<i>Glomus mosseae</i>	-	33	-	-	-	-	5,5
<i>Glomus sinuosum</i>	25	-	-	40	-	25	15,0
<i>Glomus</i> sp. 1	50	100	50	80	66	50	66,0
<i>Glomus</i> sp. 2	-	33	-	40	33	-	17,7
<i>Glomus</i> sp. 3	50	33	-	20	-	-	17,2
<i>Glomus</i> sp. 4	50	33	25	20	33	25	31,0
<i>Glomus</i> sp. 5	25	33	25	-	33	-	19,3
<i>Glomus</i> sp. 6	50	66	50	80	33	50	54,8
<i>Glomus</i> sp. 7	-	-	50	20	-	-	11,7
<i>Glomus</i> sp. 8	-	-	-	-	33	-	5,5
<i>Glomus</i> sp. 9	-	-	-	20	-	-	3,3
<i>Glomus</i> sp. 10	25	-	-	-	-	-	4,2
<i>Paraglomus laccatum</i>	-	33	25	-	33	50	23,5
<i>Paraglomus occultum</i>	-	-	-	20	-	-	3,3
<i>Scutellospora pellucida</i>	75	100	25	100	66	50	69,3
<i>Scutellospora</i> sp.	-	33	-	-	-	-	5,5
<i>Scutellospora verrucosa</i>	25	-	-	-	-	-	4,2
Média ¹	18,94	24,06	17,42	24,85	19,00	18,18	

¹ – Média das frequências de ocorrência de espécies de FMAs.

Tabela 11 – Número de esporos de FMAs em solo sob as variedades SP813250, SP801842 e RB72454 com manejo SEM QUEIMA (SQ) e COM QUEIMA prévia (CQ)

Espécies	SQ			CQ			Média*
	SP813250	SP801842	RB72454	SP813258	SP801842	RB72454	
<i>Acaulospora mellea</i>	0,50	1,33	0,50	0,40	-	4,75	1,25
<i>Acaulospora morrowiae</i>	0,50	2,33	1,50	2,80	3,67	1,75	2,09
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	8,25	1,33	1,50	5,00	0,67	0,75	2,92
<i>Acaulospora</i> sp. 1	0,50	0,33	-	-	1,67	0,25	0,46
<i>Acaulospora</i> sp. 2	-	-	-	-	0,67	-	0,11
<i>Acaulospora</i> sp. 3	-	-	0,50	-	-	-	0,08
<i>Acaulospora</i> sp. 4	-	0,67	0,50	0,40	-	-	0,26
<i>Acaulospora</i> sp. 5	-	-	-	-	0,33	-	0,06
<i>Acaulospora</i> sp. 6	-	-	0,25	-	-	-	0,04
<i>Acaulospora</i> sp. 7	-	-	-	-	-	0,25	0,04
<i>Archaeospora trappei</i>	-	-	0,50	-	-	-	0,08
<i>Gigaspora</i> sp.	0,25	0,33	0,25	0,60	0,67	0,25	0,39
<i>Glomus clarum</i>	0,25	-	-	-	-	-	0,04
<i>Glomus coremioides</i>	-	-	-	0,40*	-	-	0,09*
<i>Glomus lamellosum</i>	-	-	0,25	-	-	-	0,04
<i>Glomus macrocarpum</i>	3,25	0,67	9,75	3,20	7,67	2,25	4,46
<i>Glomus mosseae</i>	-	0,33	-	-	-	-	0,06
<i>Glomus sinuosum</i>	0,25*	-	-	0,40*	-	0,25*	0,17*
<i>Glomus</i> sp. 1	2,75	9,00	1,00	8,40	2,67	2,00	4,30
<i>Glomus</i> sp. 2	-	1,00	-	0,40	0,67	-	0,34
<i>Glomus</i> sp. 3	1,25	0,33	-	0,20	-	-	0,30
<i>Glomus</i> sp. 4	0,75	1,00	1,00	0,40	1,00	0,25	0,73
<i>Glomus</i> sp. 5	1,25	1,33	0,25	-	0,67	-	0,58
<i>Glomus</i> sp. 6	9,25	4,00	2,75	3,60	4,00	5,00	4,77
<i>Glomus</i> sp. 7	-	-	2,00	0,60	-	-	0,43
<i>Glomus</i> sp. 8	-	-	-	-	1,00	-	0,17
<i>Glomus</i> sp. 9	-	-	-	0,20	-	-	0,03
<i>Glomus</i> sp. 10	0,25	-	-	-	-	-	0,04
<i>Paraglomus laccatum</i>	-	0,33	0,50	-	0,67	0,50	0,33
<i>Paraglomus occultum</i>	-	-	-	0,20	-	-	0,03
<i>Scutellospora pellucida</i>	5,00	4,00	0,50	3,80	4,33	4,75	3,73
<i>Scutellospora</i> sp.	-	0,33	-	-	-	-	0,06
<i>Scutellospora verrucosa</i>	0,25	-	-	-	-	-	0,04

Dados representam as médias (seis repetições) do número de esporos por 50 g de solo.

* - Média do número de esporocarpos por 50 g de solo.

Figura 18 – Esporos de FMAs coletados sob cana-de-açúcar. (A) *Acaulospora scrobiculata*; (B) *Glomus macrocarpum*.; (C) *Scutellospora pellucida*; (D) *Glomus* sp. 6.; (E) *Acaulospora morrowiae*

A riqueza observada, as estimativas de riqueza de espécies determinadas pelos métodos de ACE (CHAO; LEE, 1992) e CHAO-1 (CHAO, 1984), e os índices de diversidade não diferiram entre os manejos de colheita, entre as variedades de cana-de-açúcar ou na interação dos fatores manejo e variedade (Tabela 12). O número de espécies dentro de cada tratamento da interação manejo e variedade variou de aproximadamente 6 a 8, e a estimativa média de espécies por tratamento foi de aproximadamente 12 (ACE) e 10 (CHAO-1). Considerando-se todas as amostras, a cobertura de amostragem foi de aproximadamente 98 %.

Pela análise de RDA, as variáveis CO, P, H+Al, % Bases, CTC e Mg foram escolhidas com o uso do *Forward Selection* do programa “Canoco fo Windows 4.5” (Figura 19). Essas variáveis explicam significativamente e se relacionam à variabilidade dos dados pelos teste de permutação de Monte-Carlo. As relações são significativas entre as espécies de FMAs e as variáveis químicas do solo no primeiro eixo canônico ($p = 0,038$) e em todos os eixos canônicos ($p = 0,034$). Os dois primeiros eixos explicam 16,9 % da variabilidade dos dados, sendo 10,1 % no primeiro eixo e 6,8 % no segundo. As variáveis químicas do solo explicam 4,2 % da variabilidade, sendo que 25,9 % desse valor é explicado nos dois primeiros eixos. Outros autores encontraram valores de correlações significativos abaixo de 0,60 entre variáveis do solo e as

espécies de FMAs na forma de esporos (CUENCA; MENESES, 1996; CARRENHO et al., 2001), sugerindo que os atributos do solo afetam a distribuição de espécies de FMAs na forma de esporos no solo, porém em menor magnitude do que outros fatores desconhecidos.

A RDA não indicou separação das amostras de acordo com o manejo de colheita ou com variedades de cana-de-açúcar. Pelas variáveis do solo, verifica-se que a maioria das espécies estão relacionadas positivamente com o teor de carbono orgânico (CO) ou com a saturação da CTC por bases. As espécies relacionadas positivamente com a saturação por bases têm relação negativa com o teor de H+Al, o que é coerente, uma vez que quanto maior o teor de bases na CTC, menor a quantidade de H e Al trocáveis. A relação positiva de apenas algumas espécies de FMAs com o teor de P é devido, provavelmente, pelo fato de que altas concentrações desse elemento inibem a colonização micorrízica e, posteriormente, diminuiriam a esporulação das outras espécies não relacionadas positivamente com o teor de P. Dentre as espécies mais abundantes e frequentes (Tabelas 10 e 11): *Glomus* sp. 6, *Glomus* sp. 1 e *S. pellucida* são relacionadas positivamente à saturação de bases, *G. macrocarpum* e *A. morrowiae* estão relacionadas positivamente com o teor de P, mas negativamente com a saturação de bases e teor de CO, e *A. scrobiculata* está relacionada positivamente com o teor de CO. Assim, a RDA mostra que há relação da variabilidade das espécies com as variáveis do solo, mas não permite a separação de amostras de acordo com os tratamentos.

Tabela 12 – Média da riqueza observada, estimativas de número de espécies, índices de diversidade e cobertura de amostragem da comunidade de FMAs calculadas a partir dos esporos coletados e identificados sob as variedades SP813250, SP801842 e RB72454 com manejo SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia

Comunidade	S _{FMA} s ^a	Índices de diversidade			Estimativa de riquezas de UTOs		ECA ^e
		Shannon ^b	1/D ^{b,c}	Equitabilidade ^d	ACE-1	Chao1	
SEM QUEIMA							
SP813250	6,25	1,38	3,48	0,80	11,08	9,45	0,88
SP801842	8,00	1,71	4,52	0,82	14,07	11,5	0,88
RB72454	5,75	1,39	3,73	0,81	6,53	6,1	0,93
COM QUEIMA							
SP813258	8,20	1,76	4,94	0,85	12,32	11,66	0,90
SP801842	6,67	1,57	4,45	0,87	7,07	6,9	0,98
RB72454	6,00	1,36	3,20	0,81	18.93	12,25	0,61
Todos os tratamentos ^f	33	2,48	8,78	0,71	56,2	48,1	0,983

Os valores correspondem à Média $\pm$ Desvio Padrão (seis repetições).

^a – Riqueza de espécies de FMAs na forma de esporos; ^b – Estimador de máxima semelhança; ^c – Recíproco do índice de Simpson; ^d – Equitabilidade de Pielou; ^e - Estimativa de Cobertura da Amostragem; ^f – Dados representam os valores obtidos de todas as amostras.

Figura 19 – Triplot de espécies de FMAs, amostras, e variáveis do solo sob cana-de-açúcar da Análise de Redundância (RDA). Realizou-se a análise com *Forward Selection*, selecionando teor de C orgânico no solo (CO), H+Al, saturação de bases, P, CTC e teor de Mg, em amostras sob cana-de-açúcar com colheita SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia. ($P = 0,038$ para o primeiro eixo canônico, $P = 0,034$ para a soma dos eixos, segundo o teste de Monte Carlo)

Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Reis, Paula e Döbereiner (1999) verificaram que a área com manejo SEM QUEIMA da cana-de-açúcar apresentou maior riqueza de espécies de FMAs no solo. No entanto, esses autores compararam lavouras SEM QUEIMA e COM QUEIMA com diferentes históricos, o que dificulta a comparação direta das amostras.

Por fim, esse é um dos primeiros levantamentos de FMAs em solo sob cana-de-açúcar a campo no Brasil e os dados aqui apresentados servirão como base de comparação para futuros estudos sobre a contribuição das MAs para a cultura. Os indicadores de diversidade de FMAs na forma de esporos: densidade de esporos, riqueza, diversidade e estimativa de número de espécies não apresentam diferenças entre os manejos de colheita, entre as variedades ou na interação dos fatores manejo e variedade. A RDA, utilizada para a ordenação dos dados, foi significativa,

porém não permitiu qualquer discriminação com base nos tratamentos. O pouco tempo decorrido desde a implantação da cultura até a avaliação das amostras de solo (20 meses) pode ter contribuído para que essas diferenças na comunidade de FMAs na forma de esporos entre os tratamentos não fosse observada. Como alguns esporos podem ficar em estado de dormência (TOMMERUP, 1983; GEMMA; KOSKE, 1988), parte das espécies de FMAs na forma de esporos presentes nas amostras pode ser reflexo dos cultivos anteriores à instalação do experimento. Assim, novas amostragens devem ser feitas após ter passado um período de tempo maior desde a implantação do experimento, pois é possível que efeitos significativos da alteração do manejo possam ser observados somente a longo prazo.

2.3.3.4 Colonização micorrízica intrarradicular

Todas as amostras de raízes de cana-de-açúcar analisadas apresentaram colonização micorrízica arbuscular. Foi possível visualizar e identificar várias estruturas de FMAs, incluindo hifa extrarradicular, apressório nas células da epiderme, hifas intercelulares e intracelulares, arbúsculos e hifas intracelulares enoveladas (pelotões) (Figura 20). A presença de arbúsculos típicos e de pelotões foram observados simultaneamente na mesma amostra tanto em raízes sob manejo SEM QUEIMA como COM QUEIMA.

A taxa de colonização variou de 30 % a 52 % e não foi significativamente diferente entre as variedades, mas variou significativamente ($p < 0,05$) entre os manejos SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia à colheita (Tabela 13). As raízes de plantas sob manejo SEM QUEIMA apresentaram as maiores taxas de colonização. A maior colonização micorrízica pode ser devido ao maior teor de umidade no solo, assegurada pela quantidade de palhada depositada após a colheita. Como visto em outros trabalhos, a umidade está positivamente correlacionada com a colonização intrarradicular (HE; MOURATOV; STEINBERG, 2002; LINGFEI; ANNA; ZHIWEI, 2005).

Figura 20 - Colonização micorrízica arbuscular em cana-de-açúcar (A a H). **ap** – apressório; **hi** – hifa intercelular; **pe** – ponto de entrada de hifa na raiz; **ar** – arbúsculo; **en** – hifa enovelada; **ve** – vesícula

Tabela 13 - Colonização micorrízica arbuscular (%) em raízes de cana-de-açúcar sob manejo SEM QUEIMA prévia e COM QUEIMA prévia à colheita

Variedade	Manejo	
	SEM QUEIMA	COM QUEIMA
SP813250	51,87 ± 10,85 aA	36,23 ± 10,44 aB
SP801842	45,20 ± 15,11 aA	30,10 ± 3,94 aB
RB72454	49,33 ± 6,43 aA	31,24 ± 10,88 aB

Os valores correspondem à Média ± Desvio Padrão (seis repetições).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A colonização micorrízica é pouca estudada em cana-de-açúcar e poucos trabalhos sobre o assunto foram publicados. Kelly et al. (2001) verificaram que plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação possuem taxas de até 60 % de colonização em baixos níveis de fósforo no solo (entre 2,7 e 8,2 mg P.kg⁻¹). No entanto, a micorrização não trouxe ganhos na massa seca das plantas. Takahashi (2005) e Souza (2006) estudaram a colonização micorrízica intrarradicular em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas e crescidas em casa-de-vegetação, em condições de baixo teor de P (20 mg.Kg⁻¹) e alto teor (200 mg.Kg⁻¹) no solo. A taxa de colonização intrarradicular variou de 10 a 34 % nos tratamentos com alto teor de P, e de 40 a 60 % nos tratamentos com baixo teor de P, sendo que Takahashi (2005) não observou alteração da produção de biomassa das plantas inoculadas em relação às não-inoculadas.

De acordo com a análise de correlação de Pearson e RDA das espécies de esporos no solo, não há correlação da taxa de colonização micorrízica arbuscular em cana-de-açúcar e a distribuição de esporos no solo. Porém, uma vez que a comunidade de FMAs medida pela ocorrência, densidade e diversidade de esporos no solo não apresentou diferenças entre os manejos após 20 meses de implantação do experimento, a colonização micorrízica arbuscular, a qual foi diferente entre os manejos e variedades, pode ser um parâmetro mais sensível às alterações que ocorrem no ambiente. Assim, a colonização micorrízica arbuscular poderia ser utilizada como um indicador de mudanças ambientais.

2.3.3.5 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS7e F1Ra em raízes de cana-de-açúcar

Da biblioteca de clones dos fragmentos do gene rRNA 18S amplificados com o par de iniciadores NS7 e F1Ra, de raízes de cana-de-açúcar sob manejo SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia à colheita, foram sequenciados 128 clones das amostras. Das sequências obtidas duas do tratamento SEM QUEIMA foram consideradas quiméricas e excluídas das demais análises. A comparação por BLAST das sequências obtidas com sequências conhecidas (Tabela 14) e análise filogenética (Figura 21) possibilitam a afiliação das mesmas ao reino Fungi. Todas as sequências obtidas de raízes de cana-de-açúcar do tratamento COM QUEIMA e a maioria do tratamento SEM QUEIMA são representadas por fungos do Filo Ascomycota. Em raízes do tratamento sob manejo SEM QUEIMA, 4 sequências (8,7 %) pertencem ao filo Zygomycota. Nenhum dos 126 clones apresentou similaridade elevada com sequências de FMAs, apesar de as amostras apresentarem colonização micorrízica intrarradicular considerável.

As sequências relacionadas à *Phoma* sp. apresentam dominância tanto na biblioteca de raízes provenientes de manejo SEM QUEIMA (68,1 % das sequências), como COM QUEIMA (80,2% das sequências). Depois dessas sequências, as maiores frequências observadas são de sequências relacionadas à *Leptosphaeria* (10,6 %) e à *Pleosporales* (4,3 %) em manejo SEM QUEIMA e relacionadas à *Fusarium* (7,9 %) em manejo COM QUEIMA. Membros das classes Eurotiomycetes e Sordariomycetes foram detectados apenas em raízes do tratamento sob manejo COM QUEIMA (clones B Scane D0408, B Scane E0909 e B Scane B0703), enquanto que os Zygomycetes (clones UB Scane C1105 e UB Scane G0814) foram detectados somente em raízes do tratamento sob manejo SEM QUEIMA. Dos 13 acessos com maior similaridade às sequências obtidas, determinada utilizando-se o BLAST, apenas três (*N. quadrisepata*, *Phoma* sp. e *Pleosporales* sp.) foram comuns às duas bibliotecas (Tabela 14).

As estimativas de riqueza, os índices de diversidade de UTOs e a estimativa de cobertura de amostragem são apresentados na Tabela 15. O número de UTOs detectadas foi de 10 para cana-de-açúcar do tratamento sob manejo SEM QUEIMA e 11 para a amostra do tratamento sob manejo COM QUEIMA. Não houve diferença significativa entre as estimativas de riqueza e índices de diversidade de UTOs dos dois sistemas de manejos de colheita. A estimativa de riqueza de UTOs relacionadas à raízes foi de 18 e 34 (segundo os índices ACE-1 e Chao1,

respectivamente) para o manejo SEM QUEIMA, e de 23 e 51 para o manejo COM QUEIMA prévia à colheita. Apesar de não apresentar diferenças de riqueza e de diversidade de UTOs entre os dois manejos, a comparação de curvas de cobertura homóloga e heteróloga, utilizando o webLIBSHUFF, mostrou que as comunidades fúngicas das raízes de cana-de-açúcar dos dois tratamentos são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 22). Para as duas bibliotecas de clones, o tamanho da amostra analisada foi suficiente para cobrir a maioria dos grupos filogenéticos. A taxa de cobertura homóloga foi aproximadamente 82 % em Distâncias Evolutivas maiores do que 0,01, que é o valor adotado para definir espécie em estudos com fungos (WALDROP et al., 2006; JUMPPONEN; JOHNSON, 2005; ANDERSON et al., 2003).

Tabela 14 – Similaridade das sequências dos clones do gene rRNA 18s obtidas por amplificação do DNA total de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por FMAs e utilizando os iniciadores NS7 e F1Ra em relação a sequências de bancos de dados públicos

Manejo	Clone	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade	Freq. ⁽¹⁾
SEM QUEIMA				
	UB SCane B0103	<i>Candida xylopsoci</i> [AY488128.1]	99 %	2,1 %
	UB SCane D0707	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [DQ678004.1]	100 %	2,1 %
	UB SCane D0208	<i>Heteromita globosa</i> [AY496043.1]	99 %	2,1 %
	UB SCane F0911	<i>Leptosphaeria korrae</i> [AF486626.1]	100 %	10,6 %
	UB SCane G0814	<i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i> [AF113427.1]	99 %	6,4 %
	UB SCane C1105	<i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i> [AF113427.1]	99 %	2,1 %
	UB SCane D0907	<i>Neophaeosphaeria quadrisepata</i> [AF250826.1]	99 %	2,1 %
	UB SCane H0915	<i>Phoma</i> sp. [AB252869.1]	99 %	68,1 %
	UB SCane E1010	<i>Pleosporales</i> sp. [AB195631.1]	99 %	4,3 %
COM QUEIMA				
	B SCane A0101	<i>Debaryomyces mycophilus</i> [AF440017.1]	98 %	1,3 %
	B SCane D1208	<i>Debaryomyces mycophilus</i> [AF440017.1]	98 %	1,3 %
	B SCane D0408	<i>Eupenicillium javanicum</i> [U21298.1]	100 %	1,3 %
	B SCane B0703	<i>Fusarium</i> sp. [AB245442.1]	99 %	7,9 %
	B SCane B1204	<i>Galactomyces geotrichum</i> [U00974.1]	100 %	1,3 %
	B SCane C0705	<i>Neophaeosphaeria quadrisepata</i> [AF250826.1]	99 %	1,3 %
	B SCane A0202	<i>Phoma</i> sp. [AB252869.1]	98 %	77,6 %
	B SCane A1002	<i>Phoma</i> sp. [AB252869.1]	98 %	2,6 %
	B SCane E1010	<i>Pleosporales</i> sp. [AB195631.1]	99 %	1,3 %
	B SCane E0909	<i>Talaromyces flavus</i> [M83262.1]	99 %	2,6 %

As sequências foram comparadas usando-se o BLAST. Cada clone representa um dos grupos formados por UPGMA. A coluna de frequência se refere à proporção dos clones do grupo em cada biblioteca.

⁽¹⁾ Frequência de sequências representadas pelo clone em cada um dos manejos.

⁽²⁾ Classe “Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis”.

Figura 21 – Relações filogenéticas entre a sequências do gene rRNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar com o par de iniciadores NS7 e F1Ra, e sequências de fungos determinadas usando-se neighbor-joining. Números sobre os ramos indicam a porcentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. Cada clone representa um dos grupos formados por UPGMA. Os valores entre parênteses representam a porcentagem do clone em cada biblioteca. A barra representa uma substituição a cada 100 nucleotídeos. Clones grafados em negrito em preto são referentes às raízes de cana-de-açúcar colhida SEM QUEIMA, enquanto os grafados em vermelho se referem às raízes de cana-de-açúcar COM QUEIMA prévia à colheita

* - Classe “Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis”

Tabela 15 - Estimativas de UTOs, índices de diversidade e cobertura de amostragem, determinadas com base no sequenciamento de clones do gene rRNA 18S de fungos associados a raízes de cana-de-açúcar com ou SEM QUEIMA prévia à colheita, obtidos utilizando-se o par de iniciadores NS7 e F1Ra

Comunidade	NS	NU	Estimativa de riquezas de UTOs		Índices de diversidade		ECA ^c
			ACE-1	Chao1	Shannon ^a	1/D ^{a,b}	
SEM QUEIMA	50	10	34 (14; 165)	18 (11; 53)	1,34 (0,99; 1,69)	2,33 (1,32; 9,09)	0,880
COM QUEIMA	76	11	51 (18; 246)	23 (13; 79)	0,99 (0,67; 1,31)	1,64 (0,78; 14,29)	0,908

Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança. NS – número de sequências. NU – número de UTOs. ^a Estimador de máxima semelhança; ^b – Recíproco do índice de Simpson; ^c – Estimativa de Cobertura da Amostragem; Distância evolutiva usada para as estimativas foi 0,01.

Figura 22 - Análise de LIBSHUFF de comunidade de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar sob dois manejos de colheita quando empregado o par de iniciadores NS7 e F1Ra. **A**, manejo SEM QUEIMA (homólogo) x manejo COM QUEIMA; **B**, manejo COM QUEIMA (homólogo) x manejo SEM QUEIMA. As comunidades são diferentes significativamente, com $P < 0,05$. A distribuição de $(Cy-Cyx)^2$ como uma função de D indica a diferença entre as duas comunidades

2.3.3.6 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS31 e AM1 em raízes de cana-de-açúcar

Das bibliotecas de clones do gene rRNA 18S de raízes de cana-de-açúcar SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia à colheita, foram sequenciados 47 e 42 clones, respectivamente. Das sequências obtidas 9 foram consideradas quimeras, com base nas análises feitas utilizando o *Chimera Check* e BLAST. Assim, para as análises posteriores, foram utilizadas 41 e 39 sequências dos tratamentos SEM QUEIMA e COM QUEIMA, respectivamente.

Todas as sequências foram mais similares ao Filo Ascomycota e não foi possível discriminar espécies a partir dessas sequências, de acordo com as comparações feitas utilizando-se o BLAST (Tabela 16) e a análise filogenética (Figura 23). Em uma das clades, há o agrupamento de diferentes classes de fungos: uma sequência de um clone do manejo COM QUEIMA (B AM1 D1107), duas sequências de *Phoma* (Ascomycota Mitospórico), e uma sequência de *Didymella* (Dothideomycetes). Esses resultados mostram que a região sequenciada não é informativa filogeneticamente. Nenhuma sequência apresentou alta similaridade com sequências de FMAs, apesar do iniciador AM1 ser, supostamente, específico para esse grupo de fungos. Assim mesmo, as riquezas de UTOs e os índices de diversidade foram estimados (Tabela 17). Da mesma forma, a comparação das bibliotecas por meio do programa webLIBSHUFF foi feita (Figura 24). Assim como no Brasil, os amplicons obtidos com o uso dos iniciadores NS31 e AM1 em amostras de DNA de cana-de-açúcar durante o estágio na Universidade do Estado do Kansas, EUA, resultou em sequências relacionadas somente à Ascomycota (dados não mostrados), mesmo fazendo-se a seleção de raízes finas e claras para a extração de DNA, não houve a amplificação do DNA de FMAs.

Não houve diferenças entre as estimativas de UTOs entre os dois manejos, utilizando-se sequências obtidas com ambos conjuntos de iniciadores. No entanto, o índice de diversidade de Shannon foi significativamente maior no manejo SEM QUEIMA, usando-se o par de iniciadores NS31 e AM1. Assim como no uso do conjunto de iniciadores NS7 e F1Ra, o emprego do par NS31 e AM1 resultou em uma taxa de cobertura elevada (Figura 24). De acordo com as análises de Libshuff, as duas bibliotecas foram significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 16 – Similaridade das sequências dos clones do gene rRNA 18s obtidas por amplificação do DNA total de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por FMAs e utilizando os iniciadores NS31 e AM1 em relação a sequências de bancos de dados públicos

Manejo	Clone	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade	Freq. ⁽¹⁾
SEM QUEIMA				
	UB AM1 G0414	<i>Fusarium oxysporum</i> [DQ916150.1]	99 %	12,2 %
	UB AM1 C0406	<i>Fusarium cerealis</i> [AF141947.1]	98 %	2,4 %
	UB AM1 H0315	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	99 %	53,7 %
	UB AM1 B0204	<i>Penicillium glabrum</i> [AF548090.1]	99 %	4,9 %
	UB AM1 D0107	<i>Phialophora verrucosa</i> [EF413614.1]	99 %	14,1 %
	UB AM1 B0303	<i>Phialophora verrucosa</i> [EF413614.1]	100 %	12,2 %
COM QUEIMA				
	B AM1 F0812	<i>Fusarium oxysporum</i> [DQ916150.1]	99 %	94,8 %
	B AM1 H0715	<i>Fusarium oxysporum</i> [DQ916150.1]	98 %	2,6 %
	B AM1 D1107	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	100 %	2,6 %

As sequências foram comparadas usando-se o BLAST. Cada clone representa um dos grupos formados por UPGMA. A coluna de frequência se refere à proporção dos clones do grupo em cada biblioteca.

⁽¹⁾ Frequência de sequências representadas pelo clone em cada um dos manejos.

⁽²⁾ Classe “Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis”.

Figura 23 – Relações filogenéticas entre a sequências do gene rRNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar com o par de iniciadores NS31 e AM1, e sequências de fungos determinadas usando-se neighbor-joining. Números sobre os ramos indicam a porcentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. Cada clone representa um dos grupos formados por UPGMA. Os valores entre parênteses representam a porcentagem do clone em cada biblioteca. A barra representa uma substituição a cada 100 nucleotídeos. Clones grafados em negrito em preto são referentes às raízes de cana-de-açúcar colhida SEM QUEIMA, enquanto os grafados em vermelho se referem às raízes de cana-de-açúcar COM QUEIMA prévia à colheita

* - Classe “Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis”

Tabela 17 - Estimativas de UTOs, índices de diversidade e cobertura de amostragem, determinadas com base no sequenciamento de clones do gene rRNA 18S de fungos associados a raízes de cana-de-açúcar com ou SEM QUEIMA prévia à colheita, obtidos utilizando-se o par de iniciadores NS31 e AM1

Comunidade	NS	NU	Estimativa de riquezas de UTOs		Índices de diversidade		ECA ^c
			ACE-1	Chao1	Shannon ^a	1/D ^{a,b}	
SEM QUEIMA	41	6	6,4 (6,0; 11,6)	6,5 (6,0; 14,4)	1,366 (1,103; 1,630)	2,92 (2,09; 4,84)	0,976
COM QUEIMA	39	3	4,0 (3,1; 14,1)	3,5 (3,0; 11,4)	0,320 (0,058; 0,583)	1,17 (0,49;-3,20)	0,974

Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança. NS – número de sequências. NU – número de UTOs. ^a Estimador de máxima semelhança; ^b – Recíproco do índice de Simpson; ^c – Estimativa de Cobertura da Amostragem; Distância evolutiva usada para as estimativas foi 0,01.

Figura 24 - Análise de LIBSHUFF de comunidade de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar sob dois manejos de colheita quando empregado o par de iniciadores NS31 e AM1. **A**, manejo SEM QUEIMA (homólogo) x manejo COM QUEIMA; **B**, manejo COM QUEIMA (homólogo) x manejo SEM QUEIMA. As comunidades são diferentes significativamente, com $P < 0,05$. A distribuição de $(Cy-Cyx)^2$ como uma função de D indica a diferença entre as duas comunidades

2.3.3.7 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores específicos para grupos de FMAs em raízes de cana-de-açúcar

Para determinar a estrutura da comunidade de FMAs por meio do sequenciamento dos amplicons, os iniciadores aqui desenhados e validados foram testados em amostras de raízes de cana-de-açúcar do campo. Após a amplificação de fragmentos do gene rRNA 18S com os iniciadores ACAU220, GIGA202, GLOMA690 e GLOMB673 e o sequenciamento dos amplicons, foram obtidas 161 sequências. Dessas, 35 foram retiradas das análises por consistirem quimeras ou sequências de baixa qualidade. Verificou-se que nenhum dos iniciadores desenhados foi específico para FMAs, de acordo com a comparação das sequências obtidas com sequências de bancos de dados por meio de BLAST (Tabelas 18, 19, 20 e 21). As sequências de parte do gene do rRNA 18S obtidas foram alinhadas para a análise filogenética (Figuras 25, 26, 27 e 28). As sequências obtidas não se agruparam com as sequências de fungos do filo Glomeromycota do banco de dados (GenBank). Os amplicons obtidos com o iniciador ACAU220, em sua maioria, foram mais similares a *Cladosporium* (Dothideomycetes, Ascomycota) (Tabela 18 e Figura 25). A maioria dos amplicons obtidos com o iniciador GIGA202 foram mais similares à *Fusarium* (Sordariomycetes, Ascomycota) (Tabela 19 e Figura 26). Quando utilizou-se o iniciador GLOMA690, a maioria dos amplicons foram mais similares a *Monodictys* (Sordariomycetes, Ascomycota) e a *Cryptococcus* (Tremellomycetes, Basidiomycota) (Tabela e Figura 27). Já com o uso do iniciador GLOMB673, a maioria dos amplicons foram mais similares a *Phoma* (Ascomycota mitospórico) (Tabela 21 e Figura 28). Com exceção de um amplicon obtido com o iniciador ACAU220 e alguns amplicons obtidos com o iniciador GLOMB673, os quais foram mais similares à Basidiomycota, todas os outros amplicons obtidos com o emprego dos iniciadores desenhados foram mais similares a Ascomycota. Portanto, uma vez que nenhuma sequência obtida está relacionada ao filo Glomeromycota, ao qual pertencem os FMAs, os iniciadores desenhados foram inespecíficos para identificação desses fungos nas raízes de cana-de-açúcar em condição de campo.

Mesmo assim, foram estimadas a riqueza de UTOs e os índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson com os dados obtidos. Pelo programa Spade, foram estimadas um total de 49 UTOs, sendo 26 do tratamento SEM QUEIMA e 25 do tratamento COM QUEIMA (Tabela 22). A estimativa de riqueza de fungos variou de 64 no manejo COM

QUEIMA, 216 no manejo SEM QUEIMA a 265 espécies de fungos considerando-se as amostras dos dois tratamentos de colheita. Os dois tratamentos também não apresentaram diferenças quanto aos índices de diversidade. A estimativa de cobertura da amostragem foi de 68,3 % no tratamento sob manejo COM QUEIMA e 70,1 % no tratamento sob manejo SEM QUEIMA. Verifica-se que a curva de rarefação não atinge a assíntota, isto é, somente uma porção da riqueza de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar foi amostrada (Figura 29).

As sequências obtidas não se agrupam, com base em suas relações filogenéticas, em função do tratamento (SEM QUEIMA ou COM QUEIMA). Existem apenas 7 UTOs (5,6 % do total de UTOs) em comum entre os tratamentos SEM QUEIMA e COM QUEIMA. As UTOs em comum são as identificadas pelos números 1, 2, 3, 4, 7, 16 e 23 nas Tabelas 18 a 21. Esse número reduzido de UTOs em comum aos dois tratamentos indicaram diferença na comunidade de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar. A análise de Libshuff mostrou que as comunidades de fungos dos dois tratamentos são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 30).

Muitas sequências do gene rRNA 18S amplificadas de raízes de cana-de-açúcar com o uso dos iniciadores desenhados podem representar novas taxa. Um total de 52 (41,6 %) sequências apresentam similaridade menor do que 96 % às sequências disponíveis no banco de dados do NCBI. Essas sequências foram verificadas como não quiméricas e são mais similares a sequências de Ascomycota e Basidiomycota, com base na análise filogenética. Empregando-se os iniciadores aqui desenhados, as seis UTOs mais frequentes representam 56,8 % do total de sequências, enquanto as UTOs contendo uma única sequência (singletons) representam 73,5 % do total de UTOs, mostrando a existência de dominância de algumas espécies fúngicas na comunidade associada às raízes.

As sequências obtidas com os iniciadores grupo-específicos de FMAs, desenhados no presente trabalho, não tem região em comum com as sequências de clones das bibliotecas obtidas utilizando os iniciadores da primeira abordagem (NS7 e F1Ra). No entanto, a região amplificada do gene rRNA 18S obtida com uso dos iniciadores da segunda abordagem (NS31 e AM1) é comum à parte da região amplificada com o uso dos iniciadores grupo-específicos. Pela análise filogenética usando neighbor joining, as sequências da segunda abordagem mostraram-se relacionadas a algumas sequências obtidas com os iniciadores específicos (dados não mostrados). Isso mostra a consistência do método de PCR e sequenciamento para o

levantamento populacional dos fungos associados às raízes de cana-de-açúcar em condições de campo, apesar de o número de UTOs recuperadas ser menor com o uso do iniciador AM1.

Tabela 18 - Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de cana-de-açúcar, COM QUEIMA e SEM QUEIMA prévia à colheita, utilizando o iniciador ACAU220

Manejo	Clone, iniciador	UTO ⁽¹⁾	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade % ⁽²⁾
SEM QUEIMA				
	A01, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	100
	G01, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	96
	F02, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	95
	G02, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU723484.1]	94
	B03, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	93
	C03, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	93
	D03, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU723484.1]	93
	E01, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	93
	D02, ACAU220	UTO 2	<i>Penicillium brevicompactum</i> [EU263608.1]	98
	H01, ACAU220	UTO 2	<i>Penicillium freii</i> [AY640998.1]	98
	A03, ACAU220	UTO 2	<i>Phialocephala fortinii</i> [EU382070.1]	96
	B02, ACAU220	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	93
	C01, ACAU220	UTO 4	<i>Penicillium purpurogenum</i> [DQ365947.1]	96
	C02, ACAU220	UTO 5	<i>Hypocrea koningii</i> [EU722404.1]	92
	D01, ACAU220	UTO 6	<i>Pseudocolus fusiformis</i> [AF026623.1]	98
	E02, ACAU220	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EU710821.1]	98
Com Queima				
	H03, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	96
	H04, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	96
	D05, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	95
	G04, ACAU220	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	93
	B04, ACAU220	UTO 2	<i>Penicillium glabrum</i> [AF548090.1]	93
	A04, ACAU220	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97
	G03, ACAU220	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	97
	E05, ACAU220	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	94
	D04, ACAU220	UTO 3	<i>Didymella exitialis</i> [EU167564.1]	91
	B05, ACAU220	UTO 4	<i>Penicillium purpurogenum</i> [DQ365947.1]	96
	C05, ACAU220	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	93
	F03, ACAU220	UTO 28	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i> [EU295651.1]	91
	F05, ACAU220	UTO 29	<i>Alternaria</i> sp. [EU826479.1]	97
	G05, ACAU220	UTO 30	<i>Lithothelium septemseptatum</i> [AY584662.1]	96

Os E-values de todas as comparações foram iguais a zero.

⁽¹⁾ Identidade das Unidades Taxonômicas Operacionais, determinadas pelo programa DOTUR ao nível de 99 % de similaridade.

⁽²⁾ Similaridade da sequência ambiental com o respectivo acesso do NCBI dada pela análise de BLAST.

Tabela 19 - Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de cana-de-açúcar, COM QUEIMA e SEM QUEIMA prévia à colheita, utilizando o iniciador GIGA202

Manejo	Clone, iniciador	UTO ⁽¹⁾	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade % ⁽²⁾
SEM QUEIMA				
	A06, GIGA202	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	96
	D07, GIGA202	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	95
	H06, GIGA202	UTO 4	<i>Penicillium purpurogenum</i> [AF245257.1]	97
	B08, GIGA202	UTO 4	<i>Penicillium purpurogenum</i> [DQ365947.1]	93
	A08, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	96
	A07, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	95
	F07, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	94
	E06, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	93
	F06, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	93
	C07, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	92
	D06, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	92
	B06, GIGA202	UTO 8	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	90
	C06, GIGA202	UTO 9	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	90
	C08, GIGA202	UTO 10	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	90
	E07, GIGA202	UTO 11	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	91
	G06, GIGA202	UTO 12	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	87
	G07, GIGA202	UTO 13	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	91
COM QUEIMA				
	A09, GIGA202	UTO 1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EU375523.1]	97
	D09, GIGA202	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99
	E10, GIGA202	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99
	F09, GIGA202	UTO 3	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> [EU189213.1]	99
	G09, GIGA202	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99
	B09, GIGA202	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97
	C09, GIGA202	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	96
	H08, GIGA202	UTO 3	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> [EU189213.1]	96
	B10, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	95
	G10, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	94
	F08, GIGA202	UTO 7	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	93
	E09, GIGA202	UTO 30	<i>Paraconiothyrium variabile</i> [EU295653.1]	95
	A10, GIGA202	UTO 31	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	89
	C10, GIGA202	UTO 32	<i>Penicillium purpurogenum</i> [DQ365947.1]	92
	E08, GIGA202	UTO 33	<i>Pyrenochaeta nobilis</i> [DQ898287.1]	98
	F10, GIGA202	UTO 34	<i>Fusarium oxysporum</i> [EF590326.1]	94
	H09, GIGA202	UTO 35	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	95

Os E-values de todas as comparações foram iguais a zero.

⁽¹⁾ Unidades Taxonômicas Operacionais determinadas pelo programa DOTUR ao nível de 99 % de similaridade.

⁽²⁾ Similaridade da sequência ambiental com o respectivo acesso do NCBI dada pela análise de BLAST.

Tabela 20 - Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de cana-de-açúcar, COM QUEIMA e SEM QUEIMA prévia à colheita, utilizando o iniciador GLOMA690

Manejo	Clone, iniciador	UTO ⁽¹⁾	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade % ⁽²⁾	E-value
SEM QUEIMA					
	A11, GLOMA690	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99	0,0
	B11, GLOMA690	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99	8e-167
	B12, GLOMA690	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99	6e-163
	D11, GLOMA690	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	8e-162
	F11, GLOMA690	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	97	5e-159
	A01, GLOMA690	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0
	C01, GLOMA690	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0
	B01, GLOMA690	UTO 14	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	98	0,0
	A12, GLOMA690	UTO 14	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	97	3e-151
	E11, GLOMA690	UTO 14	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	94	2e-142
	C11, GLOMA690	UTO 15	<i>Cryptococcus vishniacii</i> [AB032657.1]	99	1e-164
	H12, GLOMA690	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	1e-159
	G11, GLOMA690	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	97	4e-155
	D12, GLOMA690	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	96	4e-150
	E12, GLOMA690	UTO 17	<i>Cryptococcus aerius</i> [EU847662.1]	96	6e-148
	F12, GLOMA690	UTO 18	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	96	1e-150
	G12, GLOMA690	UTO 19	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	90	4e-120
	H11, GLOMA690	UTO 20	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	8e-162
	D01, GLOMA690	UTO 21	<i>Cryptococcus gastricus</i> [DQ645513.1]	97	0,0
COM QUEIMA					
	C02, GLOMA690	UTO 3	<i>Phoma medicaginis</i> [EU167575.1]	97	0,0
	A03, GLOMA690	UTO 36	<i>Cryptococcus terreus</i> [AB032649.1]	97	0,0
	E02, GLOMA690	UTO 36	<i>Cryptococcus terreus</i> [AB032649.1]	98	0,0
	B03, GLOMA690	UTO 36	<i>Cryptococcus terreus</i> [AB032649.1]	96	0,0
	B02, GLOMA690	UTO 37	<i>Cryptococcus terreus</i> [AB032649.1]	93	0,0
	D03, GLOMA690	UTO 38	<i>Dothidotthia aspera</i> [EU673228.1]	88	1e-139
	E01, GLOMA690	UTO 39	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	93	0,0
	E03, GLOMA690	UTO 40	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	92	0,0
	F01, GLOMA690	UTO 41	<i>Cryptococcus terreus</i> [AB032649.1]	93	0,0
	G02, GLOMA690	UTO 42	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0
	H02, GLOMA690	UTO 43	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0

⁽¹⁾ Unidades Taxonômicas Operacionais determinadas pelo programa DOTUR ao nível de 99 % de similaridade.

⁽²⁾ Similaridade da sequência ambiental com o respectivo acesso do NCBI dada pela análise de BLAST.

Tabela 21 - Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de cana-de-açúcar, COM QUEIMA e SEM QUEIMA prévia à colheita, utilizando o iniciador GLOMB673

Manejo	Clone, iniciador	UTO ⁽¹⁾	Sequência mais similar [Acesso]	Similaridade % ⁽²⁾	e-value
SEM QUEIMA					
	A05, GLOMB673	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99	0,0
	A06, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99	0,0
	D06, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99	0,0
	B05, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	98	0,0
	E04, GLOMB673	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	0,0
	B04, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0
	C06, GLOMB673	UTO 3	<i>Leptosphaeria dolium</i> [U43457.1]	97	0,0
	D05, GLOMB673	UTO 3	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	96	0,0
	D04, GLOMB673	UTO 16	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	98	0,0
	A04, GLOMB673	UTO 22	<i>Phoma medicaginis</i> [EU167575.1]	92	7e-156
	C04, GLOMB673	UTO 23	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	0,0
	F04, GLOMB673	UTO 24	<i>Rhytidhysterium rufulum</i> [AF201452.1]	95	0,0
	F05, GLOMB673	UTO 25	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	94	0,0
	G05, GLOMB673	UTO 26	<i>Pleosporales</i> [FJ176844.1]	99	0,0
	H05, GLOMB673	UTO 27	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	96	0,0
COM QUEIMA					
	G08, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99	0,0
	C08, GLOMB673	UTO 3	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0
	C07, GLOMB673	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	98	0,0
	G07, GLOMB673	UTO 16	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	96	0,0
	A07, GLOMB673	UTO 23	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	99	0,0
	D07, GLOMB673	UTO 23	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	98	0,0
	B07, GLOMB673	UTO 34	<i>Trichocladium asperum</i> [EU263613.1]	94	0,0
	E06, GLOMB673	UTO 34	<i>Trichocladium asperum</i> [EU263613.1]	94	3e-174
	F06, GLOMB673	UTO 35	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99	0,0
	A08, GLOMB673	UTO 39	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	99	0,0
	E07, GLOMB673	UTO 44	<i>Dothidothia aspera</i> [EU673225.1]	90	1e-162
	F07, GLOMB673	UTO 45	<i>Monodictys arctica</i> [EU686519.1]	91	2e-180
	F08, GLOMB673	UTO 46	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	90	8e-170
	G06, GLOMB673	UTO 47	<i>Coniothyrium palmarum</i> [AY642514.1]	95	0,0
	H06, GLOMB673	UTO 48	<i>Pleosporales</i> sp. [FJ176844.1]	92	2e-161
	H08, GLOMB673	UTO 49	<i>Phoma</i> sp. [EU826481.1]	97	0,0

⁽¹⁾ Unidades Taxonômicas Operacionais determinadas pelo programa DOTUR ao nível de 99 % de similaridade.

⁽²⁾ Similaridade da sequência ambiental com o respectivo acesso do NCBI dada pela análise de BLAST.

Figura 25 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar, utilizando o iniciador ACAU220 e sequências de fungos, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a percentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. O comprimento da barra representa duas substituições a cada 100 nucleotídeos. As sequências do tratamento SEM QUEIMA estão grafadas em preto e negrito, e as do tratamento COM QUEIMA estão em vermelho e negrito

Figura 26 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar, utilizando o iniciador GIGA202 e sequências de fungos, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a percentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. O comprimento da barra representa duas substituições a cada 100 nucleotídeos. As sequências do tratamento SEM QUEIMA estão grafadas em preto e negrito, e as do tratamento COM QUEIMA estão em vermelho e negrito

Figura 27 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar, utilizando o iniciador GLOMA690 e sequências de fungos, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a percentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. O comprimento da barra representa duas substituições a cada 100 nucleotídeos. As sequências do tratamento SEM QUEIMA estão grafadas em preto e negrito, e as do tratamento COM QUEIMA estão em vermelho e negrito

Figura 28 – Relações filogenéticas entre as sequências do rDNA 18S obtidas de raízes de cana-de-açúcar, utilizando o iniciador GLOMB673 e sequências de fungos, determinadas usando neighbor joining. Números sobre os ramos indicam a percentagem de 1000 repetições da análise de bootstrap. O comprimento da barra representa duas substituições a cada 100 nucleotídeos. As sequências do tratamento SEM QUEIMA estão grafadas em preto e negrito, e as do tratamento COM QUEIMA estão em vermelho e negrito

Figura 29 – Curvas de rarefação para bibliotecas de clones do gene rRNA 18S obtidas usando os iniciadores FMAs grupo-específicos em amostras DNA de raízes de cana-de-açúcar sob tratamento SEM QUEIMA e COM QUEIMA. A curva de rarefação foi gerada com o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), utilizando o nível de 99 % de similaridade

Tabela 22 - Estimativas de UTOs, índices de diversidade e cobertura de amostragem, calculadas a partir de bibliotecas de rDNA 18S de fungos associados a raízes de cana-de-açúcar com ou SEM QUEIMA prévia à colheita, utilizando os iniciadores ACAU220, GIGA202, GLOMA690 e GLOMB673

Comunidade	NS	NU	Estimativa de riquezas de UTOs		Índices de diversidade		ECA ^c
			ACE-1	Chao1	Shannon ^a	1/D ^{a, b}	
SEM QUEIMA	67	26	177,7 (62,1; 664,5)	216,0 (106,6; 473,8) ^d	2,544 (2,242; 2,845)	6,79 (4,47; 14,12)	0,701
COM QUEIMA	58	28	108,0 (51,1; 305,7)	64,1 (39,1; 145,7)	2,808 (2,520; 3,096)	9,04 (6,31; 19,53)	0,683
Todas as sequências	125	49	213,0 (107,7; 507,2)	265,0 (114,5; 761,6)	3,134 (2,898; 3,370)	10,83 (7,15; 22,32)	0,712

Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança. NS – número de sequências. NU – número de UTOs. ^a Estimador de máxima semelhança; ^b – Recíproco do índice de Simpson; ^c – Estimativa de Cobertura da Amostragem; Distância evolutiva usada para as estimativas foi 0,01.

Figura 30 - Análise de LIBSHUFF de comunidade de fungos associado às raízes de cana-de-açúcar sob dois manejos de colheita, utilizando o conjunto de iniciadores desenhados ACAU220, GIGA202, GLOMA690 e GLOMB673. **A**, manejo SEM QUEIMA (homólogo) x manejo COM QUEIMA; **B**, manejo COM QUEIMA (homólogo) x manejo SEM QUEIMA. As comunidades são diferentes significativamente, com $P < 0,05$. A distribuição de $(C_y - C_{yx})^2$ como uma função de D indica a diferença entre as duas comunidades

Os estudos de comunidades de FMAs são importantes devido aos efeitos das MAs para as plantas e para os ecossistemas terrestres (HEIJDEN et al., 1998). Porém, a principal dificuldade nas investigações do ciclo de vida, da filogenia, organização genética, dinâmica e estrutura das comunidades dos FMAs é o seu biotrofismo obrigatório. As abordagens moleculares, principalmente a caracterização de genes do rRNA, têm contribuído para a elucidação da ecologia dos FMAs. Esses genes são muito utilizados por suas características evolutivas, as quais permitem a investigação em diferentes níveis de resolução filogenética (HILLIS; DIXON, 1991). Além disso, é um gene que ocorre em múltiplas cópias no genoma, sendo a sua detecção mais fácil em relação a outros genes. Segundo Öpik et al. (2006), de 26 trabalhos, 23 investigaram comunidade de FMAs utilizando o gene rRNA 18S, 7 investigaram regiões ITS e 4 avaliaram o gene rRNA 28S, sendo que alguns dos trabalhos utilizaram mais de um locus gênico.

O desenho de novos iniciadores para a amplificação de DNA dos organismos pertencentes ao filo Glomeromycota é importante para evitar o viés causado pelo uso do tradicional iniciador AM1 (HELGASON, 1998). Esse iniciador tem sido usado em inúmeros estudos de comunidades de FMAs em campo (ÖPIK et al., 2006), no entanto, ele não amplifica o DNA dos grupos basais de Glomeromycota, como Archaeosporales (REDECKER, 2000; SANTOS; FINLAY; TEHLER, 2006; SANTOS-GONZÁLEZ et al., 2007). Além disso, o iniciador AM1 pode amplificar sequências de fungos não-micorrízicos arbusculares (DOUHAN et al., 2005). Já o emprego de iniciadores específicos para fungos em geral pode não cobrir toda a comunidade fúngica e, dessa forma, não refletir a comunidade de FMAs da amostra ou não identificar sequer uma sequência de fungo do filo Glomeromycota (Tabela 14 e Figura 21). Por essa razão, o desenho de iniciadores específicos para os principais grupos de Glomeromycota é de suma importância.

Mesmo com a colonização micorrízica variando de 30 % a 52 %, não foi possível a detecção de FMAs nas raízes utilizando-se as três abordagens: (1) aplicação do iniciador AM1, (2) iniciador F1Ra específico para fungos em geral e (3) uso dos iniciadores aqui desenhados. A ausência de sequências clonadas que fossem mais similares às sequências de Glomeromycota, mesmo utilizando iniciadores específicos e funcionais em amostras de casa-de-vegetação e em amostras de campo (raízes da pradaria Konza), pode indicar um ambiente com uma comunidade fúngica diversa e complexa nas raízes de cana-de-açúcar do campo. Com os iniciadores desenhados neste estudo, houve um maior número de UTOs detectadas em relação aos iniciadores AM1 ou F1Ra. O número de 49 UTOs sequenciadas e 265 UTOs estimadas somente

nas raízes da cana-de-açúcar (Tabela 22) indicam alta diversidade fúngica em relação à outros ambientes. Waldrop et al. (2006), avaliaram a diversidade de fungos do solo, empregando-se o par de iniciadores ITS1F e ITS4 e o sequenciamento dos clones provenientes de amostras de áreas com diferentes números de espécies vegetais no estado de Minnesota, EUA. Esses autores obtiveram um total de 149 UTOs de fungos do solo em 7 diferentes tratamentos, com um número máximo de 40 UTOs quando se sequenciaram 72 clones de um tratamento. Mas esses resultados foram obtidos de amostras de DNA extraído do solo, o qual geralmente apresenta maior diversidade fúngica do que aquela associada às raízes. Neubert et al. (2006) avaliaram a estrutura da comunidade de fungos nos diferentes órgãos de caníço e verificaram que as raízes são os órgãos com maior diversidade. A alta diversidade poderia ser a causa do viés na amplificação nos experimentos deste trabalho, no entanto, Vandenkoornhuyse et al. (2002) estudaram a diversidade de fungos em raízes da Poaceae *Arrhenatherum elatius* com o uso de iniciadores específicos para fungos em geral e encontraram 49 filotipos, sendo 3 relacionados à Glomeromycota. Husband et al. (2002) amplificaram o DNA de FMAs de raízes de floresta tropical do Panamá, empregando os iniciadores NS31 e AM1, e mostram que a “hiperdiversidade” pode não ser a explicação para o problema.

Por outro lado, considerando que quanto maior a diversidade vegetal, maior o número de nichos e, portanto, maior a diversidade de fungos (LODGE, 1997), a diversidade em raízes de uma lavoura de cana-de-açúcar não seria alta ao ponto de mascarar a presença de FMAs. Em áreas de monocultura, como as de cana-de-açúcar, haveria uma dominância de um pequeno grupo de fungos, resultando em amostras de DNA com prevalência desses organismos, os quais se sobrepujariam em relação aos FMAs nas amostras de DNA total. Como foi mostrado pelo sequenciamento de clones do gene rRNA 18S e análise pelo DOTUR, aproximadamente 60 % das sequências pertencem a apenas seis UTOs, de um total de 49 UTOs. Desse modo, pode haver uma razão DNA alvo : DNA não-alvo desfavorável à amplificação específica.

Considerando que os iniciadores desenhados obtiveram resultados positivos nos testes *in silico* e em amostras controle de casa-de-vegetação, é possível que o problema resida nas condições subótimas de PCR. Assim, parâmetros como temperatura de pareamento dos iniciadores, concentrações de cloreto de magnésio e diluição da primeira PCR podem estar em níveis não ideais. Os testes para esses e outros parâmetros, tais como presença ou ausência de BSA ou DMSO (Dimetil Sulfóxido), foram feitos nas amostras controle providas de casa-de-

vegetação e não nas raízes de cana-de-açúcar do campo. É possível que as amplificações inespecíficas com o emprego dos iniciadores desenhados usando DNA de raízes de cana-de-açúcar poderiam ser evitadas com a otimização das condições de PCR. O BSA é um adjuvante que pode aumentar a eficiência da amplificação. O DMSO é um agente desnaturante que inibe formação de estruturas secundárias e é utilizado para melhorar a eficiência e a especificidade de amplificação (KITADE et al., 2003). Entretanto, o problema pode ter mais de uma origem, em razão de o emprego dos iniciadores *Glomus* grupo A (GLOMA189 e GLOMA690) em raízes da pradaria Konza resultar em amplicons específicos e em ausência de sequências não-alvo (Figuras 14 e 15). Esses resultados nos mostra que há um problema específico com as amostras de raízes de cana-de-açúcar, onde pode haver um inibidor não universal, uma vez que a síntese de amplicons, apesar de serem inespecíficos, ocorre. Um possível fator para a não detecção de FMAs nas raízes é a incapacidade do método de extração de homogeneizar completamente o tecido vegetal, o que deixaria as hifas dos FMAs protegidas ou ligadas aos tecidos da cana-de-açúcar. Essa proteção diminuiria a eficiência da extração do DNA de FMAs nas amostras de raízes de cana-de-açúcar.

Esses problemas podem contribuir para a amplificação do DNA de determinados fungos em função do ambiente. Esse viés já foi constatado em outros trabalhos (ANDERSON et al., 2003; JUMPPONEN, 2007) e pode ser decorrência do fato de os iniciadores terem sido desenhados com base em sequências de espécimes mantidas em coleções de culturas e em laboratórios e não em sequências de organismos que ocorrem naturalmente no campo. Uma vez que os FMAs são simbiotróficos obrigatórios, a obtenção desse tipo de sequência é dificultada.

Assim, a inespecificidade dos iniciadores pode ter origem na baixa relação DNA alvo : DNA não-alvo, nas condições subótimas de PCR ou em problemas inerentes às amostras ou ao método de extração de DNA de raízes de cana-de-açúcar. A solução para a validação dos iniciadores específicos e para o acesso à comunidade de Glomeromycota nas raízes de cana-de-açúcar pode ser alcançada por meio de experimentos para se testar esses parâmetros. Outro ponto a ser observado é que é preciso ser cauteloso para conclusões tiradas sobre comunidades de FMAs quando se emprega o par de iniciadores NS31 e AM1 sem o uso do sequenciamento, como nas análises de T-RFLP e DGGE. Os resultados podem não refletir a real da comunidade de FMAs nas amostras.

Apesar de a detecção de FMAs não ser possível, as sequências obtidas são informativas quanto ao que ocorre com a estrutura da comunidade fúngica nas raízes. A alta frequência de sequências de Ascomycota nas bibliotecas obtidas com os iniciadores F1Ra (específico para fungos), AM1 (específico para FMAs), e os específicos para grupos de FMAs ACAU220, GIGA202, GLOMA690 e GLOMB673 indicam uma dominância de fungos desse filo nas raízes de cana-de-açúcar.

Com o emprego do iniciador F1Ra foi estimada uma riqueza de até 51 UTOs (Tabela 15) e do AM1 uma riqueza de até 6,5 UTOs (Tabela 17) em duas amostras de cana-de-açúcar, sob manejo SEM QUEIMA e COM QUEIMA. A razão para a diferença é que o iniciador F1Ra é universal para Fungi, enquanto o segundo é específico para um grupo de fungos. No entanto, com o uso dos iniciadores grupo-específicos aqui desenhados foi estimada uma riqueza de até 265 UTOs nas 36 amostras de raízes de cana-de-açúcar. Com relação à estrutura da comunidade fúngica, o uso dos iniciadores F1Ra ou AM1 e dos iniciadores específicos aqui desenhados indicam diferenças entre as comunidades fúngicas nos tratamentos SEM QUEIMA e COM QUEIMA pela análise de Libshuff. Esses resultados podem indicar que o uso de apenas um par de iniciadores, mesmo universal para fungos, e poucas repetições de amostras, pode resultar em baixa cobertura de amostragem da comunidade fúngica.

Os índices estimados de riqueza e de diversidade de UTOs com o uso dos iniciadores específicos para fungos, FMAs e FMAs grupo-específico não foram diferentes entre os dois manejos de colheita, sugerindo que a comunidade fúngica não é afetada em número e diversidade de organismos pelo sistema de colheita adotado, pelo menos na época avaliada. Isso pode ser explicado pelo pouco tempo de manejo SEM QUEIMA, em que o teor de C no solo ainda não foi alterado (Tabela 7), indicando que a deposição de palha sobre o solo ainda não afeta significativamente as propriedades químicas e biológicas do solo.

3 CONCLUSÕES

A abundância, riqueza e diversidade de FMAs determinadas com base na presença de esporos assexuais no solo não diferiu entre os tratamentos SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia à colheita, nem entre as variedades de cana-de-açúcar e na interação dos fatores Manejo de Colheita e Variedades de cana-de-açúcar.

O manejo de colheita SEM QUEIMA prévia estimulou a colonização micorrízica arbuscular em cana-de-açúcar em relação ao manejo com colheita COM QUEIMA prévia, logo após a primeira colheita.

O uso de iniciadores específicos para fungos em geral (Reino Fungi), do iniciador AM1 e dos iniciadores específicos para grupos de FMAs não permitiu a detecção de FMAs nas raízes de cana-de-açúcar.

Os índices de riqueza e diversidade, e a estrutura da comunidade fúngica associados às raízes de cana-de-açúcar, determinados por meio dos dados de sequenciamento do gene rRNA 18S, não diferiram entre os manejos de colheita SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia.

O manejo da cana-de-açúcar e colheita COM QUEIMA prévia à colheita alterou a estrutura da comunidade fúngica associada às raízes, logo após a primeira colheita.

REFERÊNCIAS

AL-KARAKI, G.; McMICHAEL, B.; ZAK, J. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2004.

ALMEIDA, R.T. Estudo sobre micorrizas vesículo-arbusculares no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 2, p. 210-212, 1985.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. A basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 36-47, 2003.

ANDREOLA, F. **Micorrizas vesículo-arbusculares em cana-de-açúcar**. 1982. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

ANSON, E.L.; MYERS, E.W. ReAligner: a program for refining DNA sequence multi-alignments. In: ANNUAL CONFERENCE ON RESEARCH IN COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, 1., 1993, Santa Fe. **Proceedings ...** Santa Fe: ACM, 1997. p. 9-16.

AUGÉ, R.M.; SYLVIA, D.M.; PARK, S.; BUTTERY, B.R.; SAXTON, A.M.; MOORE, J.L.; CHO, K. Partitioning mycorrhizal influence on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, n. 4, p. 503-514, 2004.

BLASZKOWSKI, J. Arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) of the Hel Peninsula, Poland. **Mycorrhiza**, New York, v. 5, n. 1, p. 71-88, 1994.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.). **VA mycorrhiza**, Boca Raton: CRC Press, 1984. chap. 2, p. 5-33.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R.J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4356-4360, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 22 abr. 2007.

BUNEMANN, E.K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 44, p. 379-406, 2006.

BURROWS, R.L.; PFLEGER, F.L. Host responses to AMF from plots differing in plant diversity. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 240, n. 1, p. 169-179, 2002.

CAMPOS, D.C. de. **Potencialidade do sistema de colheita Sem Queima da cana-de-açúcar para o seqüestro de carbono**. 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agrossystem. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 93-101, 2002.

CARRENHO, R.; SILVA, E.S.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 262-270, 2001.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oslo, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; SHEN, T.J. **Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation)** - program and user's guide. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. 2003-2008. Acesso em: 08 dez. 2008.

CLAPP, J.P.; YOUNG, J.P.W.; MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist**, Lancaster, v. 130, p. 259-265, 1995.

COLLA, G.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; TULLIO, M.; RIVERA, C.M.; REA, E. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 501-509, 2008.

COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, SPI, 1994. p. 383-418.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CROLL, D.; WILLE, L.; GAMPER, H.A.; MATHIMARAN, N.; LAMMERS, P.J.; CORRADI, N.; SANDERS, I.R. Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 178, n. 3, p. 672-687, 2008.

CUENCA, G.; MENESES, E. Diversity patterns of arbuscular mycorrhiza fungi associated with cacao in Venezuela. **Plant and Soil**, The Hague, v. 183, p. 315-322, 1996.

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

DOUDS JUNIOR, D.D.; JANKE, R.R.; PETERS, S.E. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 43, p. 325-335, 1993.

DOUHAN, G.W.; PETERSEN, C.; BLEDSOE, C.S.; RIZZO, D.M. Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification. **Mycorrhiza**, New York, v. 15, p. 365-372, 2005.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Arlington, v. 12, p. 13-15, 1990.

EDWARDS, S.G.; FITTER, A.H.; YOUNG, P.W. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 101, n. 12, p. 1440-1444, 1997.

EOM, A.-H.; HARTNETT, C.; WILSON, G.W.T.; FIGGE, D.A.H. The effect of fire, mowing, fertilizer amendment on arbuscular mycorrhizas in Tallgrass prairie. **The American Midland Naturalist**, Notre Dame, v. 142, p. 55-70, 1999.

FLIEßBACH, A.; OBERHOLZER, H.R.; GUNST, L.; MÄDER, P. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 118, p. 273-284, 2007.

FOCCHI, S.S.; SOGLIO, F.K.D.; CARRENHO, R.; SOUZA, P.V.D.; LOVATO, P.E. Fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de citros sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 469-476, 2004.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 92, p. 18-29, 2007.

GEMMA, J.N.; KOSKE, R.E. Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potential of a dune soil. **Mycologia**, New York, v. 80, n. 2, p. 211-216, 1988.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, p. 489-500, 1980.

GOSAL, S.K.; GUPTA, R.P.; GOSAL, S.S. In vitro establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in roots of micropropagated sugarcane. **Annals of Agri Bio Research**, Hisar, v. 6, n. 1, p. 19-22, 2001.

HE, X.; MOURATOV, S.; STEINBERG, Y. Temporal and spatial dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under the canopy of *Zygophyllum dumosum* Boiss in the Negev Desert. **Journal of Arid Environments**, Cambridge, v. 52, p. 379-387, 2002.

HEIJDEN, M.G.A. van der; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

HELGASON, T; DANIELL, T.J.; HUSBAND R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 394, n. 431, p. 431, 1998.

HEMPEL, S.; RENKER, C.; BUSCOT, F. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1930-1938, 2007.

HIJRI, I.; SÝKOROVÁ, Z.; OEHL, F.; INEICHEN, K.; MADER, P.; WIEMKEN; REDECKER, D. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 15, p. 2277-2289, 2006.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 66, p. 411-453, 1991.

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; TURNER, S.L.; GALLERY, R.; YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 11, p. 2669-2678, 2002.

INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF (VESICULAR) ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. Disponível em: <invam.caf.wvu.edu>. Acesso em: 18 nov. 2008.

JOHNSON, D.; VANDENKOORNHUYSE, P.J.; LEAKE, J.R.; GILBERT, L.; BOOTH, R.E.; GRIME, J.P.; YOUNG, J.P.W.; READ, D.J. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, p. 503-515, 2003.

JUMPPONEN, A. Soil fungal communities underneath willow canopies on a primary successional glacier forefront: rDNA sequence results can be affected by primer selection and chimeric data. **Microbiology Ecology**, Vancouver, v. 53, p. 233-246, 2007.

JUMPPONEN, A.; JOHNSON, L.C. Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations - a case study from tallgrass prairie. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 6, p. 1177-1194, 2005.

JUMPPONEN, A.; TROWBRIDGE, J.; MANDYAM, K.; JOHNSON, L. Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition—evidence from rDNA data. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v. 41, p. 217-224, 2005.

KELLY, R.M.; EDWARDS, D.G.; THOMPSON, J.G.; MAGAREY, R.C. Responses of sugarcane, mayze, and soybean to phosphorus and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 52, p. 731-743, 2001.

_____. Growth responses of sugarcane to mycorrhizal spore density and phosphorus rate. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 56, p. 1405-1413, 2005.

KITADE, Y.; OOTSUKA, S.; IITSUKA, O.; SAGA, N. Effect of DMSO on PCR of *Porohydra yezoensis* (Rhodophyta) gene. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 555-557, 2003.

KOIDE, R.T.; MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, p. 145-163, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Org.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LEE, J.; LEE, S.; YOUNG, J.P.W. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 339-349, 2008.

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

LLOYD-MACGILP, S.A.; CHAMBERS, S.M.; DODD, J.C.; FITTER, A.H.; WALKER, C.; YOUNG, J.P.W. Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Lancaster, v. 133, p. 103-111, 1996.

LODGE, D.J. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 6, p. 681-688, 1997.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; PARKER JÚNIOR, C.T.; GARRITY, G.M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T.G.; MCCAUGHEY, M.J.; OLSEN, G.J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M.; WOESE, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 171-173, 1999.

MATHIMARAN, N.; RUH, R.; JAMA, B.; VERCHOT, L.; FROSSARD, E.; JANSÁ, J. Impact of agricultura management on arbuscular mycorrhizal fungal communities in Kenyan Ferralsol. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 119, p. 22-32, 2007.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 393-399, 2007.

MORTON, J.B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycorrhiza**, New York, v. 93, p. 181-195, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 21 abr. 2007.

NEUBERT, K.; MENDGEN, K.; BRINKMANN, H.; WIRSEL, S.G.R. Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. **Applide and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1118-1128, 2006.

NIELSEN, M.N.; WINDING, A. **Microorganisms as indicators of soil health**. Denmark: National Environmental Research Institute, 2002. 82 p. (Technical Report, 388).

NÓBREGA, J.C.A.; LIMA, J.M.; CURI, N.; SIQUEIA, J.O.; MOTTA, P.E.F. Fosfato e micorriza na estabilidade de agregados em amostras de latossolos cultivados e não cultivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1425-1435, 2001.

O'CONNOR, P.J.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in a semiarid herbland. **New Phytologist**, Lancaster, v. 154, n. 1, p. 209-218, 2002.

ÖPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; ZOBEL, M. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. **Journal of Ecology**, London, v. 94, p. 778-790, 2006.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interaciotns of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection os sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 11, p. 111-115, 1991.

PEER, Y. van de; WACHTER, R. de. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 10, n. 5, p.569-570, 1994.

QUILAMBO, O.A.; WEISSENHORN, I.; DODDEMA, H.; KUIPER, P.C.J.; STULEN, I. Arbuscular mycorrhizal inoculation of peanut in low-fertile tropical soil. II. Alleviation of drought stress. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 1645-1662, 2005.

QUILLOY, O.T.; LANSANG, P.F. Effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in promoting growth and yields of sugarcane. **Philippine Sugar Quarterly**, Quezon, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1992.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 284 p.

REDDY, C.N.; BHARATI, B.K.; TAJKUMAR, H.G.; SUNANDA, D.N. Infectivity and efficacy of four native vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi on sugar cane. **Mycorrhiza News**, New Delhi, v. 16, n. 2, p. 9-12, 2004.

REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, p. 73-80, 2000.

REDECKER, D.; HIJRI, I.; WIEMKEN, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. **Folia Geobotanica**, Praha, v. 38, n. 2, p. 113-124, 2003.

REDECKER, D.; MORTON, J.; BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 14, n. 2, p. 276-284, Feb., 2000.

REIS, V.M.; PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1933-1941, 1999.

RENKER, C.; HEINRICHS, J.; KALDORF, M.; BUSCOT, F. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi in roots from the field. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, n. 4, p. 191-198, 2003.

RESENDE, A.S.; XAVIER, R.P.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 281, p. 339-351, 2006.

ROSALES, A.M.; VALDÉZ, M. Arbuscular mycorrhizal colonization of lime in different agroecosystems on the dry tropics. **Mycorrhiza**, New York, v. 6, p. 105-109, 1996.

ROSENDAHL, S.; STUKENBROCK, E. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 3179-3186, 2004.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the for general users and for biologists Programmers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 653 p.

SANDERS, I.R.; ALT, M.; GROPE, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**, Lancaster, v. 130, p. 419-427, 1995.

SANTOS, J.C.; FINLAY, R.D.; TEHLER, A. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. **New Phytologist**, Lancaster, v. 172, p. 159-168, 2006.

SANTOS-GONZÁLEZ, J.C.; FINLAY, R.D.; TEHLER, A. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 17, p. 5613-5623, 2007.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHÜSSLER, A. **Glomeromycota phylogeny**. Disponível em: <<http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo>>. Acesso em: 08 dez. 2008.

SCHÜSSLER, A.; GEHRIG, H.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequence: implications for primer design and phylogeny. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 105, p. 5-15, 2001.

SCHWARZOTT, D.; WALKER, C.; SCHÜSSLER, A. Glomus the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 21, p. 190-197, 2001.

SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, p. 287-296, 2008.

SHEPHERD, M.; NGUYEN, L.; JONES, M.E.; NICHOLS, J.D.; CARPENTER, F.L. A method for assessing arbuscular mycorrhizal fungi group distribution in tree roots by intergenic transcribed sequence variation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 290, p. 259-268, 2007.

SILVA, F.C. da (Coord.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 370 p.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 291-295, 1992.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

SIQUEIRA, J.O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. 290 p.

SMITH, S.E.; BARKER, S.J. Plant phosphate transporter genes help harness the nutritional benefits of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, p. 189-190, 2002.

SMITH, S.E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997. 605 p.

SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; VEEN, J.A.V.; SMIT, E. PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1413-1424, 2004.

SOUZA, S.L. **Análises do proteome de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**. 2006. 100p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STUKENBROCK, E.H.; ROSENDAHL, S. Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 42, n. 1, p. 73-80, 2005.

TAKAHASHI, D. **Análise de seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. 2005. 117 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TOMMERUP, I.C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 81, n. 1, p. 37-45, 1983.

VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAULF, S.L.; LEYVAL, C.; STRACZEK, J.; YOUNG, J.P.W. Extensive fungal diversity in plant roots. **Science**, Washington, v. 295, p. 2051, 2002.

WALDROP, M.P.; ZAK, D.R.; BLACKWOOD, C.B.; CURTIS, C.D.; TILMAN, D. Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, p. 1127-1135, 2006.

WALKER, C.; BLASZKOWSKI, J.; SCHWARZOTT, D.; SCHÜSSLER, A. *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and *Gerdemanniaceae* fam. nov., a new family in the Glomeromycota. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 108, p. 707–718, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.