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

**Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com
cana-de-açúcar**

Thiago Gumiere

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2012**

Thiago Gumiere
Engenheiro Agrônomo

Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2012**

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

Gumiere, Thiago

Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar /
Thiago Gumiere.- - Piracicaba, 2012.
75 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Biogeografia 2. Cana-de-açúcar 3. Fungos 4. Interação planta-microrganismo
5. Microbiologia do solo 6. Polimorfismo 7. Reação em Cadeia por Polimerase I. Título

CDD 633.61
G974b

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

*Dedico este trabalho
aos meus pais Edimilson e Eva,
aos meus irmãos Silvio e Marina,
a minha querida Anne e meu afilhado Henrique,*

*Vocês foram luzes da virtude que guiaram meus
passos,
e ainda iluminam meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, o Grande Arquiteto no Universo;

Aos meus pais Edimilson e Eva, pela educação e valores que me permitiram alcançar meus objetivos;

À minha irmã Marina e meu irmão Silvio pelo apoio e exemplo de luta, que me ensinaram a imensa virtude da humildade e da perseverança;

À Anne, minha querida e amada, por sempre estar ao meu lado e possibilitar os momentos mais felizes, e ter paciência nos mais difíceis;

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pelo apoio incomparável, amizade, e grandiosa orientação, e paciência, que permitiram a finalização deste trabalho;

Ao amigo Ademir, pela ajuda indispensável nas exaustivas coletas, auxílio nas técnicas e estatísticas, e amizade que ajudaram no contínuo processo deste projeto;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Daniel, Cristiane, Marina, Paulo, Joice, Danielle, Mylenne, Cris (Kit), Juliana, Dorotéia, Luana, Julia, Emiliana, Danice, Joelma, Armando, Polé e em especial Fabio (Dig) e Pedro, pelas boas risadas, e por saber que sempre posso contar com todos;

Aos amigos técnicos Denise e Fernando pela dedicação, auxílio e amizade, que foram indispensáveis no decorrer deste projeto;

A coordenação do PPG- Solos e Nutrição de plantas e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste trabalho;

A FAPESP pela bolsa concedida;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

OBRIGADO A TODOS!

“ Se as ferramentas forem ruins, a voz da natureza será abafada. Se as ferramentas forem boas, a natureza dará uma resposta clara para uma pergunta clara” **Freeman**

Dyson

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	17
2.1.2 Interação da cana-de-açúcar com microrganismos	20
2.1.3 Fungos em cana-de-açúcar	23
2.1.4 Biogeografia microbiana	25
2.1.5 Métodos independentes de cultivo	27
2.2 Objetivos e Hipóteses	29
2.2.1 Objetivos.....	29
2.2.2 Objetivos específicos.....	29
2.2.3 Hipóteses.....	29
2.3 Material e Métodos	29
2.3.1 Coleta de amostras de solo	29
2.3.2 Análises físico-químicas dos solos coletados	31
2.3.3 Extração de DNA total do solo.....	31
2.3.4 Determinação de estrutura de comunidade de fungos por T-RFLP.....	31
2.3.5 Análise dos dados de T-RFLP	33
2.3.6 Quantificação dos fungos por PCR em tempo real	33
2.3.7 Mapeamento de comunidades fúngicas	34
2.4 Resultado e Discussão	35
2.4.1 Atributos de manejo	35
2.4.2 Atributos químicos e físicos das amostras coletadas	36
2.4.3 Perfis da comunidade de fungos no solo	38
2.4.4 Correlações dos dados ambientais com os perfis de fungos nos solos. 43	
2.4.5 Correlação da similaridade dos perfis de fungos com a distância entre os pontos amostrados.....	47
2.4.6 Correlação dados ambientais e de manejo com a abundância de fungos no solo de cana	48

2.4.7 Mapeamento da diversidade e abundância de fungos nos solos cultivados com cana-de-açúcar do estado de São Paulo	54
2.4.8 Correlação da diversidade e abundância dos fungos do solos de cana-de-açúcar com a produtividade da cana do estado de São Paulo	59
3 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é atualmente a cultura de maior importância agrícola do Estado de São Paulo, a partir da qual são gerados açúcar e etanol, além de vários outros subprodutos. No entanto, com a expansão das fronteiras agrícolas e alterações nas práticas de manejo, ocorre atualmente um momento de adequação de tal cultivo, que visa uma maior produtividade e sustentabilidade de produção. Para isto, dentre outros fatores, o papel da comunidade microbiana presente nos solos pode ter fundamental importância, auxiliando no melhor desenvolvimento da planta. No entanto, pouco se sabe sobre a comunidade microbiana existente nos solos cultivados com cana-de-açúcar. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade e a abundância de fungos em solos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, em áreas sob diferentes atributos químicos, físicos e de manejo. Objetivou-se também, verificar a ocorrência de padrões biogeográficos na estruturação de tais comunidades. Para isso, foi realizada a análise da estrutura das comunidades fúngicas por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP), juntamente com a quantificação destas comunidades por meio da PCR em tempo real (*qPCR*) em 476 amostras de solo, obtidas de 11 áreas de cultivo (usinas). Dentro deste conjunto de dados, temos que os atributos químicos, físicos e manejo explicam maiores valores de variância dentro de cada área amostra, mas pouco explicam a variância geral dos dados, sugerindo a ocorrência de padrões biogeográficos das comunidades de fungos neste ambiente. Tal ocorrência foi confirmada pela significância estatística da correlação entre distância e dissimilaridade das comunidades de fungos, dando suporte a geração dos primeiros mapas biogeográficos de fungos em tais solos. Adicionalmente, a abundância de fungos mostrou-se relacionada com a produtividade da cultura, indicando este ser um dos fatores que modulam a produtividade de cana-de-açúcar nas áreas avaliadas.

Palavras-chave: Microbiologia do solo; Biogeografia de fungos; *T-RFLP*, *qPCR*

ABSTRACT

Biogeography of fungal communities in sugarcane fields

The sugarcane is nowadays, the most important crop in the State of São Paulo, serving as the raw material for the production of sugar and ethanol, besides many others by-products. Considering the expansion of agricultural barriers, and shifts in fields management, such cultivation is under a re-arrangement process, aiming to a higher productivity and sustainability. In order to achieve that, among other factors, the role of microbial communities present in soils can be essential to support plant development. However, a few is known about the microbial community under sugarcane crop production soils. Hence, this work intended to evaluate the fungi diversity and abundance in soils cultivated with sugarcane in the State of São Paulo, exploring areas under distinct chemical and physical attributes and also distinct management practices. It was also aimed to determine the occurrence of biogeographically patterns in the structure of such communities. Indeed, it was made the analysis of the fungal community structure by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), together with the quantification of these communities by real time PCR (qPCR) in 476 soils samples, collected in 11 areas cultivated with sugarcane (mills). Within this dataset, it was found that chemical, physical and management attributes explain higher values of variance within each sampled area, but explain little about the total variance of data, suggesting the occurrence of biogeographically patterns in fungal communities in this environment. It was confirmed by the statistical significance of the correlation between distance and dissimilarity of fungal communities, supporting the generation of very first biogeographically maps in such soils. Additionally, the abundance of fungi revealed to be related with sugarcane productivity, indicating this issue as one of the factors modulating the sugarcane productivity in the evaluated areas.

Keywords: Soil microbiology; Fungal biogeography; T-RFLP, qPCR

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de incontestável importância para o mundo, com destaque para o Brasil, onde ocupa o 2º lugar entre as culturas de cultivo intenso, tendo o estado de São Paulo como maior produtor. Além de apresentar boa rentabilidade e ter o uso completo da planta, a cana-de-açúcar torna-se foco em discussões ambientais de sustentabilidade, acarretando novos e contínuos desafios na busca de uma maior produtividade, sem extrapolar a expansão para novas áreas. No entanto, são diversos os tipos de solos encontrados no estado de São Paulo (de muito arenosos a muito argilosos), diversas são também as formas de manejo adotadas em cada área de produção (aplicações de vinhaça e/ou torta de filtro, queima ou corte manual), e não obstante temos diferentes históricos das áreas plantadas (áreas novas até áreas que apresentam mais de 50 anos com plantio de cana-de-açúcar).

Dentro desta gama de condições temos a imensa fonte de biodiversidade do planeta que são os microrganismos, atuando no solo em ciclos de decomposição, mineralização/imobilização de nutrientes, ciclos biogeoquímicos. Em relações com as plantas, tais organismos podem ser promotores de crescimento, supressores de doenças, dentre outras características. Para a cultura da cana-de-açúcar são conhecidos isolados bacterianos que produzem promotores de crescimento, ou atuam na fixação de nitrogênio, e fungos que apresentam relações micorrízicas com as plantas, expandindo seu sistema radicular. Porém, de modo geral, temos que a grande comunidade de fungos no solo de cana-de-açúcar é pouco conhecida. Com isso, estudos amplos de diversidade de microrganismos no solo passaram a ser de grande importância, principalmente com o advento de técnicas independentes de cultivo, que permitem o desenvolvimento de estudos de distribuição espacial e temporal da biodiversidade microbiana.

Nesta linha, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade e a abundância de fungos em solos de cultivo de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, e inferir sobre as principais variáveis responsáveis pela estruturação de tais comunidades. Os dados gerados deram suporte à geração de mapas biológicos de tais áreas, e indicam estas comunidades como importantes componentes do sistema de produção desta cultura.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da cana-de-açúcar

2.1.1.1 Importância econômica

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo os seus principais derivados o i) etanol - devido a sua capacidade de substituir combustíveis fósseis e diminuir a emissão de gases responsáveis pelo aquecimento global; ii) açúcar - devido ao aumento do poder aquisitivo da população brasileira elevando o consumo de produtos industrializados e doces; iii) a co-geração de energia elétrica a partir do bagaço; iv) a utilização dos seus resíduos para produção de outros derivados como plástico, papel e na própria fertilização do solo e; v) a possível criação do etanol de segunda geração.

Entre as culturas de cultivo intenso no Brasil, a cana-de-açúcar ocupava o 2º lugar em consumo de fertilizantes, o que representava 15% da comercialização total dos fertilizantes no Brasil (ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA, 2005), porém com atuais melhoras nas práticas agrícolas e ambientais, a utilização de fertilizantes na cultura da cana-de-açúcar foi reduzida para 0,425 toneladas por hectare (UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2011), o que se deve principalmente ao uso de resíduos industriais, como vinhaça e torta de filtro, e principalmente o uso da palha deixada sobre o solo após a colheita. O gasto com fertilizantes somado aos gastos de compra e aplicação de herbicidas inseticidas e fungicidas ainda representa entorno de 40% do custo total necessário para implantação de um ha de cana-de-açúcar (KANEKO et al., 2009), sendo esta uma área ainda apta a melhorias do setor de produção.

Hoje são crescentes os valores da produção desta cultura, indo de 325 mil toneladas na safra de 2003, para 569 mil toneladas em 2008; 625 mil toneladas em 2010 e, com uma estimativa, de 728 mil de toneladas para 2012 (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008; UNICA, 2011). A área de plantio no Brasil foi 7.409 mil ha na safra de 2009/10 e 8.033 mil ha na safra atual, sendo este aumento crescente em todo o território, com ênfase nas regiões apresentadas na figura 1 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011). O Estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, apresentando aproximadamente 4.357 mil ha plantados, o que corresponde a 54,24% de toda área cultivada do país. Comparando as safras de 2009/10 com a de 2010/11 no Estado de São Paulo,

houve um crescimento de 5,5% na área plantada; produzindo-se 359.235 mil toneladas na safra atual (CONAB, 2011). Portanto, a importância econômica e social da cultura da cana-de-açúcar é elevada, sendo responsável em 2001, por 610 mil empregos de forma direta e 930 mil de forma indireta, desde sua cadeia produtiva até seu processamento (ROSSETTO, 2008). Dessa forma, esta cultura apresenta-se como uma das mais rentáveis para o agronegócio, sendo a planta aproveitada por completo, tornando-a importante na discussão de questões ambientais e de sustentabilidade. Isto eleva os desafios na busca de uma maior produção com uma menor expansão da área de cultivo, não comprometendo a rentabilidade da cultura e ao mesmo tempo não ocasionando novos desmatamentos nas áreas naturais devido à expansão da cultura.

Figura 1 – Mapa Sucrenergético do Brasil indicando as usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade (UNICA, 2011)

2.1.1.2 Plantio da cana-de-açúcar

Devido à cana de açúcar ser uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, ela apresenta como principal característica o rápido crescimento devido ao ciclo fotossintético do tipo C4, e como resultado elevada produção de carboidratos (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). Para a implantação de um canavial, o

primeiro passo realizado é o planejamento da área, feito com base nas informações obtidas pelo levantamento topográfico. Com isso são definidos os locais de plantio em áreas subdivididas, conhecidas por talhões, e alocam-se os carregadores principais e secundários pelos quais os equipamentos utilizados no plantio e colheita irão circular, resultando em terrenos sistematizados. A formação dos talhões visa manter as linhas de cana com maior comprimento possível a fim de reduzir manobras de máquinas e otimizar as operações. Em geral os talhões são subdivididos quanto às características topográficas e tipos de solo, e apresentam em média 10 a 20 hectares (EMBRAPA, 2007).

Os princípios de conservação do solo e a criação de terraços, que objetivam reduzir erosões, são os fundamentos para o planejamento e sistematização do terreno a ser plantado. A formação dos sulcos apresenta um espaçamento adequado que possibilita um melhor rendimento nas atividades de aplicação de defensivos e de colheita. O espaçamento interfere diretamente na produtividade, pois afeta a disponibilização de recursos como luz, água, temperatura e nutrientes. Os valores utilizados de espaçamento no estado de São Paulo variam de 1 metro a 1,8 metros, com profundidade de sulco de 20 a 30 centímetros.

A escolha da época de plantio também é fundamental para o bom desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar, sendo este fator determinante na resistência a doenças e acúmulo de açúcar nos colmos. A cana-de-açúcar pode ser plantada em três diferentes épocas. No primeiro período, denominado de ano-e-meio, o plantio ocorre nos meses de janeiro e março, os quais apresentam condições de temperatura e umidade ideal para desenvolvimento das gemas, e a colheita ocorre após 18 meses. O segundo é o sistema de ano, com plantio nos meses de outubro a novembro, o que melhora a utilização de máquinas que ficam subdivididas entre o período de plantio do primeiro e do segundo sistema. No entanto, espera-se uma menor produtividade para a cana de ano, visto que são apenas oito meses de crescimento efetivo. Por último existe o sistema de plantio de inverno, o qual utiliza a aplicação de 70 a 80% de torta de filtro com a finalidade de fornecer a umidade necessária para a brotação, possibilitando o plantio mesmo no período de estiagem. Isto permite que o plantio da cana-de-açúcar possa ocorrer o ano todo, resultando em diferentes valores de produtividade.

No período chamado de pré-plantio ocorre à amostragem e a análise de solo de cada talhão, o que determina a necessidade de correções de pH e fertilidade do

solo. Uma vez determinadas tais necessidades, são seguidas as recomendações de preparo da área, recebendo primeiramente as mudas, que ao se desenvolverem serão colhidas e distribuídas uniformemente nos sulcos para plantio da cana.

Os níveis necessários dos macronutrientes no solo para desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar são nitrogênio 16 g Kg^{-1} , fósforo $1,2 \text{ g Kg}^{-1}$, potássio 12 g Kg^{-1} , cálcio 4 g Kg^{-1} , magnésio 2 g Kg^{-1} e enxofre 2 g Kg^{-1} (MALAVOLTA, 1981), porém a disponibilidade destes nutrientes para a planta é dependente de diversos fatores, entre os quais, microrganismos presentes no solo e na planta. Há, portanto, uma necessidade de acessar de forma mais extensiva os grupos microbianos encontrados em tais solos, como bactérias e fungos, relacionando a ocorrência dos mesmos com interações abióticas como variações climáticas, ambientais e de manejo, resultando em uma resposta do comportamento das comunidades microbianas de acordo com o zoneamento agrícola estabelecido.

No entanto, outros fatores podem também ter papel fundamental na condução e produtividade desta cultura, como as diferentes práticas de manejo. É atualmente amplamente discutida a alteração no sistema de colheita da cana-de-açúcar, que deixa de ser baseada na queima dos canaviais, e passa a ser cada vez mais feito por meio de colheita mecânica, o que muda totalmente a ciclagem de matéria orgânica no solo.

2.1.2 Interação da cana-de-açúcar com microrganismos

Os microrganismos constituem a maior fonte de biodiversidade do planeta, representando de forma exclusiva dois domínios da árvore da vida (*Bacteria* e *Archaea*), além dos fungos, que se aloca dentro do domínio *Eukarya*. Devido a esta grande diversidade, acredita-se que os microrganismos estejam presentes de forma ubíqua em todos os ambientes terrestres. Dentre estes ambientes, o solo apresenta-se como um dos mais densamente colonizados por microrganismos, no qual, estima-se que em um grama de solo existam aproximadamente 10^9 células microbianas (TORSVIK et al., 2002), apresentando de 10 a 30 mil genomas microbianos distintos (ROESCH et al., 2007).

Em relação à funcionalidade microbiana no solo, as diferentes comunidades estão relacionadas com o catabolismo de compostos orgânicos e consequente formação de novos compostos essenciais para o desenvolvimento dos produtores primários, dentre os quais se destacam as plantas (GRIFFITHS et al., 2006). Esta

funcionalidade microbiana, tanto em campos agrícolas como em ambientes naturais, é intensa no processo de formação do solo, atuando na decomposição da matéria orgânica, promoção do crescimento vegetal, supressão de doenças em plantas, imobilização/mineralização de nutrientes, degradação de contaminantes, estabilização da estrutura do solo e, principalmente, nos ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre) (GARBEVA et al., 2004; WAKELIN et al., 2008); os quais são fatores fundamentais para compreender as alterações nos ecossistemas estudados (KONOPKA, 2009).

Na cana-de-açúcar, trabalhos abordando a comunidade microbiana e suas interações ecológicas como um todo, ainda são escassos. Parte desta diversidade já foi descrita em comunidades associadas à parte aérea das plantas, como endófitos (MENDES et al., 2007; MAGNANI et al., 2010; STUART et al., 2010), ou em associação com as raízes, como os organismos rizosféricos (LUVIZOTTO et al., 2010; ROSSETTO, 2008). Especificamente nos solos com cultivo de cana-de-açúcar, Dini-Andreote e colaboradores (2010) estudaram os efeitos do cultivo de cana transgênica juntamente com o efeito da aplicação de herbicidas sobre a comunidade bacteriana, constatando a ausência de efeitos destes fatores, mas descrevendo a existência de uma ampla diversidade bacteriana nesses solos, composta principalmente por organismos dos filos *Proteobacteria* (34,7%), *Actinobacteria* (28,1%), *Firmicutes* (16,2%) e *Acidobacteria* (9,7%). Os autores destacam também a necessidade de estudos mais específicos para compreender quais os fatores ambientais são preponderantes na modulação destas comunidades, podendo levar ao desenvolvimento de melhores práticas de manejo. Isto condiz com os grupos encontrados no trabalho de Pisa e colaboradores (2011), que estudaram os grupos microbianos na rizosfera em comparação de plantas que receberam fertilizantes nitrogenados com plantas que não receberam. Os autores também constataram que o filo *Verrucomicrobia* apresentou sete vezes menos UTOs em solos com aplicação de fertilizantes quando comparados a solo sem aplicação, sugerindo ser este um grupo responsivo a fertilidade de nitrogênio no solo.

As principais bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar já descritas são pertencentes à *Proteobacteria*, e classificadas nos gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Gluconacetobacter* (BODDEY et al., 2003; BARNETT, et al., 2004). Outros organismos benéficos a esta planta são descritos como produtores de auxina e giberelina (SARAVANAN, et. al., 2008), solubilizadores de

fosfato (MAHESHKUMAR et al., 1999), e solubilizadores de zinco (SARAVANAN et al., 2007), um micronutriente essencial para desenvolvimento da cana-de-açúcar. Ferrara e colaboradores (2011) demonstraram que diferentes tipos de microrganismos endófitos e rizosféricos, isolados a partir de cana-de-açúcar, apresentavam não apenas a produção de substâncias benéficas para o desenvolvimento da planta, mas concomitantemente promovem a inibição de fungos patogênicos. Não obstante, as bactérias presentes na rizosfera da cana-de-açúcar apresentam, além da produção de hormônios de crescimento e solubilização de compostos do solo, a capacidade de produzir compostos, dentre eles sideróforos, proteases e ácido cianídrico, que resultam na proteção e combate de doenças. Hassan (2011) demonstrou que a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* foi eficiente no controle de podridão vermelha da cana-de-açúcar em condições normais de campo.

Porem, observar-se na literatura que o uso de isolados com a finalidade de elevar a produtividade na cana-de-açúcar ocorre de forma específica, e na maioria das descrições, em sistemas controlados de vasos e casas de vegetação, sendo poucos aplicados em campo no sistema atual de cultivo. É conhecido que esta baixa eficácia da inoculação de isolados a campo se deve ao poder de resiliência do solo, o qual dificulta o estabelecimento de organismos introduzidos. Portanto, torna-se necessária a compreensão e o estudo de possibilidades de manejo da comunidade microbiana existente na região cultivada, com o intuito de guiar fatores físicos e químicos do solo, de modo a tornar favorável a estrutura da microbiota deste sistema, dando origem a um sistema de produção mais eficiente e mais sustentável.

De maneira geral, o intenso uso do solo para o cultivo da cana-de-açúcar pode resultar na seleção de grupos microbianos mais adaptados, seja esta seleção exercida por algum dos fatores envolvidos nas práticas culturais, ou apenas pela presença da planta, que libera exsudatos de raiz de maneira intensa no solo. Savario e colaboradores (2010) encontraram diferenças significativas na estrutura de comunidades microbianas em solos com e sem histórico de plantio de cana-de-açúcar, verificando que quanto maior o tempo de cana na área, maior a quantidade de bactérias ocupando a região rizosférica das plantas. Wallis e colaboradores (2010) que constaram que práticas de manejo como queimadas e fertilização podem influenciar na comunidade bacteriana de solos cultivados com cana-de-açúcar.

Relatos deste tipo sobre a diversidade microbiana associada à cana-de-açúcar são, além de escassos, normalmente relacionados a estudos pontuais em apenas uma área de produção, não abrangendo grandes extensões como todo o Estado de São Paulo. Por este motivo torna-se necessário um estudo mais abrangente, que englobe as diversas características de manejo desta cultura, e possam levar a alterações significativas nos microrganismos presentes no solo.

2.1.3 Fungos em cana-de-açúcar

Os fungos são organismos que podem ser unicelulares, representados por leveduras, ou filamentosos, que consistem em hifas que se ramificam, e em conjunto compõem o micélio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A reprodução dos fungos pode ser tanto sexual (fungos septados e superiores), ou reprodução assexuada por brotação, fragmentação de hifa, clamidósporos ou conídios. É estimado que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo desse número conhecidas cerca de 100.000 espécies (KIRKET et al., 2008). Em relação à filogenia do grupo dos fungos, sua definição e identificação taxonômica foram feitas ao longo das décadas baseadas quase exclusivamente em características morfológicas das hifas, corpos de frutificação e esporos, assim como seus ciclos de vida. Apesar de algumas características apresentarem detalhes de distinção, para a maior parte das espécies de fungos essas diferenças não são sempre evidentes (WALKER; VESTBERG, 1998). Os fungos utilizam uma variedade de substratos como fontes de carbono, entretanto, alguns grupos se especializaram em degradar substratos particulares, tornando-se mais competitivos perante outros microrganismos. Por essa razão os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta.

Os fungos presentes no solo são considerados como um dos grupos funcionais mais importantes deste ambiente (ANDERSON; CAIRNEY, 2004), apresentando grande diversidade que resulta em uma ampla adaptação, fazendo com que este grupo seja encontrado em praticamente todos os ambientes terrestres, onde são fundamentais ao funcionamento e manutenção do sistema (POOLE et al., 2001; JOHANSSON et al., 2004; UROZ et al., 2007). Tendo em vista a interação dos fungos do solo com a produção de plantas, Ethur e colaboradores (2004) selecionaram fungos antagonistas eficazes no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do “mofo branco” e responsável pela redução de produções de diversas culturas, principalmente olerícolas. Os fungos também apresentam

importância em sistemas florestais, como descrito por Alves (2008), a qual apresenta dados de controle biológico por fungos de *Miconia calvescens*, uma pequena árvore nativa que se tornou uma das mais agressivas invasoras de ecossistemas florestais em ilhas do Pacífico.

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos relacionando fungos à cultura da cana-de-açúcar, porém estes tratam principalmente sobre fungos como agentes causais de doenças nos canaviais. Dentre as doenças causadas por fungos que prejudicam a cana-de-açúcar destacam-se a ferrugem (*Puccinia melanocephala*) e o carvão (*Ustilago scitaminea*), sendo outras doenças causadas por fungos nesta cultura: mancha parda, podridão abacaxi, podridão vermelha e podridão de *Fusarium* (fusariose). O combate de tais doenças baseia-se principalmente na utilização de variedades resistentes, tratamento de mudas e utilização de fungicidas (TOKESHI, 1997).

Outro exemplo da importância dos fungos está relacionado àqueles pertencentes ao filo *Glomeromycota*, que apresentam interações com raízes das plantas formando micorrizas. Estas estruturas atuam como extensores das raízes das plantas no solo, permitindo maior oferta de nutrientes, e podendo controlar sistemas, como exsudação radicular (TOLJANDER et al., 2007). Considerando a interação de tais grupos com as plantas em um nicho com baixa disponibilidade de carbono e fósforo, a emergência de uma raiz vegetal e a formação de uma micorriza gera um local de alta disponibilidade nutritiva, elevando a microbiota do solo (NAZIR et al., 2010).

A ocorrência de fungos no solo e suas interações com a cana-de-açúcar em função dos atributos físicos e químicos do solo é um tema escasso na literatura, com trabalhos geralmente direcionados a interações micorrízicas no solo. Alguns trabalhos comparam solos de diferentes locais, com distintos fatores químicos e físicos, e utilizam variedades de cana-de-açúcar distintas (SRIKUMAR; MURUGAIAN; THANGARAJ, 2009). Estes autores encontraram os gêneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* e *Scutellospora* com distintas frequências de ocorrência nas variedades de cana avaliadas, e destacam uma correlação negativa entre a quantidade de esporos de fungos micorrízicos encontrados e o pH do solo. Outros trabalhos, como Sivakumar (2012), encontraram uma correlação positiva entre a porcentagem de raízes colonizadas e a ocorrência de esporos de fungos micorrízicos com o pH do solo cultivado com cana-

de-açúcar. São tais divergências que podem ser oriundas de fatores e interações não abordadas pelos autores, mas que podem ter papel essencial papel no sistema de interações neste ambiente.

Portanto, torna-se essencial um estudo, que correlacione à estrutura da comunidade microbiana com dados físicos e químicos, levando em conta o manejo adotado em cada região, criando uma definição biogeográfica da distribuição dos microrganismos no solo, com a finalidade de listar o efeito das diferentes conduções da cultura da cana-de-açúcar, resultando na possibilidade de escolha de sistemas de manejo que use de forma mais intensa e sustentável os recursos do ambiente, incluindo a microbiota local, elevando a produtividade da cana-de-açúcar.

2.1.4 Biogeografia microbiana

A biogeografia (estudo da distribuição espacial e temporal da diversidade, em escalas locais ou regionais) é amplamente aplicada a estudos de organismos eucarióticos complexos, como animais e plantas. A aplicação no estudo da ecologia microbiana foi dificultada durante muito tempo devido às limitações em representar de maneira fiel às comunidades microbianas ambientais na forma de coleção de isolados. Porém, com o advento de técnicas independentes de cultivo (e.g. DGGE, T-RFLP e bibliotecas de DNAr), os estudos de distribuição temporal e espacial da biodiversidade microbiana tornaram-se possíveis (MARTINY et. al., 2006). Estes trabalhos demonstraram diferenças entre os sistemas de uso da terra e ambientes florestais (JESUS et al., 2009; HOSSAIN; SUGIYAMA, 2010), relacionando a ocorrência de grupos específicos com a composição química do solo e/ou sua cobertura vegetal (JANGID et al., 2008).

Dessa forma, a comunidade científica atual concentra esforços em trabalhos que abrangem a diversidade microbiana do solo em escalas amplas, estudando as diferenças filogenéticas e/ou funcionais de comunidades em escalas regionais e/ou continentais (RAMETTE; TIEDJE, 2007). O principal objetivo destes estudos é a busca por padrões existentes em comunidade microbianas, sejam estes observados ao longo do tempo ou espaço (MARTINY et al., 2006). Essa compreensão da distribuição espacial-temporal microbiana e suas relações com fatores como atributos físicos e químicos do solo, propriedades climáticas, manejo do solo, cobertura vegetal; são fundamentais para uma visão extensa da ecologia microbiana, permitindo compreender sua funcionalidade no ecossistema, os

impactos causados pelo uso da terra e outras atividades humanas, permitindo um melhor entendimento da hierarquia das variáveis ambientais, as quais influem diretamente na diversidade microbiana (RANJARD et al., 2010).

Em estudos de biogeografia microbiana, quatro hipóteses que englobam alterações causadas por fatores abióticos (habitats) ou bióticos (províncias) devem ser consideradas (MARTINY et al., 2006), sendo: *i)* a hipótese nula: nela os microrganismos apresentam uma distribuição uniforme, existindo apenas um habitat (região definida pelos fatores abióticos e bióticos) e uma província (região de fatores bióticos é um reflexo de um legado de eventos históricos da área); *ii)* a segunda hipótese reflete a existência de múltiplos habitats e uma única província, sendo chamada de hipótese de Baas-Becking (tudo esta em todos os lugares e o ambiente seleciona); *iii)* um único habitat e múltiplas províncias: nesta hipótese toda a variabilidade biogeográfica é proveniente do legado histórico da área; *iv)* múltiplos habitats e províncias: nesta hipótese adota-se que tanto os fatores bióticos e abióticos, como o legado histórico da área pode influenciar na biogeografia microbiana (MARTINY et al., 2006).

A primeira hipótese, na qual os microrganismos não apresentam uma distribuição geográfica, foi rejeitada por diversos autores em trabalhos que demonstram que a variabilidade na comunidade microbiana pode estar correlacionada a uma distância espacial (CHO; TIEDJE, 2000; FULTHORPE et al., 2008; ODA et al., 2003). A hipótese mais aceita que justifica estas diferenças é a de Baas-Becking, na qual características ambientais como pH (FIERER; JACKSON, 2006), disponibilidade de água no solo (ANGEL et al., 2010), vegetação (HOSSAIN; SUGIYAMMA, 2010), e um conjunto de outros fatores, atuam como moduladores diretos na composição das comunidades microbianas ambientais. Contudo, muitos estudos não consideraram que a variabilidade microbiana ao longo de um gradiente espacial seja resultado apenas de fatores ambientais distintos e também consideram questões históricas da área com sendo fatores relevantes (MARTINY et al., 2006).

Recentemente, a França criou diversos programas para monitorar a biodiversidade em seus solos, gerando uma rede de informações, sendo dentre eles os “*Réseau de Mesures de la Qualité des Sols*” (RMQS) e o ECOMIC-RMQS destinados a estudar a biogeografia bacteriana (RANJARD et al., 2010). Estudos prévios deste grupo originaram mapas de intensidade da comunidade bacteriana, demonstrando que a biogeografia de seus solos é determinada pelas questões

ambientais, como variações físico-químicas do solo, e a cobertura vegetal; confirmando a hipótese de Bass-Becking (DEQUIEDT et al., 2009). De maneira mais específica, e abrangendo a diversidade funcional, a diversidade de organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio foi estudada em escalas regionais pela metodologia de PCR quantitativo (qPCR). Nela, Bru e colaboradores (2010) efetuaram um estudo em solos franceses, abrangendo uma área de 31.500 Km², onde observaram, a partir de mapas de intensidade, diferenças na comunidade microbiana relacionada ao ciclo do nitrogênio nas etapas de oxidação da amônia, redução do nitrato e desnitrificação, sendo o pH um dos fatores preponderantes para a explicação desta variação. Outro trabalho, utilizando a metodologia de microarranjos de DNA para 11 genes funcionais, observou a ocorrência de distintas comunidades microbianas em diferentes solos, sendo estas alterações relacionadas com o tipo de manejo da cultura (REEVE et al., 2010).

Portanto, o conhecimento da diversidade, e o estudo da biogeografia microbiana nos solos em escala regional, proporcionam uma melhoria na gestão do solo, a qual pode resultar em uma maior produtividade da planta (CHAPARRO et al., 2012). Assim sendo, o conhecimento dos fatores que interferem sobre estas comunidades, juntamente com a nomeação de práticas que promovem a maior ocorrência de organismos benéficos às plantas, pode resultar no desenvolvimento de melhores práticas agrícolas, levando a uma maior eficiência e sustentabilidade na produção de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, servindo como um modelo de estudo a ser aplicado em outras áreas e culturas agrícolas do país.

2.1.5 Métodos independentes de cultivo

O cultivo de microrganismos e técnicas independentes de cultivos são as metodologias que permitem explorar a diversidade microbiana presente no solo. Contudo, o cultivo e o isolamento de microrganismo, apesar de tradicionais, abrangem apenas valores entre 0,1% e 10% da comunidade bacteriana no solo. Em relação aos fungos, estima-se que apenas 17% pode se desenvolver em meio de cultivo (NANNIPIERI et al., 2003; TORVISK et al., 1990, 2002). Dessa maneira, os métodos baseados em cultivo selecionam os organismos capazes de sobreviver ao meio de cultura e sob as condições de incubação empregadas no procedimento.

Com a diversidade microbiana subestimada, a capacidade de correlacioná-la com os fatores físico-químicos, distância geográfica e cobertura vegetal é diminuída,

o que por muito tempo limitou as inferências de biogeografia para as comunidades microbianas. No entanto, com o advento das metodologias independentes de cultivo, ocorreu um grande avanço para a ciência no estudo da ecologia e da biogeografia microbiana.

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a pesquisa com fungos têm permitido sua identificação de forma independente da morfologia, e também de forma independente de cultivo, levando a um maior conhecimento dos organismos constituintes deste grupo (AVIO et al., 2009).

Dentro deste contexto, diversas são as metodologias desenvolvidas para estudo da comunidade microbiana no ambiente, sendo o ponto de partida a extração do DNA e/ou RNA total diretamente das amostras ambientais. Metodologias conhecidas como *fingerprint*, estudam a estrutura da comunidade a partir de um perfil de produtos de amplificação por PCR, que podem ser diferenciados a partir de alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C), por meio de uma metodologia intitulada de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (*DGGE*) (MUYZER et al., 1993), ou por restrição com endonucleases específicas destes fragmentos, utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (*T-RFLP*) (LIU et al., 1997). Outra metodologia amplamente difundida é a de PCR quantitativo (*qPCR*) (WEIS et al., 1992), na qual os genes alvos estudados são amplificados e quantificados ao mesmo tempo, obtendo-se ao final valores de número de cópias do gene por grama de solo amostrado em cada ambiente. Uma revisão sobre estas ferramentas e sua aplicação para a análise da diversidade de comunidades microbianas foi publicada por Andreote e colaboradores (2009).

O método T-RFLP é geralmente utilizado para análises de comunidades microbianas complexas (LIU et al., 1997), visto que o resultado obtido permite a estimativa da diversidade filogenética não apenas de riqueza, mais de abundância dos microrganismos dentro da comunidade. A técnica apresenta semelhanças com a técnica ARDRA (Análise de restrição do DNA ribossomal), porém a primeira se utiliza de primers (iniciadores) marcados com um fluorocromo, o que possibilita o uso de um sequenciador automático de DNA, e resultando no tamanho dos fragmentos terminais de restrição juntamente com suas quantidades relativas. Portanto temos

que tais técnicas são passíveis de serem utilizadas para obter informações reais da estruturação da comunidade de fungos e sua respectiva abundância no solo.

2.2 Objetivos e Hipóteses

2.2.1 Objetivos

Avaliar a diversidade de fungos em solos de cultivo de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo sob diferentes atributos químicos, físicos e de manejo, e verificar a ocorrência de padrões biogeográficos na estruturação dessa comunidade.

2.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar extração de DNA de total de fungos das amostras de solo;
- ✓ Quantificar por PCR em tempo real as comunidades de fungos em solos nas áreas avaliadas;
- ✓ Determinar a estrutura das comunidades de fungos destas áreas por meio da aplicação da técnica de T-RFLP;
- ✓ Correlacionar os dados de quantificação e de estruturação das comunidades de fungos com características físicas, químicas e de manejo das áreas amostradas;
- ✓ Inferir sobre o efeito primordial de tais variáveis sobre o efeito da distância geográfica dos solos, possivelmente determinando a ocorrência de padrões biogeográficos de comunidades de fungos em solos cultivados com cana-de-açúcar.

2.2.3 Hipóteses

O presente trabalho tem como primeira hipótese o fato de que atributos físicos, químicos ou de manejo apresentam efeito sobre a diversidade de fungos no solo. A segunda hipótese testa se os efeitos dos atributos suplantam o efeito espacial sobre a comunidade de fungos.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Coleta de amostras de solo

Um total de 476 amostras de solo foram coletadas, sendo quatro repetições por talhão, dos 119 talhões selecionados, pertencentes a 11 unidades produtoras de cana-de-açúcar, distribuídas pelo estado de São Paulo. Cada amostra foi composta de cinco subamostras realizadas na camada 0 a 20 cm de solo. As áreas coletadas

se dispersam ao longo das principais zonas climáticas onde a cana-de-açúcar é cultivada (Figura 2).

Figura 2 – Zonas Edafoclimáticas descritas no centro integrado de informações agrometeorológicas do Estado de São Paulo (CIIAGRO, 2009) para plantio de cana-de-açúcar. Os pontos com letras A; B; C; D; E; F; G; I; J; K e L indicam as regiões coletadas e ESALQ/USP é a localização da universidade, onde fica a base deste projeto

A distribuição das usinas resultou em um perímetro total de 896,4 Km que forma uma área de 23.022,00 Km², com distancias de borda variando de 182,4 Km a 30,2 Km, e tendo como distancia máxima 316 km, entre as usinas “A” e a “F” (Figura 3).

Figura 3 – Distancias entre as usinas amostradas e seu perímetro total

2.3.2 Análises físico-químicas dos solos coletados

Para as análises físico-química do solo das áreas foram utilizadas duas amostras, onde cada uma foi obtida pela junção de duas repetições. Estas amostras foram submetidas às análises padrões de solo, onde foram determinados os seguintes parâmetros:

- ✓ Análises química: pH em CaCl_2 , Matéria Orgânica, P – resina, K, Ca, Mg, H+Al e os cálculos SB, CTC e V%.
- ✓ Análises física: areia total, silte e argila.

Além destas quantificações, variáveis de manejo e de histórico das áreas foram também obtidas. As variáveis consideradas foram: tempo de cultivo da cana-de-açúcar na área, adição de fertilizantes minerais; adição de vinhaça; carvão; torta de filtro; número de cortes da cana, colheita mecanizada, queima, temperatura do solo. Sendo os dados referentes à adição de adubos minerais, vinhaça e torta, utilizados na forma de valores de presença e ausência, ou seja, a tabela desses atributos para cada área apresentava o valor “1”, para áreas que receberam o referente atributo, ou “0” para áreas que não receberam.

2.3.3 Extração de DNA total do solo

As amostras obtidas para a análise foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5µl de produto de DNA extraído, e posteriormente corado em solução de brometo de etídeo.

2.3.4 Determinação de estrutura de comunidade de fungos por T-RFLP

Para o estudo da comunidade de fungos, a metodologia de *fingerprinting* utilizada foi a T-RFLP. A escolha desta metodologia se deu devido ao grande número de amostras a serem comparadas, o que limita o uso de outras técnicas como o DGGE, onde se considera válida apenas a comparação entre amostras num mesmo gel de eletroforese. Dessa forma, a T-RFLP apresenta como uma alternativa bastante interessante, principalmente por sua confiabilidade em gerar padrões comparáveis mesmo em distintas análises. Isto se deve à alta repetibilidade dos perfis obtidos no leitor de fluorescência (sequenciador). Esta metodologia também

dá suporte à geração de um banco de dados, onde outras amostras podem no futuro serem adicionadas e comparadas àquelas presentes no banco de dados.

Para a análise de T-RFLP o DNA das amostras foi submetido à amplificação com os primers específicos de regiões ITS (internal transcribed sequences) fúngicas FAM-ITS1F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGAT ATC 3'), com reação de amplificação realizada através de uma mistura contendo 1 µl da suspensão de DNA (aprox. 50ng), 3,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 20 pmol dos primers, PCR buffer 1X e 2,5 unidade de Taq DNA polimerase, sendo o volume completado com água ultra-pura autoclavada para 50 µl. As condições de termociclagem foram: 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 13 ciclos de 94°C por 35 segundos; 55°C por 55 segundos; 72°C por 45 segundos; 13 ciclos de 94°C por 35 segundos; 55°C por 2 minutos; 72°C por 45 segundos; 9 ciclos de 94°C por 35 segundos; 55°C por 3 minutos; 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. (GARDES; BRUNS, 1993). Todas as reações de PCR foram conduzidas de acordo com as metodologias descritas na literatura, sendo realizadas triplicatas de cada reação para minimizar os efeitos de “bias” de PCR (FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009).

Após a amplificação, as amostras foram purificadas em placa de 96 poços utilizando o volume total do produtor de PCR obtido (50µl) com a adição de 200µl de isopropanol seguido de incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Após isso, foi realizada a centrifugação a 4.500 RPM por 1 hora e 30 minutos; descarte de sobrenadante; spin com a placa invertida; adição de 250 µl de etanol absoluto; centrifugação a 4.500 RPM por 1 hora e 30 minutos; spin com a placa invertida; descarte de sobrenadante e secagem das placas a 45°C por 15 minutos. O produto purificado foi então ressuspendido em 50uL de água esterilizada e quantificado em gel de agarose 1,5%.

As clivagens com as respectivas endonucleases foram realizadas utilizando quantidades de aproximadamente 200 ng de produto de amplificação com 5 unidades de enzima *HaeIII* nas condições descritas pelo fabricante (CARSON et al., 2010; ANGEL et al., 2010). Para se obter réplicas do equipamento, cada amostra foi lida duas vezes em sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems) utilizando a matriz azul e o marcador de tamanho de fragmentos 600pb.

2.3.5 Análise dos dados de T-RFLP

A leitura dos eletroferogramas foi realizada no programa GeneMapper® 4.1, onde foram considerados os parâmetros alelos, tamanho, altura e área dos picos, ajustados com o padrão GS600LIZ e diferenciando grupos ao nível de 0,5 par de base. Dessa forma, a extração dos dados de T-RFLP deu origem a uma matriz de 476 amostras e 742 picos observados. Esta matriz serviu como base para as análises posteriores.

Os resultados obtidos foram analisados nos programas estatísticos PAST 2.14 (Copyright Hammer and Harper 1999-2012), Canoco for Windows 4.51 (Copyright C 1997-2003 Biometris) e R 2.15.1 (Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing). Os métodos de análise de dados utilizados foram Análise de Componentes Principais (PCA), que possibilita verificar os atributos que apresentam maiores influência na distribuição dos dados; Análise de Coordenadas Principais (PCoA) que preserva qualquer distância relativa entre os dados amostrados, o que o torna importante nas análises de beta-diversidade, enquanto que a PCA leva em consideração a distância Euclidiana das amostras; Análise de redundância (RDA), que usa regressão múltipla para a correlação de dados microbiológicos com dados ambientais; e a Análise de Similaridade (ANOSIM), que é um método não paramétrico (baseado em randomização) de análise multivariada amplamente utilizada em ecologia de comunidades. Além destas metodologias, correlações foram determinadas entre os perfis de picos obtidos com as variáveis observadas, juntamente com linhas de tendência, com o objetivo de verificar o grau de significância da correlação dos dados obtidos.

2.3.6 Quantificação dos fungos por PCR em tempo real

Para quantificar o número de cópias da região ITS fúngica por grama de solo, as amostras de DNA obtidas foram submetidas à metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As reações serão realizadas no iQ5 (BioRad), utilizando o sistema SYBR GreenI. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 25 µl, contendo 12.5 µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil), e os primers ITS1f (5' - CTTGGTCATTTAGAGG AAGTAA- 3') e 5.8s (5' - CGCTGCGTTCT TCATCG - 3') na concentração de 100nM.

As amplificações foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de amplificação 95°C por 30 s, 53 °C por 30s e 72 °C por 1 min, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 45s (FIERER et al., 2005; RASCHE et al., 2010). Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72° à 96°C para verificar a especificidade da amplificação.

Para a quantificação, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidos do DNA molde adicionado nas reações. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído das amostras de solo foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse.

Os dados gerados foram comparados entre as diferentes áreas amostradas e também correlacionados com variáveis ambientais, no intuito de determinar a abundancia de fungos nos solos estudados com características intrínsecas a cada área amostrada, sendo estabelecidas linhas de tendência com o intuito de testar o grau de significância da relação dos atributos com a abundância de fungos no solo.

2.3.7 Mapeamento de comunidades fúngicas

As amostras coletadas em cada talhão foram georeferenciadas utilizando o GPS GARMIM® com sistema de georreferenciamento WGS84 os quais foram convertidas ao sistema UTM, utilizando um conversor online Earth Point. Juntamente com os dados de quantidade e diversidade dos fungos nos solos, obtidos respectivamente pelas técnicas de qPCR e T-RFLP, estas coordenadas foram plotados em um mapa relativo à área analisada. A criação deste mapa de correlação de diversidade e abundância com o a variação espacial foi realizada no programa PAST 2.14 (Copyright Hammer and Harper 1999-2012), onde as coordenadas obtidas foram extrapoladas pelo método de Krigagem.

2.4 Resultado e Discussão

2.4.1 Atributos de manejo

A entrevista realizada com os responsáveis pelas áreas avaliadas indicou o quão variado são os sistemas abordados para plantio e condução da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. O histórico de cana avaliado nas áreas apresentou uma média de 17 anos, com áreas que apresentaram mais de 50 anos com histórico de plantio de cana-de-açúcar, e áreas que foram recém-reformadas, sem histórico de plantio de cana. As áreas também apresentaram variação na época de corte avaliada com média de 4º corte, máxima de 9º corte e áreas com cana-planta. Dos manejos adotados, 89% das áreas avaliadas apresentaram a utilização de adubos minerais como principal fonte de nutrientes para a cana-de-açúcar, 66% das áreas apresentou a aplicação de vinhaça, 39% aplicação de torta de filtro e 4% a aplicação de carvão. Quanto à forma de colheita, 73% das áreas com cana são colhidas de forma mecanizada, porém destas, 10% apresentaram queima accidental. Uma PCA (Figura 4) indicou que os manejos colheita e queima foram os atributos que mais contribuíram para a separação das amostras, na primeira componente principal (explicando 23,5% da variância entre as amostras).

Figura 4 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos atributos de manejo adotados, histórico e número de corte da cana-de-açúcar das áreas analisadas

Os atributos relacionados ao segundo eixo foram adubação mineral e histórico de cana da área (explicando 18,8% da variância). Portanto, o manejo juntamente com histórico da área e número de corte da cana-de-açúcar explicaram 42,3% de variância observada entre as amostras. Na literatura existem trabalhos descrevendo o uso da terra, com a implementação de diferentes técnicas de manejos, e os fatores químicos do solo como principais fatores de diferenciação de perfis de bactérias e fungos no solo (DRENOVSKY et al., 2010; DEQUIEDT et al., 2011). Pode-se ainda indicar com base em tal literatura, que diferenças climáticas, apesar de serem fatores primordiais para estabelecimento de manejos incluindo adubação, são pouco eficientes para distinção de áreas por perfis microbianos. Não obstante, não é conhecido na literatura trabalhos que abordem atributos de manejo juntamente com atributos químicos e físicos do solo, na estruturação da comunidade de fungos nos solos cultivados com de cana.

2.4.2 Atributos químicos e físicos das amostras coletadas

As análises químicas e físicas realizadas nas amostras de solo indicaram grandes variações em todos os atributos avaliadas, como apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Amplitude de variação dos parâmetros físicos e químicos determinados nos solos coletados

Apesar da grande variação dos dados encontrados, foi possível obter uma boa distribuição das diversas características dos solos cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, como podemos observar no gráfico de

porcentagens de áreas com classificações de textura distintas que variam de Arenosa á Muito Argilosa (Figura 6). Esta ampla variação e a concomitante presença significativa de cada atributo tanto na parte química como na física são indicativos de que o conjunto de dados e as amostras coletadas são adequados para o referente tipo de estudo.

Figura 6 – Porcentagem das áreas nas distintas classificações de textura do solo cultivado com cana-de-açúcar

A análise dos componentes principais dos dados químicos e físicos apresentou os atributos químico (CTC) e físico (Argila, Areia e Silte) como principais fatores da PC1, a qual representa 54,3% da variância dos dados, o pH foi o principal fator influente na PC2 o qual representou 21,8% da variância dos dados (Figura 7).

Figura 7 - PCA com base em parâmetros físicos e químicos do solo, a) das amostras coletadas; b) das médias das amostras de cada usina

Utilizando as médias das variáveis físicas e químicas as usinas foram separadas em grupos; o primeiro contendo as usinas “D”, “F” e “G”, com maiores valores de argila, matéria orgânica; o segundo grupo composto das usinas “C”, “B” e “E”, que apresentaram maiores valores de pH e cálcio; e o terceiro grupo formado

pelas usinas “I”, “K” e “J”, com maiores valores de areia. Além destes, as usinas “A” e “L” apresentaram-se distantes dos 3 grupos formados, com grandes quantidades de argila e matéria orgânica para a usina “A”, e grande quantidade de areia para a usina “L”. Tais agrupamentos formados divergem das distribuições espaciais na maior parte dos casos, visto que usinas próximas, com menos de 70 km de distância, como as usinas “E” - “F” e “A” – “L”, “I” – “G”, apresentaram grandes diferenciações de atributos químicos, o que pode estar relacionado à presença de manchas de solos, devido às diferentes formações geológicas encontrados no estado de São Paulo, ou a alterações do manejo utilizados por cada uma das usinas que compõe este estudo.

2.4.3 Perfis da comunidade de fungos no solo

Na literatura, trabalhos sobre fungos em solos agrícolas são pontuais, raramente abordando as comunidades como um todo, e geralmente relacionados à causa e efeito de adição de compostos, como defensivos agrícolas (RAMOS et al., 2012), fertilizantes minerais (REIS et al., 2000) e orgânicos (HOLST et al., 2012), além de resíduos da cultura da cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2008). Portanto, o presente trabalho é pioneiro quanto aos seus resultados sobre perfis da comunidade de fungos nos solos cultivados com cana-de-açúcar, onde se relata a ocorrência de correlações de tais perfis com atributos químicos, físicos e de manejo sobre uma ampla distribuição espacial dos pontos estudados.

Os perfis das comunidades de fungos dos solos obtidos resultaram em um total de 742 grupos distintos (picos), compostos por fragmentos de DNA que variaram de 50 a 600 pares de base. Os perfis de fungos quando plotados em uma PCoA (Figura 8A) apresentaram uma grande variação, com eixos da PCoA1 e PCoA2 explicando 18,76% da variância dos dados.

Figura 8 – (A) Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de fungos do solo de cada área analisada; (B) Esquema da análise de similaridade (ANOSIM) dos perfis de fungos do solo das usinas, representadas por círculos com cores distintas

Observa-se primeiramente, que algumas usinas apresentam suas amostras bastante similares, mais agrupadas, enquanto outras apresentam suas amostras espalhadas em todas as áreas do gráfico. Exemplos disso são as usinas “A”, “I” e “L”, que apesar de apresentarem algumas amostras dispersas, têm a grande maioria de suas amostras agrupadas, enquanto que outras apresentam perfis distintos dentro da mesma usina, como as usinas “B”, “C” e “K”. Este tipo de alocação das amostras pode ser um indicativo de que em alguns casos a separação biogeográfica pode sobrepor as variáveis físicas, químicas e de manejo, enquanto que em outras áreas os atributos de manejo podem atuar de forma mais determinante sobre a estruturação de tais comunidades, independente da distribuição espacial das amostras analisadas.

Para confirmar e tornar mais clara a similaridade e o agrupamento dos perfis de fungos obtidos foi realizada uma ANOSIM (Figura 7B), usada na observação de quais usinas apresentam similaridade de seus perfis de fungos sob uma análise estatística (com $p < 0,05$). Podemos observar que os resultados da PCoA (Figura 7A) se assemelham aos da análise de ANOSIM, onde as usinas “A”, “L” e “I” apresentam-se distantes uma da outra, e também separadas do grande grupo, onde as usinas “B” e “K” apresentam um agrupamento com grande parte do restante das usinas. Em relação às variáveis que podem estar causando tais agrupamentos e separações, temos que vários atributos podem estar atuando conjuntamente, e a descrição dos principais fatores será abordada posteriormente dentro deste trabalho (item 2.4.4).

Para solos cultivados com cana-de-açúcar não foram encontrados trabalhos abordando a identificação robusta de grupos filogenéticos de fungos. Na literatura temos análises mais completas apenas para solos de floresta (BUÉE et al., 2009) e manguezais (FASANELLA et al., 2012), ambos indicando a dominância dos grupos Ascomycota e Basidiomycota nestes ambientes. Ambos os trabalhos, juntamente com o estudo desenvolvido por Buée e seus colaboradores (2009), indicam que uma grande parte dos fungos acessados no ambiente solo são pertencentes a grupos taxonômicos ainda não classificados. Para as comunidades bacterianas em solo cultivado com cana-de-açúcar existem alguns trabalhos mais detalhados, que elegem como grupos filogenéticos mais abundantes os grupos Proteobacteria (34,7%), Actinobacteria (28,1%), Firmicutes (16,2%) e Acidobacteria (9,7%) (DINI-ANDREOTE et al., 2010; PISA et al., 2011).

Apesar de não ser possível inferir sobre a taxonomia dos grupos de fungos encontrados com os resultados obtidos neste trabalho, é possível se obter informações relevantes com a análise da frequência em que os distintos picos ocorrem dentro do total das amostras, determinando os principais grupos de fungos presentes nos solos de cana-de-açúcar analisados (Figura 9). Dessa forma, foi possível determinar que os picos denominados como Grupo 23; 53; 60; 74; 101; 107; 133; 142; 518; 595; 626 e 706, estão presentes em mais de 75% amostras analisadas, o que indica que estão são importantes constituintes do “core” de fungos do solo cultivados com cana-de-açúcar, e possivelmente participam de importantes funções no funcionamento e manutenção do ecossistema solo.

Figura 9 – Frequência dos grupos de fungos encontrados nas amostras analisadas avaliados por meio da técnica de T-RFLP. Em destaque os grupos que se mostraram com frequência maior do que 75%

Estes grupos eleitos no presente trabalho como os principais candidatos a comporem o “core” da comunidade de fungos dos solos estudados foram analisados por meio de correlação quadrática em curva de resposta com atributos químicos e físicos dos solos (Figura 10), que se mostraram influentes na estruturação das comunidades de fungos nos solos estudados ($p < 0,05$); potássio (K), silte, matéria orgânica (M.O), magnésio (Mg), hidrogênio + alumínio (H+Al), areia, argila e capacidade de troca catiônica (CTC).

Figura 10 – Dinâmica dos principais grupos de fungos encontrados no solo de cana-de-açúcar em função dos atributos químicos e físicos do solo

Na curva resposta podemos observar que os atributos relacionados à estrutura do solo (areia e argila) foram os que influenciaram mais grupos (9 do total de 11), seguidos pelos atributos K e a M.O (com 8 grupos modulados). O grupo 626 apresentou significância para todos os atributos selecionados, com exceção do atributo H+Al, o qual foi exclusivamente influente sobre o grupo 74. Pode-se observar com tais análises que existem variáveis com relação direta a abundância de determinados grupos, por exemplo, o grupo 626 com potássio, mas existem também valores ótimos intermediários, como observado para areia e argila e o grupo 133, o que indica que solos de textura média sejam mais aptos a maior abundância deste grupo de fungos. Esta análise é inovadora, e dá margem a inúmeras

inferências, que podem ser posteriormente validadas, na busca de uma explicação da estruturação das comunidades de fungos nos solos em micro e macro-escala.

2.4.4 Correlações dos dados ambientais com os perfis de fungos nos solos

As áreas relativas dos picos obtido na análise de T-RFLP foram correlacionadas com os dados físicos, químicos e de manejo em uma análise de redundância (RDA), com o intuito de estabelecer quais variáveis se correlacionam de maneira mais íntima com a variância dos perfis de fungos observados. O índice de significância (p) e a porcentagem de explicação (A) de cada variável são indicados nas Tabelas 1 e 2. As análises foram realizadas considerando todas as amostras, e também apenas considerando conjuntos de cada área (usina) amostrada separadamente. Esta análise propiciou verificar a explicação das variáveis num contexto geral, e também pontualmente, onde o fator distância geográfica deve ter um peso menor na estruturação das comunidades alvo.

Primeiramente explorando a análise feita com todos os perfis de T-RFLP, os fatores ambientais, apesar de terem significância estatística ($p < 0,05$), mostraram-se pouco capazes de explicar a variância observada nos dados (em média com valores de A menor de 1%). Dentre os fatores, as variáveis químicas e físicas que demonstraram maiores valores de explicação foram K (1,0%), seguido de M.O (0,8%), areia (0,7%), Mg (0,6%), pH (0,5%) e H+Al (0,5%), P (0,5%), Ca (0,4%) silte (0,4%) (Tabela 1). Em relação às práticas de manejo e características da área, destacam-se as variáveis: adubação mineral (1,6%), adição de carvão (0,9%), histórico da área (0,7%), aplicação de vinhaça (0,8%), aplicação de torta (0,7%), corte da cana (0,6%), e queima da cana (0,4%) (Tabela 2). Dentre os fatores que se mostraram significativos, pode-se observar correlação entre os mesmos, como por exemplo, a presença do fator K entre as variáveis químicas e aplicação de vinhaça entre os manejos, o que dá grande robustez à análise, evidenciando os principais fatores moduladores da diversidade de fungos nos solos estudados.

Tabela 1 – Correlação dos atributos químicos e físicos do solo com os perfis de fungos no solo, indicando a porcentagem de explicação de cada atributo (A) e seu índice de significância (p)

Usinas	pH		P		K		Ca		Mg		H+Al		CTC		Areia		Silte		Argila		M.O	
	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p
A	6%	0,002	4%	0,002	-	-	2%	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3%	0,002
B	4%	0,024	4%	0,044	4%	0,036	-	-	3%	0,038	10%	0,002	-	-	-	-	9%	0,002	5%	0,016	-	-
C	11%	0,002	-	-	-	-	-	-	7%	0,05	-	-	-	-	-	-	11%	0,006	-	-	7%	0,01
D	-	-	7%	0,002	-	-	4%	0,014	3%	0,046	-	-	-	-	-	-	5%	0,002	5%	0,01	-	-
E	-	-	-	-	6%	0,006	-	-	4%	0,026	-	-	-	-	5%	0,004	8%	0,002	-	-	6%	0,002
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3%	0,028	-	-	-	-	3%	0,012
G	-	-	-	-	-	-	-	-	5%	0,016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	5%	0,01	-	-	6%	0,004	-	-	4%	0,012	-	-	4%	0,02	-	-	-	-	4%	0,01	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	12%	0,022	8%	0,026	-	-	-	-	-	-	7%	0,04	-	-
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total*	26%		15%		16%		6%		38%		18%		4%		8%		33%		21%		19%	
Todas **	0,5%	0,006	0,5%	0,002	1%	0,002	0,4%	0,008	0,6%	0,002	0,5%	0,002	-	-	0,7%	0,002	0,4%	0,004	-	-	0,8%	0,002

* Soma das porcentagens de explicação de cada usina

** Correlação das usinas em conjunto

Tabela 2 - Correlação dos atributos de manejo com os perfis de fungos no solo, indicando a porcentagem de explicação de cada atributo (A) e seu índice de significância (p)

Usinas	Histórico da área		Adubação Mineral		Vinhaça		Torta		Carvão		Corte		Colheita Mecanizada		Queima	
	A	P	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p	A	p
A	-	-	4%	0,02	3%	0,034	2%	0,006	4%	0,002	-	-	-	-	2%	0,04
B	-	-	10%	0,002	8%	0,002	-	-	-	-	4%	0,026	10%	0,002	5%	0,01
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	3%	0,028	-	-	-	-	7%	0,002	5%	0,002	6%	0,002
E	5%	0,008	7%	0,002	6%	0,004	5%	0,018	-	-	-	-	4%	0,03	5%	0,012
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4%	0,004	3%	0,048	-	-
G	5%	0,016	-	-	-	-	-	-	-	-	5%	0,034	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	4%	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	5%	0,006	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10%	0,04
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total*	14%		21%		20%		7%		4%		25%		22%		28%	
Todas**	0,7%	0,002	1,6%	0,002	0,8%	0,002	0,7%	0,002	0,9%	0,002	0,6%	0,2%	0,6%	0,002	0,4%	0,004

* Soma das porcentagens de explicação de cada usina

** Correlação das usinas em conjunto

Retomando os valores explicados pelas variáveis consideradas, podemos considerar que a baixa explicação das variáveis na análise geral das amostras pode estar relacionada à alteração na estrutura das comunidades de fungos por outros fatores não considerados na análise, dentre os quais pode-se citar a estruturação diferencial devido à separação geográfica das amostras. Para se comprovar este efeito, foram determinados os valores de A e p para as mesmas variáveis, porém dentro de cada usina amostrada, reduzindo o efeito de separação geográfica das amostras. Assim, caso a separação geográfica seja importante, espera-se obter maiores valores de explicação para estas variáveis quando correlacionadas apenas com amostras oriundas da mesma região.

Nesta análise, pode-se observar que o fator químico que se destacou na estruturação das comunidades de fungos num maior número de áreas estudadas foi o magnésio, significativo para 8 usinas, com valores de " A " variando entre 3 e 12%. Este mesmo fator explicou apenas 0,6% da variância global dos dados. O mesmo ocorre para outros, como silte, pH, argila e M.O que foram significativos para 4 usinas, explicando valores bem maiores da variância do que quando analisadas todas as áreas conjuntamente. Na literatura não foram encontrados trabalhos que indicassem atributos químicos ou físicos relacionados à estruturação da comunidade de fungos no solo, porém há trabalhos específicos, feitos em uma área, que inferem sobre tais efeitos. Um exemplo é o trabalho de Bhat e colaboradores (2011), que indicam uma correlação dos atributos físicos de textura do solo, e químicos como pH, P e K com a ocorrência de fungos micorrízicos do solo. Vários outros trabalhos também demonstram o efeito pontual da queimada sobre comunidades microbianas do solo. Em um destes estudos, Souza e colaboradores (2012) descrevem que esta prática, além de reduzir a biomassa microbiana, também afeta negativamente os valores de pH, fósforo, potássio, cálcio e magnésio e acabam por elevar os valores de H+Al nos solos. Desta forma, o presente trabalho é inovador nesta análise global da estrutura da comunidade de fungos, analisando conjuntamente fatores que variam de forma mais pontual, e fatores relacionada à distância geográfica entre os solos amostrados.

Com isso, podemos indicar que de modo geral os atributos químicos e físicos apresentam maior explicação da variância dos perfis de fungos quando comparadas com amostras das mesmas usinas, ou seja, próximas espacialmente. Porém, quando se trata de pontos amostrais mais distantes a explicação maior da

diferenciação dos perfis deixa de ser atribuída aos atributos químicos e físicos, dando suporte à inferência da ocorrência em maior escala da explicação da variância pela distribuição espacial das amostras.

2.4.5 Correlação da similaridade dos perfis de fungos com a distância entre os pontos amostrados

Trabalhos correlacionando comunidades microbianas com distribuição espacial, pertencentes à temática de biogeografia, são cada vez mais frequentes na literatura. Um exemplo é o trabalho de Xiong e colaboradores (2012), que determinaram que a diferenciação na comunidade de bactérias ocorre de forma correlacionada com a distância entre elas, contribuindo com 12,2% da variância encontrada nas amostras. Porém, ainda não foi descrito tal feito na estruturação de comunidades de fungos no solo.

Para o presente trabalho, a correlação da similaridade dos perfis de T-RFLP com a distribuição espacial (em valores log) dos pontos foi determinada. Tais dados mostraram correlação negativa ($p < 0,01$ e $R^2 = 0,07$), indicando que há uma tendência de encontrarmos estruturas distintas das comunidades de fungos de acordo com a distância entre os pontos analisados (Figura 11). Apesar da significância da correlação, observam-se também pontos que se distanciam da linha de tendência, indicando que outros fatores além da distância geográfica são importantes na composição de tais comunidades, o que complementa perfeitamente o encontrado em relação a outras variáveis ambientais analisadas no presente trabalho.

Figura 11 – Correlação da similaridade dos perfis de fungos no solo com a distância entre os pontos amostrados

Há grande necessidade de se explorar a estruturação de comunidades fúngicas numa visão biogeográfica. Alguns trabalhos na literatura correlacionam a quantidade de bactérias com o fator de distribuição espacial, como o descrito por Bru e colaboradores (2010), que estabeleceram que a distribuição espacial correspondeu a 7,7% ($p < 0,001$) da variação da abundância de bactérias nos solos. Para dispersão de fungos em solos de cana-de-açúcar, não foram encontradas referências bibliográficas, mas nosso valor de R^2 foi muito próximo ao obtido pelo trabalho anteriormente descrito.

2.4.6 Correlação dados ambientais e de manejo com a abundância de fungos no solo de cana

A quantificação de fungos foi aferida por meio do número de cópias da região ITS específica para este grupo em cada grama de solo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 300 bp com uma eficiência de 90,4% e valor de R^2 de 0,99.

Esta determinação resultou em valores alocados em uma distribuição normal que variam de 10^3 (mil) a 10^7 (dez milhões) cópias do fragmento alvo por grama de solo, sendo a média destes valores em solos de plantio de cana-de-açúcar do estado de São Paulo 10^5 (cem mil) cópias por grama de solo (Figura 12). Esta estimativa é feita com base no número de cópias do DNA alvo, usando este valor como uma estimativa do número de fungos nestas amostras. No entanto, sabe-se

que existem fungos com diferentes números de cópias desta região do DNA, e/ou mesmo fungos haplóides e diplóides, o que pode gerar algum viés nesta determinação.

Figura 22 - Frequência da quantidade logarítmica dos fungos por grama de solo nas amostras avaliadas

Não foram encontradas referências sobre a quantidade total de fungos em solo de cana-de-açúcar, o que torna este trabalho pioneiro tanto na quantificação quanto na correlação destes resultados com dados ambientais e de manejo do solo. Porém, os valores determinados se aproximam do trabalho de Hussain e colaboradores (2011), que encontraram uma abundância de fungos na rizosfera de arroz na ordem de 10^4 a 10^5 por grama de solo. Em outros tipos de solos, já foram descritas quantidade de fungos em solos, como em solos de manguezais, onde tais organismos ocorrem em abundância próxima a 10^7 (FASANELLA et al., 2012), ou áreas com solos sob manejo de aração, onde são encontrados valores da ordem de 10^3 células fúngicas por grama de solo (ROUSKE et al., 2010).

Para melhor exposição dos dados e no intuito de verificar alterações da variação de fungos, os dados de quantificação dos fungos foi apresentado separadamente (por usina), mantendo as escalas dos eixos fixas, com o intuito de facilitar a comparação das áreas avaliadas (Figura 13).

Figura 13 - Frequência da quantidade logarítmica dos fungos por grama de solo nas amostras avaliadas de cada usina (de “A” a “L”) indicadas pelas letras

A quantidade relativa de fungos no solo apresentou valores médios entre 10^5 a 10^6 fungos por grama de solo em todas as usinas, porém podemos observar que há a ocorrência de grande variação em algumas usinas, como exemplo temos a usina “I”, que apresentou amostras que variaram de 10^3 a 10^6 fungos por grama de solo. Em contrapartida, em outras áreas as variações foram menores, como no caso da usina “C”, que apresentou uma variação logarítmica de 4,2 a 5,4 fungos por grama de solo.

Além da determinação da quantidade do fragmento alvo, estes dados podem também ser usados para se determinar correlações entre a quantidade de fungos e as variáveis ambientais e de manejo. No presente estudo, a variação na abundância de fungos nos solos apresentou correlações significativas, com $p < 0,01$, com os atributos físico-químicos: pH ($R^2 = 0,039$), H+Al ($R^2=0,041$), P ($R^2=0,043$), areia ($R^2=0,047$), silte ($R^2= 0,037$), argila ($R^2=0,033$) e M.O ($R^2=0,05$), e os atributos de manejo: histórico da área ($R^2=0,032$), adição de vinhaça ($R^2=0,036$) e número de corte da cana ($R^2=0,023$) (Figura 14).

Todas as correlações obtidas foram quadráticas, diferindo na concavidade voltada para baixo (fórmula de regressão com sinal negativo) ou voltada para cima (fórmula de regressão com sinal positivo). Em relação ao pH, a correlação resultou em uma curva com concavidade levemente voltada para cima, indicando que quanto maior o pH maior a quantidade de fungos encontrados no solo. Na literatura, temos que os fungos são comumente encontrados em pH ácidos ou próximos a neutralidade, girando em torno de pH 6 (TRATCH; BETTIOL, 1997; SOUZA et al., 2012), o que nos dá base para inferir que, como os solos estudados estão variando de pH 3,2 a 7,0, valores mais próximos a neutralidade apresentam maiores quantidades de fungos. No caso de valores muito acima de 7,0, pode-se sugerir que haja diminuição nesta quantidade, contradizendo a fórmula determinada em nossa correlação. O inverso ocorre com H+Al, pois este atributo é inversamente proporcional ao pH, resultando, portanto em menor abundância de fungos com o aumento de H+Al no solo.

Para o fósforo (P) temos a indicação de uma faixa ótima para a ocorrência de fungos, sugerida pela observação da linha de correlação com leve aumento na quantidade de fungos no solo até o ponto aproximado de 80 mg dm⁻³. Após esta faixa, temos uma queda na abundância de fungos no solo. Na literatura encontramos inferências sobre redução na colonização de plantas por fungos micorrízicos no solo quando há grande quantidade de fósforo disponível no solo, o que pode ser um dos fatores que justificam este tipo de observação (BAGYARAJ; MENGUE, 1978; SHUKLA et al., 2012).

Para os atributos físicos (areia, silte e argila), temos que a variância das amostras se ajusta sob uma equação quadrática com concavidade para baixo, dando base para sugerir que solos com textura média a arenosa apresentam maior abundância de fungos no solo, enquanto que em áreas muito argilosas, tais grupos ocorrem em menor abundância. Esta diferenciação na abundância de fungos em relação à textura do solo pode estar relacionada ao processo de agregação dos solos, onde ocorre a formação de micro e macro poros, sendo estes últimos locais preferenciais de colonização dos fungos, (RITZ; YOUNG, 2004). Destaca-se ainda, que apenas com base neste parâmetro, pode-se dizer que quanto mais arenoso o solo, maior seria a quantidade de fungos (mais nicho – macro poros). No entanto, o que limita tal correlação linear seria a baixa quantidade de nutrientes e compostos orgânicos, que ocorrem em maior quantidade em solos argilosos, e são essenciais

ao metabolismo dos fungos. Assim, tem-se que a correlação encontrada se adéqua perfeitamente ao funcionamento das células fúngicas dentro do sistema solo.

A curva da quantidade de matéria orgânica é similar a de P no solo, onde ocorre uma faixa ótima entre os valores 18 a 24 g/dm³, porém não foram encontradas na literatura indicações sobre queda na abundância de fungos em função de aumento da quantidade de matéria orgânica no solo. Pode-se indicar que maiores quantidades de matéria orgânica são encontradas em solos mais argilosos, onde há menor abundância de fungos como descrito anteriormente. Também pode-se inferir que grandes quantidades de matéria orgânica podem resultar em elevados teores de ácidos orgânicos, o que acarretaria em redução do pH e consequente queda na quantidade de fungos no solo. Ademais, a presença de grande quantidade de matéria orgânica pode ainda ser fruto de uma baixa quantidade de fungos, o que limita a degradação e ciclagem da mesma no solo analisado.

Os valores de R^2 , por serem baixos, tornam as formulas algébricas criadas na correlação não satisfatórias para utilização em cálculos de estimativa, mas apenas para inferências feitas pelas correlações dos atributos com a abundância de fungos dentro da variação dos dados que foram observados no presente estudo.

Figura 14 - Correlação da abundância de fungos em solos cultivados com cana-de-açúcar, determinada por qPCR, com atributos dos solos analisados que se mostraram significativos ($p < 0,05$)

A curva de histórico de cana na área apresentou duas informações importantes, a primeira foi que a faixa entre 18 e 24 anos de cana está correlacionada com a maior abundância de fungos no solo. E a segunda informação importante é que segundo a curva de tendência temos que quanto mais jovem a área com plantio de cana-de-açúcar, maior a abundância de fungos no solo. O mesmo ocorre com número de cortes, onde é maior a abundância de fungos no solo nas áreas com menor número de cortes na cana.

Como indicado, a correlação de vinhaça foi realizada com valores 1, onde ocorre a adição, e 0, onde não ocorre, e com isso a curva obtida apresentou um leve aumento da abundância de fungos nos solos com o a adição de vinhaça. Portanto, temos que a diferenciação de perfis de fungos pela adição da vinhaça, como antes citado, afetou não apenas a diferenciação de grupos mais também a abundância total de fungos no solo. Estas curvas dão base a novas inferências, que podem ser validadas, por exemplo, em experimentos de microcosmos. Com esta validação, tais dados podem atuar como diretrizes de manejo visando preservar a estrutura de

comunidades microbianas do solo, e prezando por seu funcionamento como um ecossistema.

2.4.7 Mapeamento da diversidade e abundância de fungos nos solos cultivados com cana-de-açúcar do estado de São Paulo

Os valores de diversidade (baseada nos perfis de T-RFLP), e de abundância de fungos (determinados por qPCR) foram correlacionados com as coordenadas geográficas de cada ponto amostrado, com exceção dos pontos da usina “L”, os quais não apresentavam tais dados. Devido à distribuição irregular de pontos e a grande distância entre usinas, os semivariogramas apresentaram uma variação irregular dos pontos amostrados, indicando a necessidade de otimização (Figura 15).

Figura 15 – Semivariograma ajustado das usinas amostradas para as amostras de qPCR (A), e índice de diversidade de Shannon H obtidos por T-RFLP (B), onde cada ponto representa uma usina

Foi realizada a plotagem dos valores de abundância (Figura 16) e diversidade (Figura 17) dos fungos nos solos de cada ponto coletado, e para interpolação dos pontos foi utilizado o método de krigagem. Dentro desta análise, temos que o erro atribuído ao valor de diversidade e abundância foram de $\pm 0,5$ para cada ponto estimado nos mapas pelo método de krigagem.

Figura 16 – Distribuição da abundância de fungos nas usinas do Estado de São Paulo determinada por interpolação krigagem, sendo os círculos com letras indicando a posição próxima das usinas amostradas

Figura 17 - Distribuição da diversidade de fungos nas usinas do Estado de São Paulo determinada por interpolação krigagem, sendo os círculos com letras indicando a posição próxima das usinas amostradas

Nesta análise temos que, apesar da necessidade de melhorar a confiabilidade dos valores extrapolados, a apresentação dos primeiros mapas biogeográficos de solos de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Com ele podemos observar uma tendência de queda na abundância de fungos nas áreas amostradas, enquanto que para a diversidade observa-se mais claramente o zoneamento que ocorre para a área componente deste estudo.

Para observar as variações internas nas comunidades de fungos, foram realizadas interpolações de krigagem para cada usina separadamente (Figuras 18 e 19). Em relação à abundância, é possível verificar que algumas áreas, como a A, B, C, E e I, apresentam uma variação uniforme da distribuição da abundância de fungos, o que pode indicar que os manejos adotados apresentam pequeno efeito sobre esta variável. As demais áreas, como D, F, G, J e K, pode-se observar a formação de manchas de aumento ou redução da abundância de fungos, indicando que manejos e/ou características físicas e químicas específicos de tais talhões podem atuar de forma determinante sobre a abundância de fungos do solo. Um exemplo disso é observado na área da usina “J”, onde ocorre maior abundância de fungos relacionados ao número de corte de cana, de 3 a 4, e maior histórico de cana-de-açúcar na área. Em contraponto temos com menor abundancia de fungos é uma área recém-reformada, portanto com revolvimento de terra.

Figura 18 - Distribuição da abundância dos fungos nas usinas do Estado de São Paulo por interpolação krigagem, para cada usina ("A" à "K") identificadas pelas letras

Figura 19 - Distribuição do índice de diversidade (Shannon) dos fungos nas usinas do Estado de São Paulo por interpolação krigagem, para cada usina (“A” à “K”) identificadas pelas letras

Com relação à diversidade, uma análise similar pode ser realizada (Figura 19). Algumas áreas apresentam variação uniforme na diversidade, enquanto outras apresentam pontos específicos, onde características dos talhões podem determinar a diversidade de fungos. Isto ocorre provavelmente devido a seleção preferencial de determinados grupos fúngicos pelo manejo empregado, o que leva a uma diminuição da diversidade. Neste ponto, pode-se usar como a usina “A”, onde ocorre grande variação das áreas quanto tipos de manejo, destacando adição de vinhaça, torta e carvão, juntamente com a utilização de adubos minerais e queima, e consequentemente atributos químicos, destacando pH, P, Ca e M.O. Porém temos que a mancha vermelha é composta por pontos que se diferenciam dos demais por apresentar textura média, o que já foi considerado como faixa ótima na dinâmica dos grupos de fungos mais frequentes nas amostras avaliadas, e indicado na curva de correlação do qPCR.

2.4.8 Correlação da diversidade e abundância dos fungos do solos de cana-de-açúcar com a produtividade da cana do estado de São Paulo

Na literatura, referências sobre correlações de microrganismos com produtividade são grandemente relacionadas à utilização de isolados que apresentam qualidades na melhoria da produção de plantas, como produção de ácido indol acético (ARAUJO; GUERREIRO, 2010), suprimento nutricional das plantas, ou atuando na defesa da planta contra patógenos, como as algumas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* (LUVIZOTTO et al., 2010). Outras referências relacionam as formas de manejo com a produtividade, como o trabalho de Pinheiro e colaboradores (2010) que relacionou os efeitos da prática de pré-queima com práticas de manejo visando aumento do estoque de carbono, resultando em níveis de produtividade. Porém, não foram encontradas na literatura referências sobre a correlação da diversidade e/ou abundância de fungos no solo com a produtividade desta cultura.

A variação da produtividade nas áreas (Figura 20) demonstra o quão variado são os valores de produtividade mesmo de talhões próximos, como exemplo observado nos talhões da usina “A” onde ocorrem produtividades de 44,6 t/ha até 130 t/há. Outras usinas, no entanto, apresentam produtividade mais uniforme, como por exemplo, a usina “C”, com produtividade de 75,4 t/ha em todos os talhões avaliados.

Figura 20 – Distribuição da produtividade das áreas avaliadas com plantio de cana-de-açúcar, com uma interpolação de quadrado da distância

Com estes valores determinados, temos a possibilidade de avaliar a correlação da produtividade com a abundância de fungos no solo (Figura 21), o que resultou em uma correlação de curva quadrática com concavidade voltada para cima, indicando que apesar de a abundância de fungos no solo se apresentar significativa ($p < 0,05$, $R^2 = 0,02$), isoladamente, esta variável não consegue explicar a variação na produtividade desta cultura. Como exemplo, temos que a faixa de valores próximos a 10^6 fungos por grama de solo se correlaciona com produtividades de 40 t/ha e ao mesmo tempo 150 t/ha.

Figura 21 – Correlação da abundancia de fungos no solo (Log/ g de solo) com a produtividade da cana-de-açúcar das áreas analisadas

Em relação a correlação da produtividade com a diversidade do solo (Figura 22), foi também observada a formação de uma curva quadrática, porém com concavidade para baixo, indicando uma maior produtividade ocorrendo em um determinado nível de diversidade de fungos no solo ($p < 0,05$, $R^2 = 0,023$). Em relação ao valor da correlação, este foi também bastante baixo, indicando que apenas a diversidade de fungos explica pouco a produtividade de cana-de-açúcar. Novamente, observamos que áreas com índice de Shannon entre 3,2 e 3,6 se correlacionam com produtividades entre 40 e 160t/ha.

Figura 22 - Correlação da diversidade de fungos no solo (índice Shannon_H) com a produtividade da cana-de-açúcar das áreas analisadas

Correlacionando os grupos mais frequentes de fungos encontrados no solo de cana, com a produtividade de cana de açúcar de cada talhão (Figura 23), podemos observar que a dinâmica de alguns grupos (133, 53 e 23) apresentaram um aumento com maior produtividade do local, enquanto que outros grupos não apresentaram uma curva resposta significativa, como os grupos 107 e 626. Tais observações sugerem que alguns grupos presentes no solo pouco influenciam a produtividade desta cultura, enquanto outros grupos possuem valores ótimos de ocorrência, sendo em áreas de ocorrência muito alta ou baixa, o desenvolvimento da planta prejudicado. Isto pode ocorrer, por exemplo, devido à indução do desenvolvimento vegetal por números intermediários de abundancia de tais grupos, enquanto que valores baixos prejudicam tal indução, e valores muito altos podem resultar na inibição do desenvolvimento vegetal, por exemplo, atuando como saprófitos.

Figura 23 – Dinâmica dos principais grupos de fungos encontrados no solo de cana-de-açúcar em função da produtividade de cada área avaliada

Podemos observar que o grupo 133 que apresentou maior correlação com a produtividade foi o grupo que apresentou maior resposta a textura média do solo, enquanto que o grupo 23 não apresentou correlação com nenhum atributo abordado na Figura 10. Temos também que o grupo 626, altamente correlacionado com a quantidade de matéria orgânica no solo, não se correlacionou com a produtividade, como apresentado no item 2.4.3. Em seguida, temos a correlação de três variáveis, onde correlacionamos a produtividade com quantidade de argila e matéria orgânica (M.O) juntamente com a variação de abundância e diversidade (Shannon_H) de fungos no solo de cana (Figura 24).

Figura 24 – Correlação da produtividade com argila em função da abundância de fungos (A) e diversidade (B); e com quantidade de matéria orgânica encontrada em função da abundância (C) e diversidade (D) de fungos no solo de cana-de-açúcar

Neste tipo de análise pode-se observar que quantidades médias de argila apresentam maior quantidade de fungos no solo juntamente com uma maior produtividade. Esta variável também está relacionada à maior diversidade de fungos, porém esta não se correlaciona com maior produtividade. No caso da matéria orgânica, temos que um valor mediano também corresponde a maior produtividade, a qual se associa a maior quantidade de fungos no solo, mais não maior diversidade.

Por fim, temos que os dados de tais correlações indicam que a comunidade de fungos é integrante do sistema, e responde por parte do funcionamento do sistema solo, e consequentemente interfere na produtividade agrícola. Este papel

parcial no desenvolvimento da cultura é esperado, e é aqui quantificado pela primeira vez frente a outras variáveis que possuem papel no funcionamento deste ecossistema. Assim, espera-se integrar no futuro o manejo de comunidades de fungos como uma importante variável a ser considerada na produção de cana-de-açúcar.

3 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é pioneiro na avaliação da diversidade de fungos em solos de cultivo de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo de forma conjunta com diversos atributos químicos, físicos e de manejo, correlacionando ainda, a ocorrência de padrões biogeográficos na estruturação de tais comunidades. E com isso temos que os atributos químicos (K e M.O), físicos (silte e argila) e manejo (adubação mineral e vinhaça) atuam como os mais significantes quando comparadas para todas as áreas avaliadas, enquanto que a análise separada de cada região elegeu os atributos químicos (Mg e pH) e de manejo (queima e número de corte) como mais significativos. Além de tais fatores, foi observada uma correlação significativa entre a distância geográfica e a dissimilaridade das comunidades de fungos, sugerindo a ocorrência de distribuição biogeográfica de tais organismos nos solos cultivados com cana-de-açúcar do estado de São Paulo.

Com base em tais resultados, o presente trabalho que tem como primeira hipótese o fato de que atributos físicos, químicos ou de manejo apresentam efeito sobre a diversidade de fungos no solo, mostra a ocorrência de tais fatores. A segunda hipótese, que testa se os efeitos dos atributos suplantam o efeito espacial sobre a comunidade de fungos, mostra-se parcialmente verdadeira, sendo o resultado da estruturação de tais comunidades resultante de um papel conjunto de atributos do solo, estratégias de manejo, e distribuição espacial das amostras analisadas.

Por fim, verifica-se a ocorrência de correlações entre a abundância e a diversidade de fungos com a produtividade desta cultura. Porém, a determinação de valores ótimos destes parâmetros microbiológicos carece de melhor comprovação, uma vez que compõe um sistema mais complexo de variáveis, que conjuntamente respondem pelo desenvolvimento vegetal, e produtividade desta cultura.

REFERÊNCIAS

- ALVEZ, J.L. **Fungos para o controle biológico de *Miconia calvescens* com especial referencia a *Coccidiella miconiae***. 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 769-779, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANGEL, R.; ASAF, L.; RONEN, Z.; NEJIDAT, A. Nitrogen transformations and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in a desert ephemeral stream receiving untreated wastewater. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, n. 1, p.46-58, 2010.
- ARAUJO, F.F.de; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Estatísticas, 2005**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx>>. Acesso em: 15 mar. 2012.
- AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 242-253, 2009.
- BAGYARAJ, D.J.; MENGE, J.A. Interaction between a V.A. mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. **New Phytologist**, Cambridge, v. 80, p. 567-573, 1978.
- BARNETT, M.J.; TOMAN, C.J.; FISHER, R.F.; LONG, S.R. A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote–host interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 47, p. 16636–16641, 2004.
- BHAT, S.H.; DARZI, A.B.; DAR, M.S.; GANAIE, M.M.; BAKHSHI, S.H. Correlation of soil physico-chemical factors with vam fungi distribution under different agroecological conditions. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, London, v. 2, p. 98–107, 2011.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, London, v. 252, p. 139–149, 2003.

BRU, D.; RAMETTE, A.; SABY, N.P.A.; DEQUIEDT, S.; RANJARD, L.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; PHILIPPOT, L. Determinants of the distribution of the nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. **ISME Journal**, New York, v. 5, p. 1-11, 2010.

BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 205-220.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BUÉE, M.; REICH, M.; MURAT, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, Oxford, v. 184, p. 449–56, 2009.

CARSON, J.K.; GONZALEZ-QUIÑONES, V.; MURPHY, D.V.; HINZ, C.; SHAW, J.A.; GLEESON, D.B. Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 12, p. 3936-3942, 2010.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E. **Manual de fisiologia vegetal**. São Paulo: Ceres, 2005. 640 p.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS **Zoneamento cana-de-açúcar, 2009**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 mar.2012.

CHAPARRO, J.M.; SHEFLIN, A.M.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, p. 489–499, 2012.

CHO; J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of edemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1494-1505, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Imprensa/Notícias e Levantamento de Safras, 2010/11**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

DEQUIEDT, S.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; JOLIVET, C.; THIOULOUSE, J.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; BISPO, A.; LEMANCEAU, P.; RANJARD, L. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 641–652, 2011.

DEQUIEDT, S.; THIOULOUSE, J.; JOLIVET, C.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; MARON, P.A.; MARTIN, M.P.; CHEMIDLIN-PRÉVOST-BOURÉ, N.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P.; RANJARD, L. Biogeographical patterns of soil bacterial communities. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 1, p. 251–255, 2009.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, London, v. 336, p. 337-349, 2010.

DRENOVSKY, R.E.; STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; SCOW, K.M. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 27–39, 2010.

EMBRAPA. **Plantio da cana-de-açúcar, 2007**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; DA ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 127-133, 2005.

FASANELLA, C.C.; DIAS, A.C.F.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; SOARES Jr, F.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ELSAS, J.D. ANDREOTE, F.D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p. 4233–4243, 2012.

FEINSTEIN, L.M.; SUL, W.J.; BLACKWOOD, C.B. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 5428-5433, 2009.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities: biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FIERER, N.; JACKSON, J.A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4117-4120, 2005.

FULTHORPE, R.R.; ROESCH, L.F.W.; RIVA, A.; TRIPLETT, E.W. Distantly sampled soils carry few species in common. **ISME Journal**, New York, v. 2, p. 901-910, 2008.

GARBEVA, P.; VEEN, J.A.; ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 42, p. 243-270, 2004.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 113–118, 1993.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 35–43, 2003.

HASSAN, M.N.; AFGHAN, S.; HAFEEZ, F.Y. Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 67, p. 1147–1154, 2011.

HOLST, J.; BRACKIN, R.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Soluble inorganic and organic nitrogen in two Australian soils under sugarcane cultivation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 155, p. 16–26, 2012.

HOSSAIN, Z.; SUGIYAMA, S. Geographical structure of soil microbial communities in northern Japan: effects of distance, land use type and soil properties. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v. 47, p. 88–94, 2010.

HUSSAIN, Q.; LIUA, Y.; JINA, Z.; ZHANGA, A.; PANA, G.; LIA, L.; CROWLEYB, D.; ZHANGA, X.; SONGA, X.; CUI, L. Temporal dynamics of ammonia oxidizer (amoA) and denitrifier (nirK) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 210–218, 2011.

JANGID, K.; WILLIAMS, M.A.; FRANZLUEBBERS, A.J.; SANDERLIN, J.S.; REEVES, J.H.; JENKINS, M.B.; ENDALE, D.M.; COLE,AN, D.C.; WHITMAN, W.B. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2843–2853, 2008.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M. MOREIRA, F.M.S. Canges in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, New York, v.3, p. 1004–1011, 2009.

JOHANSSON, J.F.; PAUL, L.R.; FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 1–13, 2004.

KANEKO, F.H.; TARSITANO, M.A.A.; RAPASSI, R.M.A.R; CHIODEROLI, C.A.; NAKAYAMA, F.T. Análise econômica da produção de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 266–270, 2009.

KIRKET, P.M.; AINSWORTH, G.C. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 3rd ed. Collingwood: CSIRO Publishing, 2008. 612 p.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **ISME Journal**, New York, v. 3, p. 1–8, 2009.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516–4522, 1997.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, I.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 26, p. 1829–1836, 2010.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, E.A.R. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, p. 582-595, 2008.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAHESHKUMAR, K.S.; KRISHNARAJ, P.U.; ALAGAWADI, A.R. Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 76, p. 874–875, 1999.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola, adubos e adubação**. São Paulo, Ceres, 1981. 596 p.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; OVREAS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMARKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MOREIRA, F.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. . Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 59, p. 695–700, 1993.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENLLE, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NAZIR, R; WARMINK, J.A.; BOERSMA, H.; ELSAS, V.; DIRK, J. Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 169-185, 2010.

ODA, Y.; STAR, B.; HUISMAN, L.A.; GOTTSCHAL, J.C.; FORNEY, L.J. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5186-5191, 2003.

PINHEIRO, E.F.; LIMA, E.; CEDDIA, M.B.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.A.; BODDEY, R.M. Impact of pre-harvest burning versus trash conservation on soil carbon and nitrogen stocks on a sugarcane plantation in the Brazilian Atlantic forest region. **Plant and Soil**, London, v. 333, p. 71–80, 2010.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, 2011.

POOLE, E.J.; BENDING, G.D.; WHIPPS, J.M.; READ, D.J. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*–*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. **New Phytologist**, Oxford, v. 151, p. 743–751, 2001.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 197-207, 2007.

RAMOS, A.M.G.; YOSHIOKA, S.A. Bioremediation of herbicide Velpar k® in vitro in aqueous solution with application of (effective microorganisms). **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 55, p. 145–149, 2012.

RANJARD, L.; DEQUIEDT, S.; JOLIVET, C.; SABY, N.P.A.; THIOULOUSE, J.; HARMAND, J.; LOISEL, P.; RAPAPORT, A.; FALL, S.; SIMONET, P.; JOFRE, R.; BOURÉ, N.C.; MARON, P.; MOUGEL, C.; MARTIN, M.P.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P. Biogeography of soil microbial communities: a review and description of the ongoing French national initiative. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 359-365, 2010.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A.; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **ISME Journal**, New York, v. 5, p.1-14, 2010.

REEVE, J.R.; SCHADT, C.W.; CARPENTER-BOGGS, L.; KANG, S.; ZHOU, J.; REGANOLD, J.P. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1-9, 2010.

REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, London, v. 219, p. 153–159, 2000.

RITZ, K.; YOUNG, I. M. Interactions between soil structure and fungi. **Mycologist**, Cambridge, v. 18, p. 52-59, 2004.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequence enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROSSETTO, R. A cana-de-açúcar e a questão ambiental. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 869-882.

ROUSKE, J.; BAATH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1340–1351, 2010.

SANTI FERRARA, F.I.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, London, v. 353, p. 409–417, 2011.

SANTOS, M.; DIÁNEZ, F.; DE CARA, M; TELLO, J.C. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 9040–9043, 2008.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 66, p. 1794–1798, 2007.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T.M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen- fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 130–140, 2008.

SAVARIO, C.F.; HOY, J.W. Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. **Plant and Soil**, London, v. 341, p. 63–73, 2010.

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 45-56.

SHUKLA, A.; KUMAR, A.; JHA, A.; RAO, D.V.N. Phosphorus threshold for arbuscular mycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, p. 109–116, 2011.

SIVAKUMAR, N. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. **Annals of Microbiology**, Milano, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0455-2>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

SOUZA, M.D.; CALDEIRA, S.F.; DORVAL, A. (Hymenoptera: Formicidae) em meio de cultura com diferentes extratos vegetais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 9, p. 1603-1609, 2012.

SRIKUMAR, R.; MURUGAIAN, P.; THANGARAJ, R. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi-associated with sugarcane in of south India, **Agricultural Science Digest**, Karnal, v. 29, p. 19-22, 2009.

STUART, R.M.; ROMÃO, A.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culturable endophytic Wlamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 192, p. 307-313, 2010.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 736-757.

TOLJANDER, J.F.; LINDAHL, B.D.; PAUL, L.R.; ELFSTRAND, M.; FINLAY, R.D. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 295-304, 2007.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782–787, 1990.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 5, p. 240–245, 2002.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 131-1139, 1997.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor sucroenergético: cultivo da cana hoje**, 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

_____. **Setor sucroenergético: mapa da produção**, 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAUL, M.P.; PIERRAT, J.C.; MUSTIN, C.; FREY-KLETT, P. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3019–3027, 2007.

WAKELIN, S.A.; MACDONALD, L.M.; ROGERS, S.L.; GREGG, A.L.; BOLGER, T.P.; BALDOCK, J.A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 803–813, 2008.

- WALKER, C.; VESTBERG, M. Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstensum* and *G. fistulosum*. **Annals of Botany**, London, v. 82, p. 601-624, 1998.
- WEIS, J.H.; TAN, S.S.; MARTIN, B.K.; WITTEWER, C.T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 8, p. 263–264, 1992.
- XIONG, J.; LIU, Y.; LIN, X.; ZHANG, H.; ZENG, J.; HOU, J.; YANG, Y.; YAO, T.; KNIGHT, R.; CHU, H. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 2457-2466, 2012.