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

**A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na
micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum***

Pedro Avelino Maia de Andrade

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

**Piracicaba
2013**

Pedro Avelino Maia de Andrade
Engenheiro Agrônomo

A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum*

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
2013**

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

Andrade, Pedro Avelino Maia de

A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum* / Pedro Avelino Maia de Andrade.- - Piracicaba, 2013.

73 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Diluição para extinção 2. Fungo micorrízico 3. 16S DNAr 4. T-RFLP 5. NGS
I. Título

CDD 633.61
A553c

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

Dedico este trabalho

Aos meus pais Hamilton e Mariza Andrade,

A minha irmã Marina Andrade,

Ao meu filho João Victor de Andrade ,

Vocês são a felicidade que me empurra para o sucesso

E tudo que vivo é por vocês

AGRADECIMENTOS

Deus, por ser sempre o meu guia;

Aos meus familiares Hamilton, Mariza e Marina Andrade por serem exemplo de dedicação, força, competência e perseverança, valores os quais venho aprendendo durante toda a minha vida;

A meu filho João Victor de Andrade, fonte de estímulo para todas as realizações profissionais e pessoais;

Ao "grande" Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pelo apoio, confiança, compreensão, amizade, paciência e conselhos. Além de ter sido um braço de apoio para o desenvolvimento de todo este trabalho;

A "querida" prof(a). Júlia Kuklinsky Sobral, porque é um grande exemplo de pessoa e pesquisadora.

Aos grandes amigos da "CIÊNCIA" Ademir, Diogo e Thiago, Fabio (Dig) e Joelma que juntos compartilharam vários momentos de risadas e discussões, amigos que pretendo levar para a vida toda;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Danizinha, Cris, Juliana, Dorotéia, Luana, Júlia, Emiliana, Danice, Armando, Polé (gordinho p.), Mylenne, Simone, Maryeime, Paulinho, Dani_Bini, Cris Alcantara.

Aos queridos técnicos de Laboratório Denise Mescolotti e Fernando Baldesin, pelo trabalho e apoio em todas as minhas idéias, pessoas indispensáveis no desenvolvimento do meu trabalho;

Aos pesquisadores da Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, em nome do pesquisador Itamar Melo, pelo uso dos equipamentos para realizar as análises de T-RFLP e sequenciamento em larga escala (*IonTorrent*).

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A todos aqueles que de forma direta e indireta me ajudaram no desenvolvimento e/ou compartilharam momentos durante o desenvolvimento deste trabalho;

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO!!

“Loss is nothing else but change, and change is Nature’s delight”

(Marcus Aurelius)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cana-de-açúcar e sustentabilidade ambiental.....	17
2.2 Diversidade microbiana em solos cultivados com cana-de-açúcar.....	19
2.3 Fungos micorrízicosarbusculares (FMA)	21
2.4 Interação entre as plantas, <i>Glomus spp.</i> e a comunidade microbiana do solo	22
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.1.1 Objetivos específicos.....	25
3.2 Hipótese	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Material Vegetal.....	27
4.2 Montagem e amostragem do experimento.....	27
4.3 Análise da física e química do solo.....	28
4.4 Determinação da abundância de esporos e taxa de colonização de <i>Glomusclarum</i> em cana-de-açúcar	28
4.5 Determinação dos parâmetros de desenvolvimento e crescimento de cana-de-açúcar	29
4.6 Análise da comunidade bacteriana	29
4.6.1 Extração do DNA total do solo	30
4.6.2 Caracterização da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP	30
4.6.3 Análise dos perfis de T-RFLP.....	32
4.6.4 Identificação da comunidade bacteriana nos solos por meio de sequenciamento da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Atributos do solo.....	37
5.2 Colonização micorrízica, quantidades de esporos e parâmetros de desenvolvimento da cana-de-açúcar	38
5.2.1 Colonização micorrízica.....	38
5.2.2 Abundância de esporos nos diferentes tratamentos.....	40
5.2.3 Fatores de desenvolvimento da planta.....	42
5.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana no solo durante o período experimental.....	43

5.4 Diversidade bacteriana nos tratamentos	49
5.5 Descrição dos grupos bacterianos relacionados com a alteração na micorrização de cana-de-açúcar por <i>G. clarum</i>	50
5.6 Análise da correlação entre as UTOs e a colonização micorrízica de <i>G. clarum</i> em cana-de-açúcar	55
5.7 Identificação das UTOs correlacionadas com a colonização micorrízica de <i>G. clarum</i> em cana-de-açúcar	59
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64

RESUMO

A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum*

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do sistema agrícola brasileiro, e apresenta-se atualmente em plena expansão. Porém o uso do solo e a implementação de diferentes tecnologias de manejo têm originado alterações no equilíbrio ambiental, onde importantes interações microbianas ocorrem de forma essencial para o desenvolvimento vegetal. Dentre a vasta diversidade de microrganismos do solo, destacam-se os fungos micorrízicos, organismos intimamente associados as raízes das plantas, auxiliando a mesma, dentre outras formas, na obtenção de água e nutrientes. Estes fungos, no entanto, interagem também com outros organismos do solo, como por exemplo, com a comunidade bacteriana presente neste ambiente. Desta forma, o presente trabalho buscou estudar a dinâmica de interação entre cana-de-açúcar e o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *G.clarum* em solos com diferentes composições da comunidade bacteriana. A metodologia utilizada foi a 'diluição para extinção', onde diluições seriadas (10^{-1} ; 10^{-3} ; 10^{-6} e 10^{-9}) de um solo natural foram usadas para inocular o solo estéril. Sobre esta base, foi monitorada pelo período de 60 dias, a colonização da planta pelo FMA e a estruturação das comunidades bacterianas. Como resultado, foi observada uma maior colonização das raízes de cana-de-açúcar para os tratamentos inoculada com menores diluições da comunidade original (solo natural e diluições 10^{-1} e 10^{-3}), sendo da mesma forma observada uma distinção entre as comunidades bacterianas destes tratamentos para os demais. Estabelecendo correlações entre os grupos microbianos e as taxas de colonização micorrízica, foi possível nomear, com base no sequenciamento massivo da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr, a alteração conjunta da micorrização com mudanças nos grupos de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiae* *Acidobacteria*. Concluindo, este trabalho demonstra a dependência que um processo importante, como a micorrização, possui da comunidade bacteriana do solo, e indica que em áreas degradadas, com menores níveis de diversidade bacteriana, tal processo pode ocorrer com menor eficiência.

Palavras-chave: Diluição para extinção; Fungomicorrízico; 16S DNAr; *T-RFLP*; NGS

ABSTRACT

The bacterial community composition of soil as a factor in mycorrhizal sugarcane by *Glomus clarum*

Sugarcane is an important Brazilian agricultural system crop and presents currently booming. Nevertheless, land use, and implementation of different management technologies have originated changes in environmental balance, where important microbial interactions occur as essential for plant development. Among the wide diversity of soil microorganisms, the mycorrhizal fungi is highlighted as organisms closely associated with plant roots, helping plants, in any way, to obtain water and nutrients. These fungi however, also interact with other soil organisms, such as for example, bacterial community in these environments. Thus, the present work aimed to study the dynamics of interaction between sugarcane and arbuscularmycorrhizal fungi (AMF) *Glomusclarum* in soils with different compositions of the bacterial community. The methodology used was “dilution to extinction”, where serial dilutions (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} and 10^{-9}) of a natural soil were used to inoculate a sterile soil. On this basis, were monitored along a period of 60 days, plant colonization by AMF, and structure of bacterial communities. As a result, we observed a higher colonization of roots of cane sugar for treatments inoculated with lower dilutions of the original community (natural soil and dilutions 10^{-1} and 10^{-3}), and likewise observed a distinction between these bacterial communities treatments to others. Establishing correlations between microbial groups with observed rates of colonization, it was possible to name, based on the massive sequencing of the region V6 ribosomal gene 16S rDNA, the joint amendment of mycorrhiza with changes in groups of Actinobacteria; Bacterioidetes; Firmicutes, Proteobacteria; Verrucomicrobia and Acidobacteria. In conclusion, this work demonstrates the dependence of an important process, as the AMF, has to soil bacterial community, and indicates that degraded areas, with lower levels of bacterial diversity, such a process can occur with lower efficiency.

Keywords: Dilution to extinction; Mycorrhizal fungi; 16S rDNA; T-RFLP; NGS

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, sendo esta produção baseada no alto consumo nacional e internacional, seja do produto bruto (biomassa) e/ou de seus principais produtos, o açúcar e o etanol.

Durante as últimas décadas muitas tecnologias têm sido inseridas no processo produtivo da cana-de-açúcar, na busca de atender a alta demanda sem depender de forma exclusiva do incremento na área plantada. Todavia, a necessidade de aumento de produção imediato, promovida pela alteração dos sistemas de produção, como monocultivo, aplicação de pesticidas, fertilização do solo e outras práticas de manejo, podem levar a alterações indesejadas no sistema solo, por exemplo, interferindo na interação entre as plantas e grupos de organismos benéficos do solo. Dessa forma, torna-se tanto quanto importantes, estudos que busquem entender como a microbiota do solo responde às práticas de manejo, e ainda, como grupos microbianos distintos se relacionam, e auxiliam por fim o desenvolvimento vegetal.

Muitos microrganismos são descritos como benéficos às plantas, auxiliando em seu desenvolvimento por indução de resistência contra patógenos e outras condições adversas, ou auxiliando a mesma na obtenção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo. Dentre estes organismos, destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que são descritos como microrganismos capazes de em associação mutualista-simbiótica com a planta, por meio de incremento na superfície radicular, atuar na absorção de altas taxas de fósforo do solo, além de aumentar a absorção de água e outros nutrientes. No entanto, sabe-se que um organismo como este se desenvolvendo no solo, gera novos nichos, ocupados por outros organismos que interagem com o FMA. Assim, é relatada a ocorrência da seleção de grupos microbianos especializados associados aos FMAs, sugerindo também a dependência que tal fungo possui dos demais organismos para seu desenvolvimento no solo.

Dessa forma, este estudo se baseia neste ponto, onde o principal objetivo é descrever a alteração no processo de micorrização de cana-de-açúcar pelo fungo *G. clarum* quando a comunidade bacteriana do solo é alterada. Espera-se com isto, determinar a dependência de tal interação em relação as bactérias do solo, e gerar

bases para outros estudos, que busquem comprovar a ocorrência dos processos aqui observados em condições de campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar e sustentabilidade ambiental

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea semi-perene e tem como características gerais a formação de folhas alongadas, constituindo o porte ereto, com grande capacidade de perfilhamento, e com altura determinada pela limitação no suprimento de água, baixas temperaturas ou ao florescimento (FERNANDES, 1984), sendo que este último é indesejável e reprimido em culturas comerciais (DALRI et al., 2002). Em se tratando de um país tropical úmido, semelhante ao seu centro de origem, esta cultura se adaptou perfeitamente com as condições edafo-climáticas brasileiras (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

Dentro dessa mesma perspectiva, desde que as primeiras variedades chegaram ao Brasil, à cana-de-açúcar tem sido considerada uma das principais culturas agrícolas (BEAUCLAIR, 2008), pois dela são derivados produtos que operam nas cadeias econômica, social e ambiental, marcando ou dando destaque ao potencial produtivo do Brasil (ROSSETO, 2008)

Avaliando um panorama produtivo da safra canavieira durante o período de 1990 até os anos 2012/2013, a cana-de-açúcar foi objeto de profundo investimento, ora por expansão da área cultivada, ora por melhorias na produtividade (controle de pragas e doenças, tratamentos culturais, controle de plantas daninhas e de novas variedades. Segundo dados publicados pela UNICA (União das indústrias de cana-de-açúcar) (2012), a produção brasileira triplicou em 20 anos, passando de 222 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzida em 1990 para cerca de 600 milhões de toneladas em 2012, e com uma previsão de aumento significativo para a safra 2012/2013. Este aumento da produção canavieira está diretamente correlacionado com o processo de exportação de seus principais produtos derivados, etanol e açúcar, gerando cerca de 2 e 10 bilhões de dólares, respectivamente, na safra de 2011/2012.

Apesar dessa crescente produção, o Brasil ainda não pode ser caracterizado como autossuficiente em etanol e açúcar (SATOLO, 2008), pois ainda são importados milhões de litros de etanol e toneladas de açúcar todos os anos, resultando num descasamento estrutural entre oferta e demanda no mercado do

álcool combustível. Isto é consequência da influencia de alguns fatores, dentre os quais, o preço do açúcar e do álcool no mercado externo. Por um lado ocorre excesso de demanda de álcool devido ao elevado preço do petróleo, e por outro excesso de oferta com redução dos preços do açúcar. Contudo, para que o mercado internacional seja consolidado para a produção do álcool, sua produção deve ser realizada em grande escala por diferentes produtores, apenas sob algumas circunstâncias o preço de equilíbrio se manterá estável solucionando assim o impasse desse mercado agrícola (DIAS et al 2002; SATOLO 2008).

Dentro deste panorama, o estado de São Paulo possui a maior capacidade produtiva, com uma área plantada de aproximadamente 4,4 milhões de hectares (51% da área nacional), onde são produzidos 61% do total da produção nacional (CONAB 2012). De acordo com revisão feita pela UNICA (2012), a produção de açúcar e etanol na região de São Paulo apresenta um elevado crescimento, fato este aliado a uma mudança expressiva no processo produtivo, onde foram adotados novos métodos e tecnologias, principalmente atrelados ao processo de mecanização da produção.

Um importante ponto a ser considerado dentro deste cenário está relacionado a manutenção da alta produtividade nas área de cultivo de cana-de-açúcar. Um exemplo disto se dá no uso de herbicidas, onde a mistura dos compostos *triflosufuram* e *ametrin* mostraram-se eficientes no controle de plantas daninhas apenas por um curto período de tempo, além de possuir um efeito cumulativo sobre o desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar (Dias et al., 2005). Num estudo semelhante ,foi observado que apenas uma variedade de cana-de-açúcar é capaz de resistir a aplicação conjunta destes compostos (Ferreira et al 2005). Dessa forma, mesmo que estes autores tenham encontrados alguns resultados positivos para melhoria do manejo de cana-de-açúcar, estas práticas vantajosas podem ter um curto prazo de validade. Este efeito temporal pode estar ligado ao efeito não alvo de tais compostos sobre outros compartimentos do sistema. Por exemplo, foi determinado que o uso persistente de alguns compostos pode levar a alterações na biomassa microbiana do solo, eliminando grupos específicos e importantes nos processos de ciclagem de nutrientes (MONQUERO et al., 2012).

Portanto, estes trabalhos destacam o importante papel da manutenção da diversidade microbiana natural, e a redução dos impactos severos ao ambiente, pois

estes podem vir a afetar não somente os processos de cultivo da cana-de-açúcar, mas também toda a ciclagem de nutrientes, promovida de forma quase exclusiva pela microbiota.

2.2 Diversidade microbiana em solos cultivados com cana-de-açúcar

Os solos são considerados como sistemas dinâmicos, onde aspectos físicos, químicos e biológicos estão em constante interação, dando o suporte básico ao desenvolvimento de um agroecossistema (ANDRADE, et al., 1997; ARTURSSON, et al., 2005). Dentro deste ambiente, os microrganismos são componentes essenciais, atuando na manutenção de ciclos biogeoquímicos, e fornecendo os nutrientes responsáveis pelo desenvolvimento vegetal.

A microbiota do solo compreende uma das principais fontes de diversidade do planeta, representada por seres vivos pertencentes aos três Domínios evolutivos *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. A abundância de microrganismos nos solos é atualmente estimada em aproximadamente 10^9 células por grama de solo, sendo este número distribuído em algo entre 15 e 30 mil diferentes espécies (TORSVIK et al., 1990; ROESCH et al., 2007). Num estudo sobre a diversidade de bactérias em solos de cana-de-açúcar pode-se observar que a comunidade bacteriana associada ao solo adjacente a raiz foi afiliada a onze diferentes filos bacterianos, dentre os quais os mais abundantes foram *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria* (DINI-ANDREOTE et al., 2010).

Contraditoriamente, a vida microbiana dos solos é mais conhecida devido à ocorrência de organismos fitopatogênicos em tal nicho. Porém, estes organismos são uma minoria dentro do universo composto pela diversidade microbiana. Deduz-se desta forma, que a grande maioria dos microrganismos do solo possui papel neutro ou positivo no desenvolvimento das plantas. Tais efeitos benéficos podem ser obtidos por funções diretamente ligadas a esta interação, como a disponibilização de nutrientes às plantas (fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato, etc.), produção de fitormônios, ou por funções diretamente ligadas a tal efeito, como por exemplo, a inibição do desenvolvimento de patógenos e pragas (RONNEY et al., 2009; BRAZ., 2010; KHOKHAR et al., 2011).

Dentro do ambiente solo, algumas regiões são conhecidas por uma mais intensa atividade microbiana, como, por exemplo, a região da rizosfera, definida

como a porção do solo sob influência dos exsudatos de raiz (Artursson, et al., 2006). Nesta região são liberados açúcares de baixo peso molecular, aminoácidos, ácidos orgânicos, dentre outros produtos do metabolismo da planta, tornando este um ambiente propício ao desenvolvimento microbiano, com maior probabilidade de ocorrerem associações simbióticas entre plantas e microrganismos (JOHANSSON et al., 2004; RONNEY et al., 2009;). Uma vez que os tipos de exsudatos são determinantes na composição da comunidade microbiana da rizosfera, pode-se sugerir que plantas diferentes selecionam organismos distintos para viverem em sua rizosfera, sendo estes responsáveis por suprir da melhor forma possível seu desenvolvimento (MENDES et al., 2011). Dentro deste contexto, Pisa et al., (2011) descreveram que associado a rizosfera de cana-de-açúcar sobre diferentes manejo de adubação nitrogenada, apresentam comunidades bacterianas rizosféricas distintas, sendo os grupos mais responsivos os filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*.

Outro ambiente descrito como uma área de intensa atividade microbiana é chamada de micosfera caracterizado não pelo efeito das raízes das plantas, mas sim pelo desenvolvimento de hifas fúngicas (VAN ELSAS & BOERSMA et al., 2011). Lindermann (1998) descreve a região de intersecção entre rizosfera e micosfera como micorrizosfera, onde há a interação entre os exsudatos de raízes, a presença de hifas, e a colonização por bactérias selecionadas em tal ambiente. Dentre os fungos presentes no solo, destaca-se a micosfera de fungos micorrízicos arbusculares, que possuem importante papel no desenvolvimento das plantas.

Bactérias e fungos no solo, quando formam associações simbióticas com raízes de plantas, desenvolvem ações semelhantes através de mecanismo de promoção de crescimento vegetal. Por mais que esses mecanismos tenham sido descritos separadamente (ROSSETO, 2008; BERBARA et al 2006), sugere-se que na verdade ocorre grande efeito sinérgico das distintas interações entre estes três grupos (plantas, bactérias e fungos micorrízicos) (JOHANSSON et al 2004; ARTHURSSON et al 2006).

Apesar da pouca informação sobre os mecanismos de interação bactéria e FMAs em associação a plantas, algumas bactérias têm sido caracterizadas por afetar diretamente a germinação e a taxa de crescimento de esporos de fungos micorrízicos (MOSSE, 1959; DANIELS; TRAPPE, 1980; MAYO et al., 1986;

CARPENTER-BOGGs, *et al.*, 1995). Resultados apresentados por Xavier & Germida (2003) indicam que as MHB “*mycorrhiza helper bacteria*” (GARBAYE, 1994) atuam na germinação de esporos devido à produção de determinados compostos. Outras bactérias podem afetar diretamente a fisiologia das plantas, por exemplo, aumentando a permeabilidade da célula facilitando a interação dos fungos micorrízicos (VIVAS *et al.*, 2003). Reis *et al.* (1999), avaliando a ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados com cana-de-açúcar sob diferentes tipos de manejo, observaram taxas de colonização das plantas entre 70% a 96% para *Glomus sp.*, e de 4 a 30% para *Gigaspora sp.*, além de observar as hifas associadas com a bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus*, que possivelmente auxiliaria o fungo na obtenção de nitrogênio.

Em relação às interações entre bactérias e fungos no solo, estudos tem mostrado um nível de especificidade entre bactérias e FMAs, de tal forma que essas bactérias respondem a estímulos oriundos da presença desses fungos durante a colonização das plantas (ANDRADE *et al.*, 1997; ARTURSSON *et al.*, 2005; PIVATO *et al.*, 2009). Dessa forma, torna-se bastante atrativa a descrição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares em cana-de-açúcar juntamente com a descrição da comunidade bacteriana que coloniza os ambientes micosféricos originados desta interação.

2.3 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos arbusculares são organismos eucarióticos pertencentes ao filo *Glomeromycota*, ordem *Glomales*, e caracterizados como biotróficos obrigatórios por dependerem de um hospedeiro para obter carboidratos, sendo, portanto não cultiváveis na ausência da planta (JOHANSSON, *et al.*, 2004).

Os FMAs são extremamente importantes no sistema solo-planta, uma vez que esses fungos encontram-se interagindo intimamente com uma grande diversidade de plantas. Os FMAs formam simbiose mutualística, denominada de micorriza arbuscular (MA) (DE SOUZA *et al.*, 2007), a qual é considerada uma das associações mais remotas de microrganismos com plantas o que resulta em sua ampla ocorrência e diversidade, podendo ocorrer em mais de 80% das plantas (SIMITH e READ., 1997), Segundo Berbara *et al.*, (2006) essa interação é

datada de 400 milhões de anos e foi um dos principais motivos da migração das plantas para os ambientes terrestres (BONFANTE E GENRE., 2008).

Nessa simbiose, a planta supre o fungo com energia suficiente para crescimento e reprodução via fotossintatos, e o fungo provê a planta com uma gama de funções, baseadas principalmente com o aumento da área radicular, auxiliando a planta na obtenção de nutrientes e água, e protegendo a mesma contra patógenos e pragas (JEFFRIES, et al., 2003; BERBARA, DE SOUZA, e FONSECA, 2006; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; DE SOUZA et al., 2007). Esta interação aumenta e otimiza a ciclagem de nutrientes no solo, contribuindo assim para aumento dos estoques de carbono (RILLIG, et al., 2001) e biomassa microbiana nos solos (MASCHNER, et al., 2001), auxiliando na formação e estabilidade de agregados do solo pela ação física do micélio e pela ação de uma glicoproteína denominada glomalina (WRIGHT e UPADHYAYA, 1996, 1998; RILLIG e MUMMEY, 2006). Rilliget al. (2004) descreveram os fungos micorrízicos como importantes organismos na redução da emissão de CO₂ do solo, pois quando ocorre a exsudação de glomalina no solo, esta tende a aumentar a agregação no solo e isto tende a proteger a matéria orgânica, tornando mais recalcitrante sua decomposição pela comunidade microbiana do solo.

Dentro dos grupos de fungos micorrízicos arbusculares, o gênero *Glomus* é descrito como um dos mais abundantes em associação com cana-de-açúcar (ANDREOLA, 1981). Em um estudo recente Datta, et al., (2012) descreveram a diversidade esporos de fungos micorrízicos arbusculares associados a rizosfera de 41 variedades de cana de açúcar, dando origem ao seguinte ranqueamento: 75,39% pertenciam ao gênero *Glomus*, 8,52% *Acaulospora*, 8,47% *Scutellospora*, 5,83% *Gigasporae* 1,69% *Sclerocystis*.

2.4 Interação entre as plantas, *Glomus spp.* e a comunidade microbiana do solo

Apesar das funções importantes relacionadas à simbiose micorrízica arbuscular, ainda sabe-se, comparativamente, pouco sobre a interação dos FMA com outros microrganismos do solo (HODGE E FITTER, 2010). Na rizosfera, onde pode-se encontrar rizobactérias (*PGPRs*), tem sido estudado extensivamente a interação tríplice entre as plantas, os FMA e bactérias abundantes do solo

(ARTURSSON et al, 2006; FREY-KLETT et al., 2007). Neste contexto, Khotariet al. (1990) observaram que plantas de milho (*Zea mays* L. cv. Tau) inoculadas com fungos micorrízicos do gênero *Glomus* eram menos susceptíveis a intoxicação por elevadas concentrações de Mn no solo. Ainda, os autores indicam que essa alta resistência está associada à seleção de microrganismos oxidadores de Mn na micorrizosfera. Neste mesmo contexto, Andrade,et al., (1997), estudando a diversidade de microrganismos associados a rizosfera e micosfera de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), sugerem que a colonização das raízes por fungos micorrízicos do gênero *Glomus* altera o perfil de exsudatos das plantas, causando efeitos qualitativos na seleção de grupos importantes para o desenvolvimento da planta. Veresoglou,et al., (2012) descreveram que a colonização do fungo micorrízico tem um efeito característico sobre comunidades microbianas relacionadas a processos de ciclagem de nutrientes, como por exemplo o nitrogênio. Outros trabalhos atuam na mesma temática, indicando as diferentes alterações causadas pela presença de tal interação (JOHANSSON et al., 1992; OLSSON e JOHNSON., 2005; HOOKER et al., 2007; RILLIG e MUMMEY., 2006). Portanto, existem grupos microbianos que são modulados pelo FMA, desenvolvendo interações de competição ou mutualismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes e exsudatos radiculares (NUCCIO et al., 2013).

Todavia, a maior parte dos trabalhos descrevendo a associação entre plantas, fungos micorrízicos e a comunidade bacteriana tem descrito o papel desses fungos micorrízicos sobre a comunidade microbiana. Contudo, não foram encontrados trabalhos científicos, os quais pudessem descrever a importância de certos grupos bacterianos no processo de aumento de colonização das raízes da planta, sugerindo que além dos principais grupos bacterianos que estão associados à dinâmica de sinergismo para benefício da planta, que de acordo com a literatura sempre estão associados a hifas de fungos micorrízicos, existe uma dinâmica de populações bacterianas com respostas positivas e negativas quanto ao aumento da colonização de *Glomus* spp.

Portanto o presente, trabalho vêm a descrever a íntima associação entre a planta cana-de-açúcar, o fungo *Glomus clarum* e a comunidade bacteriana associada, demonstrando a importância da manutenção da diversidade dos solos

para o eficiente funcionamento do sistema de colonização micorrízica, forte aliado ao desenvolvimento vegetal.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a dinâmica de colonização micorrízica do fungo *G. clarum* em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solos com diferentes composições da comunidade bacteriana.

3.1.1 Objetivos específicos

- Montar microcosmos de solos com diferentes comunidades bacterianas, obtidas por meio da aplicação da metodologia ‘diluição para extinção’;
- Avaliar a colonização do fungo micorrízico arbuscular *G. clarum* em plantas de cana-de-açúcar cultivadas nestes diferentes solos;
- Determinar a alteração nas comunidades bacterianas com base em análises dependentes de cultivo (T-RFLP e seqüenciamento da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr);
- Estabelecer os principais grupos relacionados à variação na colonização das plantas pelo FMA.

3.2 Hipótese

O presente trabalho teve como hipótese o fato de que a colonização micorrízica do fungo *G. clarum* em cana-de-açúcar é dependente da composição da comunidade bacteriana do solo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar pertencentes à variedade RB 86-7515. As plantas foram obtidas no campo experimental da Fazenda Areião da ESALQ/USP (Lat. 22°41'37.70" Long. 47°38'28.58" elev 552 m). Após serem coletadas, as plantas foram cortadas em seções com gemas únicas (aproximadamente 5 cm de comprimento), as quais foram submetidas a uma esterilização superficial segundo o protocolo sugerido por Kuklinsky, et al., (2004). Basicamente, este material foi submetido à lavagem em água corrente, seguida de imersão em álcool etílico 70% por 1 min, cloro ativo 2% (v/v) por 3 min, lavagem com álcool etílico 70% por 1 min, e três lavagens em água destilada esterilizada. Em sequência, os fragmentos de colmo contendo as gemas únicas foram colocados em bandejas germinativas e levados para câmara de germinação (UR 65%; Tm=25°C; 12 hrs luz), onde permaneceram por 30 dias. Concluído esse processo, plântulas com altura aproximada de 20 cm foram levadas para casa de vegetação.

4.2 Montagem e amostragem do experimento

O experimento foi montado num solo argiloso, cujas características físicas e químicas estão descritas na tabela 2. Parte deste solo foi submetida a três autolavagens de 120 minutos a 120°C e 1atm de pressão, visando a total esterilização destes solo. Na montagem do experimento, amostras do solo foram acomodadas em vasos limpos e esterilizados com capacidade total de 1,5 kg de solo.

Os vasos foram então, usados no preparo dos solos com diferentes valores de diluições do solo natural. Para tanto, foi feita uma diluição seriada a partir de uma amostra não esterilizada do mesmo solo. As diluições de tal suspensão (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) foram usadas na inoculação do solo esterilizado, seguindo a metodologia de 'diluição para extinção', já descrita na literatura (WERTZ et al (2006) e VAN ELSAS et al 2012). Além dos tratamentos com diferentes diluições, foram também usados tratamentos controles, sendo estes compostos pelo solo natural (NS) ou apenas pelo solo esterilizado (SS). O preparo dos microcosmos foi então finalizado com a adição das plântulas de cana-de-açúcar e a adição das diluições do solo em

cada vaso. Após o preparo dos microcosmos com diferentes níveis de diversidade microbiana, estes foram mantidos em casa-de-vegetação por 15 dias, após os quais, foram adicionados, próximo a raiz, 200 esporos limpos e sadios do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, oriundos da coleção de esporos de FMAs do laboratório de Microbiologia do solo, Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP.

Durante o período experimental, a estrutura da comunidade bacteriana foi monitorada nos períodos de 0, 5, 15, 30 e 60 dias após a inoculação dos solos. Nas amostragens de 30 e 60 dias foram também realizadas coletas destrutivas das plantas, usadas para determinação da colonização radicular pelo FMA, abundância de esporos em 100g de solo, altura da planta, matéria seca da parte aérea, comprimento de raiz e matéria seca da raiz.

4.3 Análise da física e química do solo

As análises físicas e químicas do solo foram realizadas no laboratório de análises de solos do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP. As características foram determinados para os solos, natural e esterilizado, utilizados na montagem do experimento. Os parâmetros analisados foram: areia total, silte e argila; pH em CaCl_2 , matéria orgânica, fósforo, K, Ca, Mg, H+Al e os cálculos SB, CTC e V%.

4.4 Determinação da abundância de esporos e taxa de colonização de

***Glomusclarum* em cana-de-açúcar**

A determinação da quantidade de esporos nas amostras de solo coletadas aos 30 e 60 dias foi realizada de acordo com uma metodologia de extração de esporos do solo descrita por Gerdemann & Nicolson (1963). Resumidamente, 100g de solo foram submetidas a uma quebra física dos agregados do solo (liquidificador), e posteriormente submetidas a duas peneiras de espessura diferentes (71 mm e 53mm). O material retido na peneira de 53 mm foi adicionado a 20% do volume de sacarose 70% (p/v), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. Após isto, o sobrenadante obtido foi submetido a lavagens com água destilada esterilizada, dando origem a suspensões contendo os esporos do fungo micorrízico.

Tais suspensões foram colocadas em placas caneladas, onde foram realizadas as contagens dos esporos de *G. clarum*.

A determinação das taxas de colonização de cana-de-açúcar foi realizada por meio da coloração e análise das raízes como descrito por Vierheilig et al (1998). Neste procedimento aproximadamente 2,0 g de raízes foram imersas em solução de hidróxido de potássio (KOH) 10% por 24 h, propiciando a dissolução das moléculas mais complexas como lignina, clareando as raízes. Após este período, foi promovida a substituição do KOH por H₂O₂ (10 volumes) durante 10 segundos, e posteriormente adicionada solução de trypano azul 5% em lactoglicerol em banho-maria a 90°C por 1 minuto.

Após a coloração das raízes, houve uma avaliação quantitativa da porcentagem de colonização micorrízica (PCM) através do método de intersecção das linhas de grid descrito por Giovanetti e Mosse (1980). Nesta análise, fragmentos de raízes de cerca de 1 cm de comprimento foram observados. Em cada amostra, um total de 100 intersecções do grid foi avaliado, e a quantidade de observações de raízes colonizadas (presença de arbúsculos ou vesículas) foi determinada, dando origem ao valor de PCM da amostra.

4.5 Determinação dos parâmetros de desenvolvimento e crescimento de cana-de-açúcar

Os parâmetros avaliados referentes ao desenvolvimento vegetal foram, o comprimento da raiz, a matéria seca da raiz.

Na determinação do comprimento da raiz, as medidas foram feitas com auxílio de uma fita métrica desde a inserção no colmo germinativo até o ponto mais profundo, respectivamente. Para determinação da quantidade de matéria seca, a raiz foram separadas e acondicionadas em sacos de papel. Estes materiais foram então acondicionados em estufa de circulação ar forçada a uma temperatura de 65°C, e sua massa foi monitorada até atingir valores constantes.

4.6 Análise da comunidade bacteriana

As comunidades de bactérias presentes nos solos dos diferentes tratamentos foram avaliadas ao longo do experimento, em todos os tratamentos, por meio de métodos independentes de cultivo. Foi determinada a estrutura da comunidade

bacteriana dos microcosmos através da técnica de (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos da região terminal) T-RFLP e sequenciamento em larga escala da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr.

4.6.1 Extração do DNA total do solo

Para extração do DNA total do solo, foram realizadas amostragens de 400mg de solo referente a cada repetição. Estas amostras foram então submetidas à extração do DNA por meio do kit *PowerSoil DNA Isolation kit* (MoBio, Carlsbad, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Seguidamente, a eficiência da extração foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5µl do DNA extraído junto a 3µl de um tampão de corrida *Loading buffer 6x* (Azul de bromofenol 0,05% (p/v); Sacarose 40% (p/v); EDTA 0,1M (pH 8,0); SDS 0,025% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta (*DNrBio-imaging Systems Minibis pro 16mm*). Em média, as extrações resultaram numa quantidade de 50ng de DNA por microlitro (total da extração de 100µL).

4.6.2 Caracterização da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP

Na técnica de *T-RFLP*, o DNA total extraído do solo foi submetido à amplificação com os primers específicos para a região da subunidade menor do gene 16S DNAr (*8fm* e *926R*), especificamente usado para acessar o grupo das bactérias (Tabela 1).

As condições da *PCR* (*Polimerase Chain Reaction*) para amplificação do fragmento do gene 16S DNAr foram realizadas segundo Schütte et al (2009), em reações contendo 1 µl da suspensão de DNA (aprox. 50ng), 3,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 0,20 pmol dos primers (*8fm* e *926R*) PCR buffer 1X e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, sendo o volume completado com água ultra-pura autoclavada, num total de 50 µl. As condições de amplificação foram: 95°C por 4 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos; 57°C por 30 segundos; 72°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Ao final da etapa de amplificação, as amostras foram purificadas em placa de 96 poços (MicroAmp, AppliedBiosystems), adicionando-se as reações 200µl de isopropanol 100%, seguido de incubação por 2 horas a temperatura de -20°C. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4.500 rpm por 90 minutos, descarte de sobrenadante, spin com a placa invertida, adição de 250 µl de etanol absoluto, centrifugação à 4.500 rpm por 1 hora e 30 minutos, spin com a placa invertida, descarte de sobrenadante e secagem das placas à 45°C por 15 minutos. O produto purificado foi então ressuspendido em 50µL de água esterilizada e quantificado em gel de agarose 1,5%.

Tabela 1 – Primers usados nas reações de amplificação dos fragmentos do gene 16S rDNA, (T-RFLP; IonTorrent).

Primer	Região-Alvo	Sequência	Técnica	Referência
8fm	<i>Bacteria</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>T-RFLP</i>	Schütte, et al., (2009)
926R	<i>Bacteria</i>	CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT	<i>T-RFLP</i>	Schütte, et al., (2009)
A-967F	<i>Bacteria</i>	CAACGCGAAGAACCTTACC	<i>IonTorrent</i>	Sogin, et al., (2006)
B-1046R	<i>Bacteria</i>	CGACAGCCATGCANACCT	<i>IonTorrent</i>	Sogin, et al., (2006)

Os produtos de amplificação foram então submetidos a clivagem com 5U da endonucleases *HhaI*, sendo após isto repetido o procedimento de purificação. O material precipitado final (após etanol) foi então ressuspendido em formamida HiDi. Este material foi então analisado em sequenciador automático ABI Life 3500 (AppliedBiosystems), utilizando matriz azul e o marcador padrão LIZ 600.

4.6.3 Análise dos perfis de T-RFLP

As leituras dos eletroferogramas foram realizadas pelo programa Gene Mapper® 4.1, resultando em picos, dos quais foram considerados tamanho, altura e área, sendo tais valores ajustados com o padrão *GS600LIZ*, e diferenciados ao nível de 0,5 par de base. Contudo, a extração dos dados do *T-RFLP* gerou uma matriz de 87 amostras com conjuntos de quantidade e abundância de fragmentos de restrição terminais (*TRFs*) descrevendo os grupos de bactérias que compunham cada amostra de solo. Para caracterizar as variações entre os perfis de grupos bacterianos de cada amostra, para os tempos avaliados e os tratamentos, os dados da matriz de *TRFs*, foram transformados em Log (C+1) e submetido a uma análise de coordenadas principais (*PCoA*), objetivando observar a dissimilaridade dos perfis bacterianos das amostras (RAMETTE, et al., 2007), segundo o algoritmo de Bray-Curtis. Primeiramente, foi realizada uma *PCoA*, para observar a separação dos perfis bacterianos de acordo com os tempos avaliados; e posteriormente foram realizadas análises de *PCoA* específicas para cada tempo amostral (0, 5, 15, 30 e 60 dias), para descrever a dinâmica dos grupos bacterianos de acordo com cada tratamento (NS, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} e SS).

Associado às análises de componentes principais, foram realizadas análises de similaridades (ANOSIM), um teste não paramétrico, para observar diferenças significativas entre dois ou mais grupos, obtendo um R estatístico significativo para

qualquer medida de distância (CLARKE, 1993). A comparação entre as comunidades resultam em valores de R estatístico, onde $R=1$ indica que existe separação entre as estruturas das comunidades analisadas e $R=0$ não ocorre separação dos perfis. Ainda assim, valores de R maiores que 0,75 são interpretados como bem separados, valores menores que 0,75 e maiores que 0,5, são interpretados como separados, porém com sobreposição entre os perfis e valores de R menores que 0,5 como não separados (CLARKE & GORLEY, 2001). Estas análises foram utilizadas para identificação mais clara e objetiva da separação das estruturas das comunidades observadas nas análises de coordenadas principais (KENT, et al., 2007).

Também, associado às análises atribuídas aos tratamentos experimentais do período de 60 dias, foi realizado um teste de dissimilaridade de SIMPER, utilizando o software *PAST* (HAMMER, et al., 2001). Esse teste, é baseado na dissimilaridade dos agrupamentos formados na análise de coordenadas principais (PCoA) e nos valores de R da análise de similaridade (ANOSIM), de tal forma que o teste revela quais os principais TRF's ou grupos bacterianos que contribuem para a separação observada entre os grupos de amostras (CLARKE, 1993).

A tabela de TRFs gerada foi submetida ao teste de SIMPER, para seleção dos picos mais responsivos para separação dos agrupamentos das amostras (NS, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} e SS). Posteriormente foi realizado um teste de correlação (RDA), utilizando o software *CANOCO*. Os 22 TRFs com maior contribuição para a dissimilaridade dos perfis e os dados de porcentagem de colonização foram correlacionados através do teste de Monte Carlo com 499 permutações. Para caracterizar a resposta de cada pico com o aumento da colonização, os dados da correlação foram plotados num diagrama de curva resposta, desenhado com base num modelo de resposta quadrática com distribuição normal (Gaussian).

4.6.4 Identificação da comunidade bacteriana nos solos por meio de sequenciamento da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr

A amplificação da região V6 do gene 16S rRNA de bactérias foi realizada por PCR a partir de 23 amostras. Os DNAs extraídos de tais amostras foram submetidos à amplificação com os primers 967f e 1046r (SOGIN, et al., 2006) (Tabela 1), adicionados dos adaptadores para sequenciamento no equipamento *IonTorrent*

Personal Genome Machine (Life Technologies, EUA). Além disso, o primer 967f recebeu marcações distintas (*tags* de identificação de 5 pares de bases) para cada uma das amostras analisadas.

As condições de amplificação foram determinadas para reações de volume final de 50 µl, compostas por 1X Tampão de PCR, 3mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 0,02 U/µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil). Após amplificação, as amostras foram purificadas com o *kit* ChargeSwitchPCRClean-UP (Invitrogen, Brasil), e posteriormente enviadas para seqüenciamento no equipamento IonTorrent (Life Technologies, EUA), realizado pela equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP).

Os dados oriundos do seqüenciamento foram analisados utilizando inicialmente o programa *CLC Genomics Workbench (CLCbio)*, onde as seqüências obtidas foram separadas por amostras, de acordo com seus barcodes, seguido da retirada de seus adaptadores e respectivos barcodes, restando apenas as seqüências com os seus *primers*. Em seguida, toda a análise foi feita utilizando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPOROSO et. al., 2010). Utilizando-se o comando *pick_otus.py*, as sequencias foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), a um valor de 97% de similaridade, pelo método *uclust*. O comando seguinte, *pick_rep_set.py*, teve como objetivo separar uma única seqüência como representante de cada uma das UTOs previamente estabelecidas anteriormente, diminuindo o número de seqüências e facilitando o processo de alinhamento feito pelo comando *align_seqs.py*, pela metodologia *PYNAST*. Em seguida, a classificação taxonômica foi feita pelo comando *assing_taxonomy.py* utilizando o método *Blast*, e o banco de dados do *Greengenes* chamado *CaporosoReferenceOtu's* (http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/). Para obter uma tabela dessas OTUs, foi utilizado o comando *make_otu_table.py*. Os gráficos e tabelas de classificações taxonômicas foram obtidos utilizando o comando *summarize_taxa_through_plots.py*. Por último, para gerar histogramas que representam as distâncias entre as amostras foi utilizado o comando *make_distances_histograms.py*.

A tabela de UTOs gerada foi submetida ao teste de SIMPER, seleção das UTOs mais responsivas para separação dos agrupamentos das amostras (NS, 10⁻¹,

(10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} e SS). Posteriormente foi realizado um teste de correlação (*RDA*), utilizando o software *CANOCO*. As UTOs com maior contribuição para a dissimilaridades dos perfis e os dados de porcentagem de colonização foram correlacionados através do teste de Monte Carlo com 499 permutações, tal como, foi realizado para o teste com o perfil de *TRF's*, também já descrito acima. Para caracterizar qual a dinâmica de cada OTU usada, se apresentaram resposta positiva ou negativa no sistema de aumento de colonização. Os dados da correlação foram plotados num diagrama de curva resposta, descrito num modelo de resposta quadrática baseada numa distribuição de Gaussian. Para este teste, foram utilizados os programa *PAST* e *CANOCO*, semelhante metodologia utilizada para os dados oriundos da técnica de *T-RFLP*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atributos do solo

Os resultados obtidos com as primeiras análises dos atributos físicos e químicos do solo são demonstrados na tabela 1. De forma geral, não se observam grandes alterações nos parâmetros avaliados devido ao processo de autoclavagem do solo. Dentre os parâmetros determinados, a única alteração que aponta um possível efeito de tal procedimento é a relacionada ao pH do solo, com valor de 5,8 no solo original, e 6,3 no solo após a autoclavagem. Ainda, pode-se sugerir que esta variação pequena (0,5 pontos) não apresenta grandes efeitos na estruturação das comunidades bacterianas, sendo, portanto os efeitos posteriormente discutidos, derivados de outros fatores moduladores de tais organismos.

Tabela 2 -Determinação dos atributos físicos e químicos do solo não estéril (SN) e solo estéril (SA)

<i>Atributos químicos (Determinações)</i>		<i>Solo Natural (SN)</i>	<i>Solo Autoclavado (SA)</i>
<u>Argila</u>	<i>g.kg⁻¹</i>	585	534
<u>Silte</u>	<i>g.kg⁻¹</i>	118	141
<u>Areia</u>	<i>g.kg⁻¹</i>	297	326
<u>pH</u>		5,8	6,3
<u>P</u>	<i>mg.dm⁻³</i>	23	25
<u>K</u>	<i>mmol_c. Dm⁻³</i>	3,1	5,3
<u>Ca</u>	<i>mmol_c. dm⁻³</i>	87	89
<u>Mg</u>	<i>mmol_c. Dm⁻³</i>	32	31
<u>H+Al</u>	<i>mmol_c. Dm⁻³</i>	16	16
<u>SB</u>	<i>mmol_c. Dm⁻³</i>	121,7	125
<u>CTC</u>	<i>mmol_c. Dm⁻³</i>	141,4	138,1
<u>V</u>	<i>%</i>	138,1	141,4

Métodos de extração: pH em CaCl₂; P, K, Ca, Mg- Resina trocadora de íons; H+Al- pH em SMP.

Alguns trabalhos relacionam a variação de alguns atributos químicos do solo com a diversidade microbiana associada à micosfera, e mostram valores semelhantes aos descritos no presente trabalho como favoráveis a dinâmica de fungos micorrízicos a cana-de-açúcar no solo. Kelly et al (2001), utilizando diferentes

doses de P no solo, descreveram que quando este elemento ocorre em doses baixas no solo, a dinâmica de colonização micorrízica em cana-de-açúcar é promovida, principalmente influenciada pela tipo da planta. Neste mesmo contexto, Bressan, et al.(2001), estudando a dinâmica de associação de fungos micorrízicos inoculados em microcosmos com cana-de-açúcar, observaram que em doses de P disponível semelhantes as descritas no presente trabalho, ocorre uma tendência ao favorecimento de maior taxa de colonização das raízes da planta por fungos do gênero *Glomus clarum*. Outros trabalhos comentam a associação entre a presença do fungo micorrízico e a seleção da comunidade microbiana específica, sendo esta interação também influenciada por um conjunto de variáveis, como P no solo, genótipo da planta e espécie do fungo (REIS et al 1999). Em relação ao pH, alguns estudos demonstram que a baixa variação do pH, 0,5-1,0 unidade, não leva a efeitos observáveis na composição da comunidade bacteriana dos solos (ROUSK et al 2010) Portanto, os resultados das análises observadas neste estudos indicam que as condições do solo usado se assemelham as encontradas em outros estudos, validando as análises realizadas e sugerindo que todas as variações observadas nos microcosmos durante o período experimental foram oriundas de processos microbiológicos.

5.2 Colonização micorrízica, quantidades de esporos e parâmetros de desenvolvimento da cana-de-açúcar

5.2.1 Colonização micorrízica

Alguns autores observaram que as diferentes espécies de plantas possuem diferentes níveis de dependência micotrófica da associação micorrízica (DELAUX et al 2013). A cana-de-açúcar apresenta uma menor dependência da micorrização por *G. clarum* do que plantas de milho e a soja (KELLY et al 2001). Em análises de plantas em campo, são descritos valores de colonização micorrízica por *G. clarum* que variam entre 20 a 60% (GIOVANNETTI et al 1980; REIS et al 1990; KELLY et al 2001), sendo tal variação dependente das condições do manejo da cultura. Em vista disso, os dados encontrados na literatura corroboram e validam os dados apresentados neste trabalho, onde os valores variaram entre 0 e 27%.

Os dados de colonização micorrízica das plantas de cana-de-açúcar foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) apresentando ($p = 0,015$), seguida de uma comparação de médias pelo teste de Tukey, o qual apresentou para comparação significativa ($p < 0,05$), de acordo com o consenso, representada por letras (Figura 1). Desta forma, as análises permitiram observar, que para o período de 30 dias, não ocorreram diferenças entre os tratamentos, ou seja, a variação dos dados foi baixa para explicar algum efeito característico dos tratamentos. No entanto, após 60 dias pode-se observar que houve um aumento expressivo na colonização micorrízica, sendo este aumento diferencialmente observado entre os tratamentos. Os resultados da análise variância para o tempo de 60 dias revelaram que os tratamentos com maior diversidade microbiana (NS, 10^{-1} e 10^{-3}) apresentaram maior colonização micorrízica do que os tratamentos com a menor diversidade microbiana (10^{-6} , 10^{-9} e SS).

Os dados apresentados neste trabalho indicam que a ocorrência de um aumento da colonização das raízes da cana-de-açúcar em solos com microbiota mais 'preservada' em relação a natural, sendo tal efeito observado com mais clareza nas amostras analisadas 60 dias após a montagem do experimento. Isto pode ser devido à necessidade de um período de adaptação ou estabilização da comunidade bacteriana (VAN ELSAS et al 2012). Estes resultados também demonstram que a dinâmica de colonização fungo micorrízico-planta é um fator que possui íntima relação com a diversidade microbiana do solo. Alguns autores, estudando a dinâmica de colonização em plantas micorrizadas e não micorrizadas em campo observaram que a micosfera de plantas que apresentaram maior taxa de colonização por fungos do gênero *Glomus*, sempre estavam associados a grupos bacterianos específicos, por exemplo, *Acetobacter diazotrophicus* (REIS et al 2001), rizóbios (BURITY et al 1999) *Pseudomonas* e *Arthrobacter* (ANDRADE et al 1997). Estes grupos bacterianos são comumente caracterizados como microrganismos fixadores de nitrogênio (PAULA et al 1990) ou solubilizadores de fosfato (VERMA et al 2001), e quando associados a micorrizosfera, tendem a auxiliar o fungo micorrízico no aporte de nutrientes para a planta (JOHANSSON et al 2004). Muitos autores descrevem esses microrganismos associam-se como bactérias que auxiliam a micorriza (*MHB*), tanto simbioticamente, na qual sempre estão associados ao

fungos, ou de vida livre, que auxiliam o fungo micorrízico de forma sinérgica (GARBAYE, 1994; BIANCIOTTO et al 2004).

Figura 1 -Taxa de colonização micorrízica (%) para os dois períodos amostrais 30 e 60 dias.. O eixo (X) representa os tratamentos com diferentes cargas microbianas (NS, 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁶, 10⁻⁹ e SS). O eixo (Y) apresenta os valores das taxas de colonização micorrízica, em médias, do fungo micorrízico *G. clarum* em raízes de cana-de-açúcar

5.2.2 Abundância de esporos nos diferentes tratamentos

A abundância de esporos foi observada nos dois tempos amostrais, em porcentagens distintas. No primeiro período amostral (30 dias), foi observada uma baixa frequência de esporos em 100g de solo do fungo *Glomus clarum*: NS (12,33); 10¹ (2,33); 10³ (1,67); 10⁶ (2,67); SS (1). A análise de variância (ANOVA), juntamente com o teste de Tukey (95% de significância), revelou não haver diferenças na abundância de esporos para este período (valores de $p > 0,05$). No entanto, na análise realizada aos 60 dias do experimento, foram observados valores distintos estatisticamente para a abundância de esporos, com uma maior esporulação, no microcosmo referente ao tratamento SS (280,7 esporos/ 100g de solo, em média) para o período de 60 dias ($p < 0,05$) (Figura 2). Estes resultados indicam que, assim como a colonização, a produção de esporos é uma característica que responde após um período de adaptação do sistema planta-FMA-comunidade bacteriana (SMITH E SMITH, 2011).

Figura 2 - Abundância de esporos nos solos dos microcosmos nos períodos de 30 e 60 dias. O eixo (X) representa os tratamentos com diferentes cargas microbianas (NS, 10^1 , 10^3 , 10^6 , 10^9 e SS). O eixo (Y) apresenta os valores, de abundancia de esporos, em médias, do fungo *G. clarum* por 100g de solo

Segundo Colozzi-Fillho & Nogueira (2007), a alta esporulação é um mecanismo de perpetuação das espécies de fungos micorrízicos. De acordo com a análise das médias apresentados na figura 2, pode-se observar que a maior densidade de esporos é descrita no tratamento com menor diversidade microbiana, e no tratamento com menor colonização radicular pelo FMA. Isto pode indicar que em situações de menor diversidade microbiana, os FMAs respondam de forma similar a outras situações de estresse.

Os mecanismos de interações entre microrganismos têm sido descritos como fatores cruciais para o entendimento da dinâmica de ambientes agrícolas complexos, com elevadas densidades microbianas e pouca disponibilidade de nutrientes, como o solo (VAN ELSAS et al 2006). Alguns autores têm descrito que algumas espécies de microrganismos, em razão de se adaptar as condições adversas de competição e antagonismos, co-evoluíram desenvolvendo interações simbióticas (BIANCIOTTO et al 2004; ARTHURSSON et al 2005), nas quais, a ausência de um microrganismo afeta a dinâmica de sobrevivência do outro. Neste contexto, os conceitos apresentados corroboram com os dados do presente

trabalho, sugerindo a esporulação, como um mecanismo de sobrevivência da espécie (BERBARA et al 2006) do fungo micorrízico e mostrando que o efeito do procedimento de diluição para extinção, eliminou grupos microbianos fundamentais para a dinâmica dos processos de germinação do fungo *Glomus clarum*. Os dados apresentados corroboram com resultados já apresentados na literatura, onde a inoculação do fungo micorrízico em associação com alguns grupos microbianos, por exemplo, o grupo dos rizóbios, resulta numa baixa taxa de esporulação, e consequentemente uma maior colonização (BURITY et al 1999).

5.2.3 Fatores de desenvolvimento da planta

Os efeitos da alteração na micorrização foram observados comparando o desenvolvimento das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Nesta análise, os valores obtidos para o comprimento e matéria seca da raiz de cana-de-açúcar variaram de (59 cm a 152,5 cm) e (0,8 g a 7,93 g), respectivamente. Dentro desse panorama, pode-se observar mais uma vez que as maiores variações foram observadas para a amostragem feita aos 60 dias. Em relação ao efeito dos tratamentos, estes seguiram a mesma tendência observada para a colonização das plantas pelo FMA, com maiores comprimento e matéria seca de raiz ($p = 0,013$), nos tratamentos onde menores diluições do solo foram inoculadas (NS, 10^{-1} e 10^{-3}) (Figura 3).

Figura 3 -Comprimento da raiz (A) e peso seco da raiz (B) das plantas cultivadas nos diferentes tratamentos nos períodos de 30 e 60 dias. O eixo (X) representa os tratamentos com diferentes cargas microbianas (NS, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} e SS). O eixo (Y) representa os valores de comprimentos (A) e matéria seca (B) da raiz, em média

A cana-de-açúcar é caracterizada como uma cultura muito exigente em água e nutrientes, o que faz com que a falta de um destes elementos leve a marcantes

limitações em seu desenvolvimento e produção. Portanto, considerando como o principal reservatório de água e nutrientes para a planta o solo, temos que o desenvolvimento radicular está diretamente relacionado ao potencial de desenvolvimento da planta (GRAÇA et al., 2010). Neste contexto, plantas e microrganismos desenvolveram interações que auxiliam a planta na absorção destes elementos, como as micorrizas (GAMALERO et al., 2004).

5.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana no solo durante o período experimental

Na literatura, trabalhos sobre a dinâmica entre planta-fungos micorrízicos e a diversidade microbiana do solo podem ser caracterizados como pontuais, pois somente têm abordado a influência de grupos específicos de microrganismos na dinâmica da colonização micorrízica em plantas (REIS, et al., 1999; BURITY, et al., 1997), ou descrevendo apenas a diversidade de microrganismos cultivados no desenvolvimento da associação entre FMAs e plantas (ANDRADE, et al., 1997). Dentro deste panorama, foram realizadas neste trabalho análises independentes de cultivo, com o intuito de observar o efeito da alteração da composição da comunidade bacteriana do solo, por meio da metodologia de diluição, sobre o desenvolvimento do FMA. Trabalhos relacionados foram desenvolvidos em outros sistemas, estudando, por exemplo, a sobrevivência de patógenos humanos em solos sob distintos níveis de diversidade microbiana (VAN ELSAS et al 2012), ou descrevendo impactos na diversidade do solo influenciando os processos de ciclagem de nutrientes (CHAPIN III et al 1997; GRIFFITHS et al 2000).

Em vista disso, o presente trabalho torna-se pioneiro na descrição dos processos de interação entre comunidades microbianas totais (incluindo organismos cultiváveis e não cultiváveis), e avaliando a interação entre o desenvolvimento das plantas e a taxa de micorrização por *G. clarum*. Ainda, pode-se extrapolar os dados gerados, usando o nível de diversidade do solo como um indicador de potencialidade da micorrização de plantas cultivadas neste solo.

A descrição inicial das comunidades microbianas presentes nos solos dos diferentes tratamentos foi feita por meio da técnica de T-RFLP, onde a leitura dos eletroferogramas gerou uma matriz de 423 grupos distintos de bactérias (picos), caracterizados em sua abundância relativa de acordo com a área dos picos. Os

perfis foram gerados em triplicatas, e posteriormente usados para diversas análises (ANDREOTE, et al., 2009; RAMMETTE, et al., 2007).

Inicialmente, tais dados foram plotados numa PCoA, onde a *beta-diversidade* foi o fator primordial usado para promover os agrupamentos observados (Figura 4A). Esta análise realizada obteve uma explicação 32,36%, no total da variância contida nos perfis, explicando 17,98 e 14,38% nas PCo 1 e 2, respectivamente.

Figura 4 -(A) Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis relativos às comunidades bacterianas nos solos oriundos dos diferentes nos diferentes tempos amostrados. A esfera vermelha destaca as amostras do solo natural. (B) PCoA referente aos perfis das comunidades bacterianas destacando dois grupos (amostras de solo natural em azul, e amostras das diluições em vermelho)

Analisando os agrupamentos da PCoA foi possível observar um agrupamento entre os tratamentos “NS” de todos os tempos amostrais (Figura 4B), demonstrando comunidades bacterianas de ambientes naturais que não sofreram alterações drásticas durante o período experimental. Controversamente, as amostras dos demais tratamentos mostram um ‘caminhamento’ no gráfico de acordo com período amostrado, o que indica que estas estão ao longo do experimento, passando por um processo de estruturação, o que leva a esta variação temporal na composição de tais comunidades. Esta reestruturação de nichos biológicos deve estar relacionada a riqueza de grupos, e não a abundância de células, levando a ocupação dos nichos disponíveis por grupos presentes no material usado na inoculação do solo (diferentes diluições) (GRIFFITHS et al 2000). Ainda assim, como forma de aumentar a confiança neste resultado, a distribuição demonstrada na PCoA foi

associada a uma análise de similaridade (*ANOSIM*) (RAMMETE et al 2007), onde foi possível observar que os pontos referentes aos períodos 0; 5 e 15 dias, demonstraram valores de $R > 0,75$ (baixa similaridade), enquanto que os pontos referentes aos períodos 30 e 60 dias apresentaram valores de $R < 0,25$ (alta similaridade). Esta maior similaridade das amostras nos períodos de 30 e 60 dias pode estar relacionada ao fato de que aos 30 dias a estabilidade das comunidades é maior, mas também ser atribuída ao efeito micosférico, promovido pela presença de exsudatos das raízes das plantas já presentes nestes períodos.

A literatura mostra que quando a planta está associada a fungos micorrízicos, ocorre uma mudança no perfil de exsudatos liberados no solo, e de certa forma essa mudança influencia diferencialmente a estrutura e a composição da comunidade microbiana da rizosfera (BAREA et al 1998; ; NUCCIO et al 2013; VERESOGLOU et al 2012), sugerindo que a seleção de grupos microbianos é diferente de uma planta não micorrizada para uma planta micorrizada (ARTHURSSON et al 2005).

Tabela 3 - Análise de similaridades entre os perfis bacterianos dos microcosmos em cada tempo amostral. Os valores correspondem aos valores de R, onde $R > 0,75$ ocorre separação entre as amostras; $R > 0,5$ ocorre separação, mas com sobreposição das amostras; $R < 0,25$ não há separação entre as amostras

<u>Períodos de Amostragem (dias)</u>					
	<u>Tempo_0</u>	<u>Tempo_5</u>	<u>Tempo_15</u>	<u>Tempo_30</u>	<u>Tempo_60</u>
<u>Tempo_0</u>	0	0,875	0,8417	0,7659	0,7029
<u>Tempo_5</u>	0,875	0	0,7653	0,9796	0,9908
<u>Tempo_15</u>	0,8417	0,7653	0	0,6335	0,7726
<u>Tempo_30</u>	0,7659	0,9796	0,6335	0	0,3915
<u>Tempo_60</u>	0,7029	0,9908	0,7726	0,3915	0

Adicionalmente a análise de todos os pontos, foram também geradas PCoAs para cada período amostras (0, 5, 15, 30, 60 dias), onde foi possível observar o distanciamento das comunidades bacterianas presentes em cada tratamento.

A PCoA realizada para as amostras iniciais (tempo 0) explica 52,75% da variância dos perfis (Figura 4A), claramente indicando a distribuição dos perfis de acordo com os tratamentos, e comprovando a eficiência da metodologia de 'diluição para extinção' em gerar comunidades variantes a partir de uma comunidade original.

Contudo, a separação dos perfis de tais comunidades foi ainda comprovada na análise de PCoA com base no dados obtidos com as amostras coletadas aos 5 dias de experimento, na qual pode-se também observar uma separação entre os tratamentos, com uma leve tendência de agrupamento de alguns tratamentos (10^{-1} , 10^{-3}) e (10^{-6} , 10^{-9} , SS), explicando 50,61% da variância dos dados. Na análise realizada aos 15 dias o mesmo foi observado, porém com um agrupamento maior entre os tratamentos extremos (10^{-1} e 10^{-3} ; 10^{-6} , 10^{-9} e SS), indicando um possível início da estabilização das comunidades.

Em trabalhos feitos com o objetivo testar à capacidade de resistência da comunidade natural a invasão de um patógeno (WERTZ et al 2006 e VAN ELSAS et al, 2012), foi sugerido que para caracterização de um ecossistema natural, deve ocorrer inicialmente uma estabilização da comunidade microbiana, para que posteriormente as cepas do patógeno possam ser introduzidas. Este princípio, de inoculação de um microrganismos exótico foi usado no presente trabalho, sendo o período de 15 dias usado com esta finalidade.

Figura 5 - Análises de coordenadas principais (PCoA) para os tempos amostrais 0 (A), 5 (B) e 15 (C), período antecedente a inoculação dos esporos do fungo micorrízico *G. clarum*

A análise de coordenadas principais das amostras analisadas aos 30 dias (Figura 6A) demonstrou a presença dos mesmos agrupamentos encontrados na análise anterior (15 dias): (NS), (10^{-1} , 10^{-3}) e (10^{-6} , 10^{-9} , SS), contudo a análise de

ANOSIM ($R = 0,6943$; $p = 0,0001$) demonstra que os perfis bacterianos desta amostragem são diferentes mas com alguma sobreposição (Tabela 3). Por fim, na análise realizada aos 60 dias, a avaliação da comunidade bacteriana mostrou que os agrupamentos similares aos observados nas análises anteriores, com uma explicação de 40,78% da variância (Figura 6B).

Esta manutenção dos agrupamentos dá base às inferências realizadas, uma vez que se verifica que o efeito causado pela diluição da comunidade inicial persiste durante todo o experimento. Pode-se também usar tal informação como base para se sugerir que uma vez que a biodiversidade do solo é 'degradada', os efeitos causados são duradouros, e a recuperação da estrutura da comunidade inicial dificilmente é reestabelecida.

Figura 6 -Análises de coordenadas principais (PCoA), para os tempos amostrais 30 dias (A), 60 dias (B), períodos após a inoculação dos esporos do fungo micorrízico *G.clarum*

De forma geral, quando a comparação entre as amostras é realizada em escala temporal, por meio de análise de similaridade ANOSIM (Tabela 3), pode-se observar que os perfis dos grupos bacterianos do tempo "30" e "60" dias não apresentam separação ($R = 0,3915$), indicando tanto que estas comunidades já são mais estáveis durante este período, ou que a presença da micorriza (planta + fungo) pode atuar na seleção microbiana, tornando tais comunidades mais similares. Porém, com base nas análises realizadas em cada período, temos como mais aceita a primeira proposição, onde as comunidades são distintas entre os tratamentos, resultando neste caso, em baixos valores na ANOSIM.

Levando em consideração os dados referentes à dinâmica de desenvolvimento da cana-de-açúcar e do fungo micorrízico já apresentados neste trabalho (figuras 1, e 3), e fazendo uma correlação com a estrutura das comunidades bacterianas, observa-se que os mesmos tratamentos que apresentaram diferença

significativa na taxa de colonização, comprimento e peso seco da raiz, apresentaram também as comunidades bacterianas mais distintas. Isto diretamente leva a observação de que o procedimento usado eliminou grupos bacterianos importantes para o desenvolvimento do processo de micorrização de cana-de-açúcar por *G. clarum*. Mais detalhadamente, se considerarmos a base da metodologia empregada, temos que os grupos excluídos de um tratamento para o outro são aqueles com menor frequência relativa no solo. Assim sendo, observa-se aqui, que grupos bacterianos de baixa abundância relativa, podem desempenhar funções essenciais a processos importantes ao desenvolvimento vegetal, como a promoção da micorrização das plantas. Neste contexto, Franklin, et al. (2006) sugerem que dentro de um ecossistema natural, não apenas os grupos dominantes desempenham papéis cruciais, mas os microrganismos que se apresentam em menor número de células podem ser caracterizados como parte da dinâmica de processos de interações mutualísticas microrganismos-hospedeiro. Ainda, considerando a resiliência do sistema solo, bem como sua redundância funcional, temos que a perda de espécies raras altera tanto a ocorrência de processos comuns no solo, como a ciclagem de nutrientes, resultando na ocorrência de maiores dificuldades no estabelecimento das interações entre plantas e microrganismos (LYONS, et al., 2001; MATOS, et al., 2005).

Garbaye, et al., (1994) descrevem que fungos micorrízicos têm seu desenvolvimento diretamente relacionados com bactérias do solo, principalmente no que se refere ao seu desenvolvimento e germinação Marx, et al (1994) relatam que quando o inóculo de fungo micorrízico é colocado em solo já inoculado com determinadas bactérias, estes apresentam maior colonização em pinus, quando comparados solos sem esta inoculação prévia. Em outro experimento, Garbaye e Bowen (1987) mostram que três fungos micorrízicos diferentes selecionam diferentemente grupos bacterianos do solo, alterando assim a estrutura de tal comunidade. Portanto, sugere-se que existe uma especificidade nas interações entre fungos micorrízicos e bactérias. Transpondo tais informações para o presente estudo, pode-se indicar que os agrupamentos formados nas PCoAs para o período de 30 e 60 dias, sejam formados em partes por bactérias selecionadas por este complexo planta-FMA. No entanto, quando consideramos as diluições usadas,

alguns destes grupos podem não mais estar presentes nos tratamentos de maior diluição (10^{-6} , 10^{-9} e SS).

5.4 Diversidade bacteriana nos tratamentos

Numericamente, a diversidade bacteriana associada aos solos dos diferentes tratamentos foi estimada pelo índice de *Shannon* (H') com base nas abundâncias relativas das áreas dos picos e nos números de *TRF's* oriundos do T-RFLP. Os valores referentes a cada tratamento e tempo amostral foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados obtidos para o tempo "0" demonstrou diferença nos valores dos tratamentos (NS=4,75; 10^{-1} =3,71; 10^{-3} =3,51; 10^{-6} =2,91; 10^{-9} = 3,16; SS= 0,00).

A partir da amostragem no período de 5 dias (5, 15, 30 e 60 dias), pode observar que não houve diferença significativa e visível para tratamentos (Figura 7) ($p > 0,05$). Isto indica, que uma vez que a diversidade bacteriana é 'degradada', o valor de diversidade tende a se restabelecer rapidamente, no entanto, as novas comunidades geradas, possuem composições estruturais distintas da original. Mais especificamente, este resultado mostra que a abundância total de células volta ao seu nível inicial, mas grupos distintos tornam-se os grupos mais frequentes em cada um dos tratamentos. Caso a comunidade bacteriana não retornasse ao seu estado original, os resultados aqui observado seriam gerados juntamente com um agrupamento das amostras dos diferentes tratamentos nas PCoAs (item anterior).

Figura 7-Valores de diversidade, determinada pelo índice de *Shannon*, nos diferentes tratamentos ao longo do período experimental. O eixo X descreve os períodos amostrais, que foram realizadas a amostras. O eixo Y descreve os valores de índice de Shannon (H') em média para cada tratamento e o desvio padrão respectivo

5.5 Descrição dos grupos bacterianos relacionados com a alteração na micorrização de cana-de-açúcar por *G. clarum*

Com base nos resultados apresentados anteriormente, onde numericamente a diversidade bacteriana não foi alterada, foi realizada uma triagem para se determinar quais os grupos bacterianos que apresentaram maiores taxas de alteração em suas populações relativas quando das diferenciais taxas de micorrização das plantas. Esta análise foi feita para os picos do T-RFLP, e posteriormente usadas na identificação dos grupos bacterianos relacionados a esta alteração. Para tal comprovação desta hipótese, o teste de SIMPER, baseado no algoritmo de *Bray-Curtis*, foi utilizado.

Na análise dos dados de T-RFLP este texto demonstrou que, na análise das amostras coletadas aos 60 dias do experimento, 57,73% da variância dos dados pode ser explicada por alterações nas populações relativas bacterianas, aqui representadas pelos picos observados. Dentre os todos os TRFs gerados na análise dos eletroferogramas, 285 picos apresentaram contribuições significativas para a separação dos perfis bacterianos das diferentes amostras (Figura 6), com valores de variância explicada chegada a 8,066 (TRF 155) (Tabela 4). Destes TRFs, 22 picos

mostraram ser capazes de explicar mais do que 1% da variância sendo então, selecionados para uma análise de curva de resposta.

Tabela 4 -Porcentagem de contribuição de 22 picos oriundo da análise do T-RFLP com as maiores contribuições para a diferenciação entre tratamentos

TRF	Contrib. %
155	8,066
10	6,306
4	6,224
5	4,066
44	2,776
186	2,368
251	2,326
385	2,317
252	2,266
180	2,148
167	2,015
277	1,928
29	1,707
182	1,534
8	1,452
419	1,439
174	1,37
279	1,353
33	1,297
25	1,268
181	1,181
42	1,099

Os picos selecionados no teste de SIMPER foram correlacionados unicamente com o parâmetro de colonização das raízes da planta, pois segundo a análise de correlação baseada no teste de permutação de Monte Carlo, a colonização ($p = 0,0120$), foi o único parâmetro que mostrou-se significativo ($p < 0,05$), capaz de explicar a distribuição dos perfis bacterianos nos microcosmos, ao contrário dos outros parâmetros incluídos no teste, como comprimento e matéria seca da raiz, os quais, segundo o mesmo teste, apresentaram valores de $p > 0,05$. Portanto, a análise de regressão realizada permitiu observar que alguns grupos bacterianos que apresentavam alta contribuição no teste de SIMPER, apresentavam

dinâmica positiva e crescente quando relacionado ao aumento da colonização micorrízica aos 60 dias. Por exemplo, de acordo com a (Figura 8), o pico 155 apresenta uma resposta direta de aumento de frequência relativa juntamente com o aumento da colonização. Esta mesma dinâmica é apresentada para os picos 4 e 10, supondo que estes grupos bacterianos possam estar associado a alguma função importante no processo de aumento da colonização da raízes da cana-de-açúcar.

Ainda assim, pode-se perceber que além desses picos com maiores contribuições, foram obtidos outros picos característicos, com menor contribuição, apresentando estes tanto correlações diretas, como indiretas com os valores observados de colonização micorrízica. Por exemplo, o pico 5 possui correlação negativa com as taxas de colonização observadas, indicando que os organismos relacionados a estes picos atuam de forma a inibir o processo de colonização das plantas pelo FMA (Figura 8).

Figura 8 -Análise de curva resposta, baseada na análise de redundância (RDA), utilizando o perfil de picos de T-RFLP das amostras do tempo de 60 dias. Apenas são apresentados os TRFs que obtiveram maior contribuição para separação das amostras de acordo com o teste de SIMPER. Análise de regressão linear com distribuição de Gaussian

Trabalhos sobre as características bióticas relacionadas a interação entre plantas e FMA são escassos, porém algumas observações indicam que a dinâmica populacional de componentes da comunidade bacteriana do solo pode afetar diretamente o processo de micorrização. Albertsen et al. (2006) descrevem existir essa dinâmica populacional na micorrizosfera, descrevendo que declínios na população de *Burkholderiaceae* podem estar relacionados ao aumento nas populações de *Azospirillum* e algumas espécies de *Pseudomonas*. VanElsas et al.

(2006) sugerem que, para a compreensão de todo o sistema de interações microbianas em ambientes complexos, se faz necessário o estudo dessas comunidades microbianas *in situ*, levantando o maior número de informações possíveis sobre todos os fatores bióticos e abióticos. Neste ponto, o uso de abordagens independentes de cultivo, que consideram a comunidade como um todo podem levar a avanços neste conhecimento, como o promovido neste estudo, onde a comunidade bacteriana revelou-se alterada, e relacionada às alterações na micorrização da planta estudada.

5.6 Análise da correlação entre as UTOs e a colonização micorrízica de *G. clarum* em cana-de-açúcar

Com o intuito de inferir sobre a taxonomia dos grupos bacterianos envolvidos na micorrização de cana-de-açúcar, foram obtidas e analisadas 599.797 sequências da região V6 (media de 58,9 *pb*) do gene ribossomal 16S DNAr.

Estas sequências foram agrupadas em UTOs, compostas por sequências que possuem pelo menos 97% de similaridade. Com base nesta separação, e utilizando a *otu_table* foi observado a dissimilaridade entre os agrupamentos (NS, 10^{-1}); (10^{-3}); (10^{-6} , 10^{-9}); (SS) apresentada nas análises de coordenadas principais sobre o perfil de OTUs de cada tratamento (Figura 9). Esta separação segue o mesmo padrão das demais análises realizadas neste estudo, o que dá base para inferir de forma robusta sobre os grupos bacterianos relacionados às alterações observadas.

Figura 9 - Análises de coordenadas principais (PCoA), do perfil de UTOs para o tempo amostral, 60 dias. Os eixos (Coordenadas principais) explicam 70, 83% da distribuição

Da mesma forma que os TRFs, as UTOs foram também analisadas pelo teste de SIMPER, que obteve uma porcentagem de dissimilaridade entre os perfis de 58,58%. Baseado nestes resultados foi realizado um teste de correlação utilizando os dados de abundância relativa de UTOs e a porcentagem de colonização radicular nos tratamentos. Foi observado que as 22 UTOs mais significativas para separação dos agrupamentos apresentavam respostas adversas, ou seja, algumas UTOs, por exemplo a 45131 (contribuição de 0,12% para a separação), apresentavam respostas negativamente relacionadas ao aumento da colonização, enquanto que outras UTOs, como por exemplo a 51112 (contribuição de 0,109) apresentavam correlação positiva para o aumento da colonização (Tabela 5).

Tabela 5 -Porcentagem de contribuição de 22 picos oriundo da análise de *UTOs* com as maiores contribuições para a diferenciação entre tratamentos

<i>OTUs</i>	Contrib. %
45131	0,1257
29784	0,1186
34823	0,1173
29229	0,1157
30560	0,115
42072	0,1148
42840	0,1129
4847	0,1125
41731	0,1112
13719	0,1097
51122	0,1092
18854	0,1085
41715	0,1048
46031	0,1045
19493	0,1043
18046	0,1042
43474	0,1033
14450	0,1031
44262	0,1008
44439	0,1007
41192	0,0988
28181	0,09741

Esta mesma dinâmica de grupos microbianos foi observada para as análises dos dados de T-RFLP. Aqui, dentre as 22 *UTOs* selecionadas, 8 apresentaram respostas positivas e 14 respostas negativas ao aumento da colonização micorrízica (Figura 10). Números idênticos foram observados para as respostas das TRFs, indicando a robustez das análises usadas neste estudo. A próxima pergunta a ser respondida torna-se a identidade de tais grupos microbianos.

Figura 10 - Análise de correlação entre as UTOs mais representativas para a separação dos agrupamentos e as porcentagens de colonização das raízes (*Colr*), de cana-de-açúcar. Cada número corresponde a uma UTO, e as curvas de respostas são indicadas pelas cores correspondentes

Sendo assim, de acordo com o delineamento experimental utilizado, pode-se sugerir que o sistema de maior colonização de *G.clarum* em cana-de-açúcar está intimamente correlacionado com a composição da comunidade bacteriana do solo descrita e que quando este solo sofre impactos de origem adversa a ponto de afetar a comunidade bacteriana, os processos associados à colonização micorrízica podem ser afetados da mesma forma.

Alguns trabalhos estudaram a comunidade bacteriana associada a sistemas radiculares de planta de *Trifolium repens* micorrizadas e não micorrizadas, relatando a significativa presença de táxon relacionados à família *Enterobacteriaceae*, *Legionella* sp., *Pedobacter* sp., *Flexibacteriaceae*, *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* associadas a raízes micorrizadas (TOLJANDER et al 2007). Contudo, não existem trabalhos que venham a descrever a dinâmica de grupos bacterianos específicos relacionados ao aumento da colonização de fungos micorrízicos em cana-de-açúcar. Portanto sugere-se que estes grupos venham a compor as primeiras observações sobre a dinâmica bacteriana associada a essa interação.

5.7 Identificação das UTOs correlacionadas com a colonização micorrízica de *G. clarum* em cana-de-açúcar

A análise taxonômica das UTOs com significativa correlação com os valores de micorrização indicaram como principais grupos relacionados a este processo as classes *Actinobacteria*, *Flavobacteria*, *Clostridia*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Sphingobacteria*, além dos filos, *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* (Tabela 4). Dentro dessa descrição, as UTOs afiliadas a *Streptomyces* (46031 e 18854), *Clostridium* (51122), *Betaproteobacteria* (19493), *Gammaproteobacteria* (14450) e outras identificadas apenas dentro do Domínio Bacteria (44439) ou filo *Verrucomicrobia*(29229), apresentaram correlação positiva com o aumento da colonização micorrízica; enquanto as UTOs afiliadas a *Chitinophagaceae* (13719); *Flammeovirgaceae* (45131, 30560 e 42840); *Comamonadaceae* (18046 e 42072); além de OTUs afiliadas unicamente para Domínio Bacteria (4847, 44262, 41192), para filo *Acidobacteria*(29784,) e algumas afiliadas a classe *Gammaproteobacteria* (41731, 41715 e 28181), apresentaram correlação negativa com o aumento da colonização micorrízica em cana-de-açúcar. Observando este dados, observa-se que alguns grupos são constantes em suas correlações, com diferentes UTOs seguindo a mesma tendência. No entanto, alguns grupos, como por exemplo, *Gammaproteobacteria*, apresentam UTOs relacionadas tanto positivamente como negativamente com a micorrização das plantas. Para estes grupos, o papel dos organismos relacionado ao processo deve ser relacionado a aspectos adaptativos que ocorrem em níveis filogenéticos menores do que classe, ou seja, existem gêneros ou espécies de *Gammaproteobacteria* relacionados positiva ou negativamente com o desenvolvimento de *G. clarum* em raízes de cana-de-açúcar.

Tabela 6 -Taxonomia das UTOs, mais representativas para o teste de curva resposta correlacionado com o aumento da colonização micorrízica de *G. clarum* em cana-de-açúcar

OTUs	Taxonomia
44439	k__Bacteria
46031	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Streptomycetaceae; g__Streptomyces
18854	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Streptomycetaceae; g__Streptomyces; s__lanatus
34823	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales; f__Flavobacteriaceae; g__Chryseobacterium; s__
51122	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium; s__pasteurianum
19493	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria
14450	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria
29229	k__Bacteria; p__Verrucomicrobia
4847	k__Bacteria
44262	k__Bacteria
41192	k__Bacteria
29784	k__Bacteria; p__Acidobacteria; c__PAUC37f; o__f__; g__s__
13719	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Chitinople
45131	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Flammeovirgaceae; g__A4; s__
30560	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Flammeovirgaceae; g__A4; s__
42840	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Flammeovirgaceae; g__A4; s__
43474	k__Bacteria; p__Proteobacteria
18046	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Comamonadaceae
42072	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Comamonadaceae; g__Delftia; s__
41731	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria
47115	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria
28181	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria

Existem relatos similares, onde os grupos bacterianos aqui encontrados estão relacionados com o desenvolvimento das plantas, e por vezes, ligados ao processo de micorrização. Offeret al. (2007), estudando a comunidade bacteriana associada a linhagens transgênicas de trevo (*Medicago truncatula*), observaram que dentre as plantas colonizadas, as UTOs mais responsivas ao crescimento vegetal pertenciam as famílias *Comamonadaceae* e *Oxalobacteraceae* (β -*Proteobacteria*). Em trabalho posterior, Pivatoet al. (2009) demonstraram a colonização micorrízica do fungo *G. mossae* é relacionada com o aumento na população de bactérias relacionadas a *Oxalobacteriaceae*, e decréscimo na população de *Comamonadaceae*.

A literatura atual contém trabalhos que explicitam a comunidade bacteriana que sempre está associada a dinâmica dos fungos micorrízicos, atuando de forma sinérgica, e resultando numa mais eficiente ciclagem de nutrientes, e maior disponibilização destes para as plantas (AUGÉ, 2001). Pode-se ainda inferir que, desta forma, os fungos alteram as condições do ambiente, favorecendo a multiplicação dos grupos microbianos específicos relacionados, por meio da disponibilização de determinados nutrientes, como por exemplo, compostos específicos de carbono de baixo peso molecular como glucose, formato, acetato, ou outros compostos de elevado peso molecular, ainda não conhecidos (TOLJANDER, et al., 2007).

Contudo, este trabalho descreveu que a associação e o aumento das taxas de colonização micorrízica está intimamente associada a uma dinâmica de populações bacterianas, pois de acordo com o delineamento experimental utilizado, pode-se perceber a ocorrência de grupos bacterianos distintos, nos distintos tratamentos, resultam em diferentes níveis de colonização.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- A esterilização do solo utilizada não gerou grandes alterações em suas características físicas e químicas;
- A metodologia de 'diluição para extinção' foi eficiente em gerar comunidades bacterianas com composição distinta entre os tratamentos;
- Após 30 dias de experimento, as comunidades bacterianas geradas atingem certa estabilidade, sendo similares as observadas no período de 60 dias de experimento;
- Os resultados foram mais claramente observados na amostragem realizada aos 60 dias de experimento;
- As plantas cultivadas em solos com comunidades bacterianas mais próximas as originais apresentaram maior comprimento e massa seca de raiz;
- Ocorreu uma maior micorrização por *G. clarum* em plantas cultivadas nos solos com menor diluição do solo original;
- As comunidades bacterianas mostraram-se distintas entre os diferentes tratamentos ao longo de todo o experimento;
- Foram encontrados TRFs diretamente relacionados ao aumento ou diminuição da micorrização das plantas de cana-de-açúcar;
- Da mesma forma, grupos bacterianos foram correlacionados com tais processos, sendo os grupos, afiliados a classe *Actinobacteria*, *Flavobacteria*, *Clostridia*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* e também ao filo *Verrucomicrobia*, estavam diretamente relacionados ao aumento da micorrização; e os grupos afiliados as classes *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria* (*Burkholderiales*) e *Gammaproteobacteria* além de grupos do filo *Acidobacteria*, estavam correlacionados de maneira inversa a tal interação.

Por fim, este trabalho dá bases para concluir que alterações na comunidade bacteriana do solo, seja esta promovida por qualquer fator, podem alterar de forma determinante na ocorrência de importantes interações, como a que ocorre entre plantas e FMA.

REFERENCIAS

- ALBERTSEN, A.; RAVNSKOV, S.; GREEN, H.; JENSEN, D.F.; LARSEN, J. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil microorganisms as affected by organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1008-1014, 2006.
- ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacteria from the rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, London, v.192. p. 71-79, 1997.
- ANDREOLA, F. **Micorrizas vesiculares-arbusculares em cana de açúcar**. 85p. 1982. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,, 1982.
- 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.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Combined bromodeoxyuridine-immuno capture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7.p.1952–1966, 2005.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p 1-10, 2006.
- AUGÉ, R.M. Water relations , drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 11, p. 3-42, 2001.
- BAREA, J.M.; AZCON, R.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 8, p.343–351, 2002.
- BAREA, J.M.; ANDRADE, G.; BIANCIOTTO, V.; DOWLING, D.; LOHRKE, S.; BONFANTE, P.; O’GARA, F.; AZCON-AGUILAR, C. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 64, p. 2304-2307, 1998.
- BERBARA, R.L.L.de SOUZA, F.A. ; FONSECA, H.M.A.C. **Fungos Micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição**. In: _____ **Nutrição Mineral de Plantas**. Seropédica: SBCS, 2006. p. 53-88.
- BIANCIOTTO, V.; GENRE, A.; JARGEAT, P.; LUMINI, E.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P. Vertical transmission of Endobacteria in arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 70, p. 3600-3608, 2004.

BOERSMAN, F.G.H.; WARMINK, J.A.; ANDREOTE, F.D.; VAN ELSAS, J.D.; Selection of *Sphingomonadaceae* at the Base of *Laccaria proxima* and *Russula exalbicans* Fructing Bodies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 1979-1989, 2009.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. **Trends Plant Science, Amsterdam**. v.13, p.492–498, 2008.

BRAZ, R.R. **Estímulo da solubilização de fosfato resultante da co-inoculação de *Aspergillus niger* e *Burkholderiacepacia***. 80p. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J.O.; VASCONCELLOS, C.A.; PURCINO, A.A.C. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 2, p. 315-323, 2001.

BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C.P.; SOUZA, S.; MERGULHÃO, A.C.E.S.; SILVA, M.L.R.B. Efetividade da inoculação com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 801-807, 2000.

CARPENTER-BOGGS, L.; LOYNACHAN, T.E.; STAHL, P.D. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p.1445–1451, 1995.

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

CHAPIN III, F.S.; WALKER, B.H.; HOBBS, R.J.; HOOPER, D.U.; LAWTON, J.H.; SALA, O.E.; TILMAN, D. Biotic Control over the Functioning of Ecosystems. **Science**, New York, v. 277. p. 500-503, 1997.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, New Zealand, v. 18, p.117-143, 1993.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v5: User manual/tutorial**, PRIMER-E. Plymouth, UK, 2001. 91p .

COLOZZI-FILHO, A.; NOGUEIRA, M.A. Micorrizas arbusculares em plantas tropicais. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiologia e qualidade ambiental**, (Instituto Agronomico de Campinas, SP 2007).

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (Imprensa/Notícias e Levantamento de Safras, 2012/13). www.conab.gov.br. Acesso em: 15 março 2013

DALRI, A.B.; CRUZ, R.L. Efeito da frequência de irrigação subsuperficial por gotejamento no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*). **Irrigação**, Botucatu, v. 7, p. 29-34, 2002.

DANIELS, B.A.; TRAPPE, J.M. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. **Mycologia**, Stanford, v. 72, p.457–471, 1980.

DATTA, P.; KULKARNI, M. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Diversity in Sugarcane Rhizosphere in relation with Soil Properties. **Notulae Scientia Biologicae**, Romania, v. 4, p. 66-74, 2012.

DE SOUZA. F.A; DA SILVA. I.C.L; BERBARA. R.L.L. Fungos micorrízicos arbusculares: Muito mais diversos que se imagina. **Biodiversidade**, Brasília, v. 5, p. 501-556, 2007.

DELAUX, P.M.; SÉJALON- DELMAS, N.; BÉCARD, G.; ANÉ, J.M. Evolution of the plant-microbe symbiotic ‘toolkit’. **Cellpress**. USA. In press. 2013.

DIAS, N.M.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura de cana-de-açúcar no estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**. Campinas, v. 64, p. 389-396. 2005.

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

DUMBRELL, A.J.; NELSON, M.; HELGASON, T.; DYTHAM, T.; FITTER, A.H. Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1-9, 2009.

FERNANDES, A.J. **Manual da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Editora Livroceres, 1984. 196p.

FERREIRA, E.A.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; VENTRELLA, M.C.; BARBOSA, M.H.P.; PROCÓPIO.S.O.; REBELLO, V.P.A. Sensibilidade de cultivares de Cana-de-açúcar à mistura Trifloxyfuron-Sodium +Ametryn. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, p. 93-99, 2005.

FRANKLIN, R.B.; MILLS, A.L. Structural and Functional Responses of Sewage Microbial Community to dilution-Induced Reductions in Diversity. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 280-288, 2006.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhizal helper bacteria revisited. **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 22-36, 2007.

GALDOS , M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 153, p.347-352, 2009.

GAMALERO, E.; MARTINOTTI, M.G.; TROTTA, A.; LEMANCEAU, P.; BERTA, G. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and

Glomus mossea e BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. **New Phytologist**, Oxford, v. 155, p. 293–300, 2004.

GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Oxford, v. 128, p. 197-210, 1994.

GERDEMANN, J.N.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of British Mycorrhizal Society**, Cambridge, v. 46, p. 235-244, 1963.

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

GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; BARDGETT, R.D.; COOK, R.; CHRISTENSEN, S.; EKELOUND, F.; BÄÄTH, E.; BLOEM, J.; DE RUITER, P.C.; DOLFING, J.; NICOLARDOT, B. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity- ecosystem function relationship. **Oikos**, Copenhagen, v. 90, p. 279-294, 2000.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, New York, v. 4, p. 9, 2001.

HART, M.M.; READER, R.J. Do arbuscular mycorrhizal fungi recover from soil disturbance differently? ; **Tropical Ecology**, Cambridge v. 45, p. 97-111, 2004.

HODGE, A.; FITTER, A.H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, p. 13754-13759, 2010.

HOOKE, J.E.; PIATTI, P.; CHESHIRE, M.V.; WATSON, C.S. Polysaccharides and monosaccharides in the hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus E3* and *Glomus tenue*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 680-683, 2007.

JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K.; BAREA, J.M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology & Fertility of Soils**, Firenze, v. 37, p. 1-16, 2003.

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.

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

KHOKHAR, I.; HAIDER, M.S.; MUKHTAR, I.A.A.; MUSHTAQ, S. Evaluation of antagonistic activity of soil bacteria against plant pathogens fungi;. **Pakistan Journal of Phytopathology**, Faisalabad, v. 23, p. 166-169, (2011).

KIRIACHEK, S.G.; AZEVEDO, L.C.B.; PERES, L. E.P.; LAMBAIS, M.R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 33,p. 1-16, 2009.

KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentration in maize (*Zea mays* L.).**New Phytologist**, Oxford, v. 117, p. 649-655, 1991.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6. p. 1244-1251. 2004.

LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora – the mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**, Washington, v. 78, p. 366–371, 1988.

LYONS, K.D.; SCHWARTZ, M.W. Rare species loss alters ecosystem function-invasion resistance. **EcologyLetters**, Oxford, v. 4, p. 358-365, 2001.

MAIA, J.L.T.; RIBEIRO, M.R. Cultivo contínuo da cana-de-açúcar e modificações químicas de um argissolo amarelo fragipanico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p.1127–1132, 2004.

MATOS, A.; KERKHOF, L.; GARLAND, J.L. Effects of Microbial Community Diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the Wheat Rhizosphere.**Microbial Ecology**,New York, v. 49, p. 257-264, 2005.

MAYO, K.; DAVIS, R.E.; MOTTA, J.Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. **Mycologia**, Stanford, v. 78, p.426–431, 1986.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; LIEBEREI, R. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rizhosphere of maize. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 11, p. 297-302, 2001.

MONQUERO, P.A.; REIS, F.C.; MUNHOZ, W.S.; HIRATA, A.C.S.; MENECHIN, S.P.; Solo cultivado com cana-de-açúcar: persistência e impacto de herbicidas na microbiota. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 8, p. 380-387, 2012.

MOREIRA, F.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed.Lavras:Editora UFLA, 2006.596p

MOSSE, B.The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular arbuscular mycorrhiza. **Brithish Mycology Society**, Manchester, v 42,p. 273–286, 1959.

MUMMEY, D.L.; ANTUNES, P.M.; RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizal fungi pre-inoculant identity determines community composition in roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1173-1179, 2009.

- OFFRE, P.; PIVATO, B.; SIBLOT, S.; GAMELERO, E.; CORBERAND, T.; LEMANCEAU, P.; MOUGEL, C. Identification of Bacterial Groups preferentially associated with Mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 913-921, 2007.
- OLSSON, P.A.; JONHSSON, N.C. Tracking carbon from the atmosphere to the rhizosphere. **Ecology letters**, Oxford, v.8, p. 1264-1270, 2005.
- OLSSON, P.A.; LARSSON, L.; BAGO, B.; WALLANDER, H.; AND VAN AARLE, I.M. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.159, p.7-10, 2003.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; URQUAIA, S.; DOBEREINER, J. Interação sorgo micorriza vesicular arbuscular- bactérias diazotróficas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 19., Santa Maria, 1990. **Resumos...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1990. p.24.
- 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 bactéria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.
- PIVATO, B.; MAZURIER, S.; LEMANCEAU, P.; SIBLOT, S.; BERTA, G.; MOUGEL, C.; VAN TUINEN, D. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 197-210, 2007.
- PIVATO, B.; OFFRE, P.; MARCHELLI, S.; BARBONAGLIA, B.; MOUGEL, C.; LEMANCEAU, P.; BERTA, G. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal developmnet as influenced by the bactéria, fungi and host plant. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 19, p. 81-90, 2009.
- RACHID, C.T.C.C.; PICCOLO, M.C.; LEITE, D.C.A.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; VAN ELSAS, J.D.; PEIXOTO; PICCOLO, M.C.; LEITE, D.C.A.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; ROSADO, A.S. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems **BMC microbiology**, London, v. 12. p. 1-12, 2012.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.
- 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.
- REIS, V.M.; PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de Micorrizas Arbusculares e da Bactéria Diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1933-1941, 1999.

RILLIG, M.C.; MUMMEY, D.L. Mycorrhizas and soilstructure. **New Phytologist**, Oxford, v. 171, p. 41-53, 2006.

RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant & Soil**, London, v. 233, p. 167-177, 2001.

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. **The ISME Journal**, New York, v.1, p. 283-290, 2007.

ROONEY, D.C.; KILLHAM, K.; BENDING, G.D.; BAGGS, E.; WEIH, M.; HODGE, A. Mycorrhizas and biomass crops: opportunities for future sustainable development.; **Trends in Plant Science**, Oxford, v14, p. 542-549, (2009).

ROSSETTO, P.B. **Interação entre cana-de-açúcar com bactérias associadas**. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008

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**. Preto: Instituto Agrônomo, 2008. v.1, p-869-882,

ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPOROSO, 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.

SATOLO, L.F. **Dinâmica econômica das flutuações na produção de cana-de-açúcar**. 2008. 131p. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SCHÜTTE, U.M.E.; ALDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; SHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.F. Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, Washington, v.3, p. 1258-1268, 2009.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. London, UK: Academic Press, (1997). 605p

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition: New paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Reviews**, California, v. 67, p. 227-250, 2011.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial Diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

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.

TORO, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M. The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. **New Phytologist**, Oxford, v. 138, p. 265–273, 1998.

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.

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.

UNICA. (2012) União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Disponível em: <http://www.unica.com.br/> Acesso em: 02 mar. 2013.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v. 47, p. 77-87, 2011.

VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVÄ, D.; KRISTÜFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington**, v. 109, p. 1159-1164, 2012.

VAN ELSAS, J.D.; TAM, L.; FINLAY, R.D.; KILLHAM, K.; TREVORS, J.T. Microbial interactions in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology**. 2nd ed. New York. CRC press, 2006. p 177-205

VELINI, E.D.; FREDERICO, L.A.; MORELLI, J.L.; MARUBAIASHI, O.M. Avaliação dos efeitos de doses de herbicida clomazone, aplicado em pós-emergência inicial, sobre crescimento e produtividade de soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* cv.SP 71-1406). **STAB**. Piracicaba. v.10, p.13-16, 1992.

VERESOGLOU, S.D.; CHEN, B.; RILLIG, M.C.; Arbuscular mycorrhizal and soil nitrogen cycling. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.46, p.53-62, 2012.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.91, p.127-141, 2001.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHE, Y. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 64, n. 12, p. 5004-5007, 1998.

VIVAS, A.; AZCON, R.; BIRO, B.; BAREA, J.M.; RUIZ-LOZANO, J.M. Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with

arbuscularmycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity.
Canadian Journal of Microbiology. Montreal, v.49,p. 577–588, 2003.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J.I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; FREITAG, T.; GUILLAUMAND, N.; LE ROUX, X. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.8, p. 2162-2169, 2006.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, Philadelphia, v. 161, p. 575-586, 1996.

XAVIER, L.J.C.; GERMIDA, J.J. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.35, p. 471–478, 2003.