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

Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos

Dorotéia Alves Ferreira

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

**Piracicaba
2016**

Dorotéia Alves Ferreira
Engenheira Agrônoma

Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Ferreira, Dorotéia Alves

Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos / Dorotéia
Alves Ferreira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2016.
138 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Simbiose 2. Diversidade microbiana 3. Funcionalidade do solo 4. Micorriza
I. Título

CDD 631.46
F383i

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

**Aos meus pais, Marly e Maxwell (*in memoriam*) e meus avós,
Francisca e Pedro, Neco (*in memoriam*) e Ubaldo (*in memoriam*).**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me manter forte e determinada em todos os momentos, e por me conduzir sempre no melhor caminho.

Aos meus pais, Marly Alves de Souza e Maxwell Ferreira Lima (*in memoriam*), por serem os responsáveis e incentivadores de todas as minhas conquistas. Aos meus irmãos, Ana Paula, Mariana, Gustavo, Micaela, Michele e Ubaldo, aos meus afilhados e a toda minha família pelo apoio e por serem tão importantes em toda essa caminhada.

Ao curso de Agronomia e Pós Graduação em Agronomia da UFG, no Campus de Jataí, e ao departamento de Ciência do Solo e o Programa de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP, todos os professores e funcionários destas instituições.

Aos meus ‘mestres’ e incentivadores, Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro, Prof. Dr. Helder Barbosa Paulino e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pelos ensinamentos e confiança. Em especial, ao meu orientador desta etapa, Dr. Fernando Dini Andreote, pela amizade e dedicação e por todos os desafios lançados, inclusive com relação à experiência no exterior.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, Danielle, Luana, Júlia, Pedro, Thiago, Juliana, Diogo, Dig, Danice, Lucas, Joelma, Polé, Myllene, Ademir, Simone, Armando, Kelly, Alessandra, Bruna, Felipe, Agnes, Denise, Sônia, Fernandinho, pela amizade e contribuição para a realização do trabalho.

Aos professores da Universidade de Groningen, na Holanda, Dra. Joana Falcão Salles e Dr. Dirk Van Elsas, e a todos componentes do grupo de Ecologia Microbiana, que me receberam tão bem durante o período do estágio no exterior. Especialmente, à Deborah, Maria Júlia, Francisco, Camila, Eder, Renato, Pilar e Thaís. Agradecimento especial a Thaís pelo auxílio na condução do projeto durante o estágio e ao Cyrus pelo treinamento do Biolog.

Aos amigos, Adriana Verginassi, Meire Cordeiro, Edicarlos Damacena, Sheila Santos, Marina Colzato, Altina Lacerda, Emiliana Manesco, Flávio Araújo, Eliana Geremia, Micaela Santos, Roberto Carlos, Luciene Barcelos, Daiane Alves e Ulisses Brito pela amizade e carinho.

A CAPES pela concessão da bolsa no início do doutorado e à FAPESP pela bolsa no Brasil (processo: 2013/04388-3) e no exterior (processo: 2014/11095-5).

A todos que não foram mencionados, mas, que participaram de forma direta ou indireta na minha formação profissional e pessoal e na realização desta conquista.

MUITO OBRIGADA!

“Ingenuidade é predado encantador na personalidade, mas se o trabalho não a transfigura em tesouro de experiência, laboriosamente adquirido, não passará de flor preciosa a confundir-se no pó da terra, ao primeiro golpe de vento”.

EMMANUEL

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 Revisão bibliográfica.....	16
1.2.1 Comunidade microbiana dos solos.....	16
1.2.2 Fungos micorrízicos arbusculares: importância e ecologia.....	17
1.2.3 Microbiota dos solos e fungos micorrízicos arbusculares.....	21
1.2.4 Invasão microbiana e a organização do sistema solo.....	24
1.2.5 Cana-de-açúcar e milho: grandes culturas e plantas modelo.....	26
Referências.....	29
2 INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E A COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE A COLONIZAÇÃO DE CANA- DE-AÇÚCAR.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
2.1 Introdução.....	44
2.2 Hipótese Geral.....	45
2.3 Objetivos específicos.....	46
2.4 Material e Métodos.....	46
2.4.1 Descrição dos tratamentos e amostragens.....	46
2.4.2 Quantificação da colonização micorrízica em amostra de raízes dos diferentes tratamentos.....	50
2.4.3 Determinação de massa seca da parte aérea das plantas nos diferentes tratamentos.....	50
2.4.4 Extração do DNA das amostras de solo	51
2.4.5 Análise das comunidades de fungos e bactérias nas amostras de solo dos diferentes tratamentos.....	51
2.5 Resultados e Discussão.....	53
2.5.1 Dinâmica da micorrização nos diferentes tratamentos.....	53
2.5.2 Comportamento diferencial de cada espécie de FMA.....	54
2.5.3 Massa seca da parte aérea das plantas para os diferentes tratamentos.....	60

2.5.4 Alterações na comunidade bacteriana do solo promovida pela inoculação de FMAs.....	61
2.5.5 Diferenciação das comunidades de bactérias ao longo das diluições e tempo.....	66
2.5.6 Alterações na comunidade de fungos do solo promovida pela inoculação de FMAs.....	69
2.5.7 Diferenciação das comunidades de fungos ao longo das diluições e tempo.....	71
2.6 Conclusões.....	74
Referências.....	74
3 ASSOCIAÇÕES ENTRE A MICROBIOTA DE SOLOS E <i>Rhizophagus clarus</i> NA COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA DE PLANTAS DE MILHO.....	81
Resumo.....	81
Abstract.....	81
3.1 Introdução.....	82
3.2 Hipótese Geral.....	83
3.3 Objetivos específicos.....	83
3.4 Material e Métodos.....	84
3.4.1 Desenho experimental e amostragens.....	84
3.4.2 Determinação das taxas de colonização micorrízica nas amostras de raízes.....	86
3.4.3 Extração de DNA das amostras de solo.....	87
3.4.4 Avaliação da comunidade bacteriana.....	87
3.4.5 Determinação dos perfis metabólicos das comunidades bacterianas.....	89
3.5 Resultados e Discussão.....	91
3.5.1 Taxas de colonização micorrízica nos diferentes tratamentos.....	91
3.5.2 Efeito dos tratamentos na comunidade bacteriana do solo.....	95
3.5.3 Efeitos dos tratamentos no perfil metabólico da microbiota dos solos.....	104
3.6 Conclusões.....	109
Referências.....	110
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
APÊNDICES.....	123

RESUMO

Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos

O conhecimento das associações entre os microrganismos componentes da microbiota dos solos é de grande interesse no meio científico, principalmente relacionado aos microrganismos que se associam de forma benéfica com as plantas. Neste contexto, destaca-se a micorriza arbuscular, que é a associação entre os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e uma amplitude de espécies vegetais. Além desta íntima interação entre estes organismos, torna-se necessário conhecer a importância dos demais componentes do sistema solo, como a microbiota formada por fungos e bactérias dos solos, para o estabelecimento desta interação. Os objetivos dos estudos componentes desta tese se concentraram na avaliação de FMAs (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) inoculados em sistemas alterados quanto à composição das comunidades microbianas dos solos, promovidas pela metodologia de ‘diluição para extinção’. No primeiro estudo foram encontradas respostas diferenciais na capacidade de colonização micorrízica (%CM) de plantas de cana-de-açúcar pelos FMAs inoculados nos diferentes sistemas, além do efeito diferencial dos FMAs quanto às alterações nas comunidades de fungos e bactérias do solo. Num estudo mais detalhado, desenvolvido apenas com *R. clarus* em plantas de milho, foi verificado que a maiores diversidades microbianas do solo resultaram em maior colonização do hospedeiro, principalmente no período inicial de desenvolvimento das plantas. Neste experimento foi descrita a correlação direta da capacidade de colonização do FMA com a riqueza e a diversidade filogenética da microbiota dos solos. A descrição dos perfis metabólicos dos solos contendo diferentes comunidades microbianas revelou a capacidade diferencial destes solos em utilizar diferentes fontes de carbono, além de demonstrar um aumento no metabolismo (evidenciado pelo consumo total de fontes de carbono) devido à inoculação do FMA. Em conjunto, os dados obtidos nos dois estudos indicam que a micorrização das plantas depende da ação de outros microrganismos do sistema solo, que atuam como um terceiro fator nesta simbiose e que a microbiota do solo responde a inoculação de um organismo exógeno, primordialmente aumentando seu metabolismo. Deve-se, portanto, considerar que a degradação biológica dos solos, com perda de sua biodiversidade, pode ter papel determinante no funcionamento de interações específicas e benéficas às plantas.

Palavras-chave: Simbiose; Diversidade microbiana; Funcionalidade do solo; Micorriza

ABSTRACT

Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbiota

Knowledge about the associations between microbial components of soil microbiota is of great interest in the scientific community, primarily related to microorganisms that are associated beneficially with plants. In this context, there is the arbuscular mycorrhiza, which is made of the association between mycorrhizal fungi (AMF) and a range of plant species. In this close interaction between these organisms, it is necessary to describe the importance of other components of the soil system, such as the microbiota formed by fungi and bacteria from the soil, to establish this interaction. The objectives of the studied that compose this thesis focused on the evaluation of AMF (*D. heterogama*, *R. clarus* and *Gi. rosea*) fitness, when inoculated in modified systems on the composition of the microbial communities in the soil, with alterations promoted by the ‘dilution to extinction’ methodology. In the first study, differential responses were found in root colonization capacity (% CM) of sugarcane by AMF inoculated in different systems, and the differential effect of AMFs, changing the communities of fungi and bacteria of soil. In a more detailed study, designed only to *R. clarus* in corn plants, it was found that higher microbial diversity of soil resulted in higher colonization of the host, especially in the initial period of plant development. In this experiment it was described the direct correlation of AMF colonization capacity with richness and phylogenetic diversity of soil microbiota. The description of the metabolic profiles of soil containing various microbial communities revealed the differential ability of these soils utilize different carbon sources, in addition to demonstrating an increase in metabolism (as evidenced by the total consumption of carbon sources) due to inoculation of the AMF. Together, the data from the two studies indicate that colonization of plants by AMF depends on the action of other microorganisms soil system, which act as a third factor in this symbiosis, and that the soil microbes respond to inoculation of an exogenous organism, primarily increasing its metabolism. One should therefore consider that the biological degradation of the soil, with loss of biodiversity, may have crucial role in the functioning of specific and beneficial interactions to plants.

Keywords: Symbiosis; Microbial diversity; Functionality of soil; Mycorrhiza

1 INTRODUÇÃO

É conhecido que as comunidades microbianas dos solos se alteram de acordo com o manejo adotado, porém esta resposta é muitas vezes negligenciada nas estratégias de uso e conservação de solos agrícolas. Pouco se sabe a cerca das interações microbiológicas no sistema radicular das culturas de interesse econômico e sobre os mecanismos que regem a perfeita integração entre os microrganismos benéficos às plantas, como fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e os demais constituintes da microbiota dos solos.

Estas interações podem resultar em aprimoramento da colonização da planta hospedeira, com consequente aproveitamento dos nutrientes e dos recursos hídricos, conferindo maior qualidade do solo com relação ao componente biológico. Ganha destaque neste contexto, os principais processos desempenhados pelos microrganismos nos solos, como ciclagem de nutrientes, controle de patógenos de solo que garante equilíbrio biológico, melhoria na agregação do solo e degradação de contaminantes.

No entanto, no cenário agrícola atual, as elevadas produtividades são acompanhadas de fatores que acarretam na alteração da comunidade microbiana dos solos, ocasionando seleção de grupos microbianos específicos, adaptados ao sistema de cultivo, e com uma consequente diminuição da biodiversidade do sistema, o que pode reduzir ou eliminar vários processos importantes para a manutenção e conservação dos mesmos.

Sabe-se que FMAs e bactérias do solo podem interagir de forma sinérgica (ANTURSSON et al., 2006) na rizosfera da maioria das plantas cultivadas, sendo estas interações fortemente influenciadas pelo sistema de manejo e pelas espécies vegetais presentes na área. Deriva-se deste conhecimento o fato de que a biodiversidade do solo pode, portanto, influenciar na colonização do FMA em sua planta hospedeira. Ainda, pode-se sugerir que a presença da interação entre FMAs e plantas é um modulador das comunidades microbianas dos solos.

Neste sentido, o objetivo desta tese foi avaliar estas interações, buscando correlações entre a diversidade biológica do solo e a eficiência da interação entre plantas e espécies de FMAs. Adicionalmente, a alteração na composição das comunidades microbianas causadas pela inoculação de FMAs foi determinada para diferentes sistemas biológicos manipulados nos solos.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Comunidade microbiana dos solos

Os microrganismos do solo constituem enorme fonte de diversidade, representados por seres vivos pertencentes aos três domínios da árvore filogenética (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*) (WOESE; FOX, 1977; WOESE, 1994; PACE et al., 2012). Estudos estimam que a abundância de microrganismos nos solos seja de aproximadamente 10^9 células por grama de solo (ROESCH et al., 2007). Pisa e colaboradores (2011) encontraram mais de 50 mil espécies em uma única amostra de solo utilizando técnicas moleculares de alto rendimento como o pirosequenciamento. A maior atividade biológica é observada nas áreas que estão sob influência das raízes, denominada de rizosfera (HILTNER, 1904 e citado por ANTOUN; PRÉVOST, 2005; PHILIPPOT et al., 2013), devido a alta disponibilidade de nutrientes que aumenta a biomassa microbiana nessa região (ANDREOTE et al., 2014).

Os estádios de desenvolvimento da planta, práticas de manejo adotadas e alterações nas condições ambientais também são fatores que contribuem para a estruturação de comunidades microbianas (WALLIS et al., 2010; CHAPARRO et al., 2014). Alguns estudos mostram, por exemplo, alterações na diversidade microbiana na rizosfera de plantas como milho e trigo de acordo com suas fases de desenvolvimento (BAUDOIN et al., 2002; HOULDEN et al., 2008) e atribuem as diferenciações da diversidade principalmente às mudanças na exsudação das plantas, em que os maiores teores de açúcar são liberados na fase de plântula e maior liberação de aminoácidos e compostos fenólicos no seu desenvolvimento posterior (CHAPARRO et al., 2013).

Fatores ambientais e bióticos atuam de forma determinante na estruturação de comunidades microbianas. Com destaque para a estruturação diferencial de tais comunidades de acordo com a espécie vegetal (HARDOIM et al., 2008; REDFORD et al., 2010), sendo que por vezes esta diferenciação é observada mesmo dentro de uma espécie, guiada por diferenças genotípicas das cultivares (INCEOGLU et al., 2010, 2011). Os componentes da rizosfera de cada espécie vegetal são responsáveis por sua composição microbiana (LUNDBERG et al., 2012) e a interação com outros microrganismos do solo também pode modular esta estruturação microbiana do solo (ARTURSSON et al., 2005), fato observado quando houve inoculação de patógenos de solo no sistema (MENDES et al., 2011).

Efeitos benéficos podem ser atribuídos à diversidade de microrganismos presentes no solo, onde estes atuam de forma conjunta sobre atividades como a decomposição de material orgânico, imobilização e disponibilização de nutrientes às plantas (como as bactérias

fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato mineral e fungos micorrízicos arbusculares), mineralização de compostos orgânicos, transformações inorgânicas (amonificação, nitrificação, desnitrificação, oxidação do enxofre), produção de fitohormônios, que auxiliam o crescimento vegetal ou por funções diretamente ligadas à inibição do desenvolvimento de patógenos e antagonistas de solo (TORO et al., 1996; BAREA et al., 1998; VÁZQUEZ et al., 2000; MINERDI et al., 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RONNEY et al., 2009; BRAZ, 2011; KHOKHAR et al., 2011).

A microbiota do solo, mais especificamente bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), é tradicionalmente avaliada de forma separada. Um exemplo é o trabalho realizado por Andrade e colaboradores (1998), que teve como objetivo a avaliação da interação de *Glomus mosseae* e dois isolados bacterianos (*Alcaligenes eutrophus* e *Arthrobacter globiformis*) em relação ao crescimento da população de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera. Os autores observaram que ocorre seletividade entre os isolados inoculados e o grupo de bactérias avaliadas. No entanto, em virtude dos estudos ocorrerem de forma isolada, não há critérios estabelecidos para estudá-los de forma sinérgica em associação às plantas, levando em consideração toda a microbiota.

1.2.2 Fungos micorrízicos arbusculares: importância e ecologia

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) são simbiotróficos obrigatórios pertencentes ao filo Glomeromycota, distribuídos em três classes (*Glomeromycetes*, *Archaeosporomycetes* e *Paraglomeromycetes*), cinco ordens (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Glomerales*, *Paraglomerales* e *Gigasporales*), 15 famílias, 38 gêneros (SCHÜßLER et al., 2001; MORTON; REDECKER, 2001; OEHL; SIEVERDING, 2004; WALKER; SCHÜßLER, 2004; SIEVERDING; OEHL, 2006; SPAIN et al., 2006; OEHL et al., 2008, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d; PALENZUELA et al., 2008; GOTO et al., 2014) e cerca de 270 espécies catalogadas em diversas condições de solo e ambiente (GOTO et al., 2010, 2014). Desta ampla diversidade, pelo menos 50% das espécies já foram encontradas em vários ecossistemas brasileiros, incluindo 99 táxons citados pelos autores Stürmer e Siqueira (2008).

Estes microrganismos colonizam a maioria das plantas terrestres formando uma associação simbiótica mutualística, denominada micorriza arbuscular (MA). Relata-se que essa associação surgiu a mais de 400 milhões de anos (BERBARA et al., 2006) e foi um processo importante para a evolução das plantas, com destaque para o período em que estas enfrentaram a transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre (BONFANTE,

GENRE, 2008). Os FMAs são encontrados em associação a grande maioria das espécies de planta e tem atividade favorável ao desenvolvimento vegetal em quase todas as situações de solo e ambiente, como pastagens, florestas, regiões de desertos e agroecossistemas (ÖPIK et al., 2006). Esta grande gama de plantas apresenta uma dependência bastante variável desta interação para seu suprimento nutricional (SIEVERDING, 1991).

A micorriza é um importante componente do sistema solo-planta, uma vez que a diversidade dos FMAs está intimamente ligada à diversidade e produtividade das comunidades vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A riqueza das espécies vegetais pode ser modulada por fatores edáficos ou climáticos, neste sentido se observa que a microbiota dos solos pode atuar de forma determinante na alteração da diversidade de plantas (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; SHEUBLIN et al., 2007; FACELLI et al., 2010).

Através das hifas e micélios do FMAs, a planta consegue realizar a absorção de nutrientes fora da zona de esgotamento do sistema radicular (região que surge devido à maior absorção de nutrientes pelas raízes), promovendo aumento da atividade biológica além do sistema radicular das plantas devido à manutenção de condições favoráveis neste ambiente e pela exsudação promovida pelos micélios (SCHÜBLER, 2002). A melhor ramificação do sistema radicular das plantas, em consequência da massa de micélios formada, é um parâmetro morfológico acentuado em raízes micorrizadas (ATKINSON et al., 1994; BERTA et al., 1995); o que resulta em melhoria de absorção de nutrientes do solo e fornecimento de fontes de carbono da planta para o FMA, garantindo a manutenção da MA (GRIGERA et al., 2007).

O estabelecimento dessa simbiose resulta na sequência de eventos coordenados pelo fungo, pela planta e suas interações, culminando com uma relação simbiótica mutualista perfeita no que diz respeito à morfologia, bioquímica e funcionalidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Diversos processos estão envolvidos na comunicação química durante o estágio pré-simbiótico da associação. Fatores referentes à sinalização, à penetração e consequente colonização intra-radicular tem sido elucidados nos últimos anos. No entanto os mecanismos moleculares que regulam o princípio, o desenvolvimento e a funcionalidade da micorriza são em grande parte desconhecidos (LAMBAIS, 2006).

Dentre as famílias de FMAs que apresentam maior número de espécies descritas em sistemas agrícolas se destacam: Acaulosporaceae, Gigasporaceae e Glomeraceae. Porém, podem ocorrer algumas preferências entre espécies vegetais, como em cana-de-açúcar, por exemplo, os grupos descritos acima se destacam com maior número de espécies,

encontrando-se em menor quantidade algumas espécies das famílias Ambisporaceae, Diversisporaceae, Pacisporaceae e Paraglomeraceae (AZEVEDO, 2008).

Trabalhos relatam que a cultura do milho promove a exsudação de compostos biológicos que proporciona o aumento das taxas de colonização micorrízica e densidade de esporos de FMAs (SIQUEIRA; KLAUBERG-FILHO, 2000). Culturas como a soja, liberam exsudatos radiculares que contém moléculas que não estimulam de forma satisfatória a germinação e crescimento de esporos quando comparado com a cultura do milho (BENEDETTI et al., 2005; FARIA et al., 2009). Portanto, a espécie vegetal estabelecida na área influencia nas taxas de colonização micorrízica e diversidade de FMAs. O trabalho realizado por Angelini e colaboradores (2012) mostrou que a cultura do milho apresentou melhor estabelecimento da simbiose com elevada colonização e maior número de espécies identificadas de FMAs.

Pouco se sabe sobre a interação destes grupos de FMAs com outros microrganismos do solo. Em cana-de-açúcar, é descrita a interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Glomus clarum* (PAULA et al., 1991), onde os autores verificaram que a inoculação desta espécie de FMA, junto com uma mistura de bactérias diazotróficas, resultou em maior colonização micorrízica e aumento da população de *G. diazotrophicus* na parte aérea da cultura, evidenciando o sinergismo entre os microrganismos. Acredita-se que exista uma gama muito maior de interações entre a microbiota do solo e os FMAs na rizosfera das plantas.

Algumas espécies e famílias de FMAs foram agrupadas de acordo com características funcionais, baseadas na diversificação de condições relacionadas à sua sobrevivência, sucessão e estrutura espacial. Este agrupamento propôs a divisão dos FMAs em três grupos: os competidores, tolerantes a estresses ou ruderais, denominada de estrutura C-S-R (CHAGNON et al., 2013), conforme apresentado na figura 1.

Esta estrutura foi organizada devido à resposta de cada grupo de FMAs as situações variáveis de distúrbio ou estresse. Os gêneros de FMAs foram organizados devido as suas características, por exemplo, os ruderais que apresentam rápida geração de propágulos e rotatividade de hifas para garantir sua sobrevivência. Os competidores, que se estabelecem em condições de limitação de recursos e apresentam a capacidade de atrasar sua reprodução para armazenar recursos (OEHL et al., 2009; KLIRONOMOS, 2001; PRINGLE; BEVER, 2002), e

os tolerantes a estresse que tem baixo custo metabólico e conseguem resistir a estresses ambientais (HART; READER, 2002; MAHERALI; KLIRONOMOS, 2007).

Este estudo foi baseado na capacidade dos FMAs de cada grupo em se associar as comunidades vegetais e podem se encaixar em estudos ecológicos relacionados à interação de FMAs com os componentes bióticos do sistema, inclusive a comunidade microbiana de solos.

Figura 1 - Estrutura C-S-R e identificação de características fenotípicas dos FMAs considerados competidores, tolerantes a estresse ou ruderal. (Adaptado de CHAGNON et al., 2013). Os grupos destacados (competidores e ruderal) foram abordados no presente estudo

Técnicas de análise independentes de cultivo podem levar a uma descrição mais ampla das relações dos FMAs com a comunidade microbiana dos solos e plantas, propiciando o entendimento dos processos que governam esta interação (MUYZER; SMALLA, 1998).

Com os resultados obtidos, pode-se observar aspectos relacionados ao padrão de agrupamentos dos microrganismos e inferir sobre suas relações ecológicas (HELGASON et al., 1998), com a finalidade de analisar como a presença dos FMAs pode ser relacionada a capacidade dos ecossistemas de manterem a resiliência de seus processos (FITTER, 2005). Estudos relacionados aos solos com presença de plantas hospedeiras tornam-se bastante atrativos, devido a grande atividade microbiana que resulta no estabelecimento de diversas relações planta-solo-microrganismos.

1.2.3 Microbiota dos solos e fungos micorrízicos arbusculares

Os grupos microbianos que interagem com os FMAs na rizosfera de plantas são geralmente pertencentes aos saprófitos e simbiontes, e estas interações podem ser prejudiciais, neutras ou benéficas para os microrganismos ou plantas hospedeiras (BAREA et al., 2002). A interação ocorre predominantemente com os microrganismos endofíticos, que colonizam os tecidos do sistema radicular, conferindo proteção e promovendo o crescimento das plantas (STURZ; NOVAK, 2000), além de interagir com bactérias fixadoras de nitrogênio, de vida livre ou simbiótica (BAREA, 1997).

Os microrganismos denominados rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) formam o grupo mais importante de bactérias presente na rizosfera das plantas, desenvolvendo importantes funções para manutenção e crescimento vegetal e estabelecendo a qualidade do solo, em aspecto biológico (KLOEPPER et al., 1991; BASHAN; HOLGUIN, 1998; BAREA, 2000; JEFFRIES; BAREA, 2001).

Grupos bacterianos que desempenham efeito benéfico no estabelecimento e manutenção da micorriza são chamados de bactérias que “ajudam” a micorriza (termo em inglês: *Mycorrhiza Helper Bacteria – MHB*), que foi designado primeiramente para as ectomicorrizas, que é o nome dado à associação simbiótica entre fungos ectomicorrízicos e espécies arbóreas (GARBAYE, 1994; GRYNDLER et al., 2000).

No entanto, estudos relatam que grupos bacterianos podem favorecer a germinação de esporos de FMAs, como observado para a espécie *Glomus clarum* (atualmente *R. clarus*) devido à produção de alguns compostos (XAVIER; GERMIDA, 2003). Estes compostos afetam diretamente a fisiologia das plantas através do aumento da permeabilidade das células das raízes, facilitando a penetração do fungo e o estabelecimento da micorriza nas plantas (VIVAS et al., 2003).

Espécies de bactérias foram detectadas no interior de esporos de FMAs, sendo que dentre estas houve predominância dos gêneros *Burkholderia*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas* associados a esporos de algumas espécies de FMAs, além da descrição de endossimbionte em isolados de espécies de FMAs pertencentes à família Gigasporaceae (BIANCIOTTO et al., 1996, 2003; BHARADWAJ et al., 2008).

Recentemente, Desiró e colaboradores (2014) detectaram endobactérias em esporos de FMA da espécie *Gigaspora margarita*, coexistindo na mesma célula com forte influência na aptidão do FMA. Estas observações indicam que a fisiologia dos FMAs pode ser regulada

pela atividade de bactérias que atuam em proximidade a estes organismos. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito destas interações na colonização da planta pelos FMAs.

Algumas bactérias podem afetar ou impedir a germinação de esporos de FMAs (MOSSE, 1959; DANIELS; TRAPPE, 1980; MAYO et al., 1986; CARPENTER-BOGGS et al., 1995) ou apresentarem relações de parasitismo (JEFFRIES, 1997). Barea e colaboradores (1998) relataram que uma substância antifúngica produzida por *Pseudomonas* spp. não afetou a germinação de esporos e a formação da micorriza pela espécie *G. mosseae*.

O FMA *G. mosseae* foi avaliada quanto a sua capacidade de proteção contra patógenos de solo, e plantas de amendoim inoculadas com o FMA apresentaram maior biomassa vegetal e redução nas populações de *Rhizoctonia solani* (Kühn) e *Fusarium solani* (Mart.) (ABDALLA; ABDEL-FATTAH, 2000). Este efeito que resulta da interação de FMAs e patógenos de solo pode ser devido à competição por sítios de infecção (ABDEL-FATTAH; SHABANAM, 2002) ou nutricional, que foi considerado um efeito indireto (CARDOSO; KUYPER, 2006).

As bactérias também respondem a estímulos oriundos da presença desses fungos nas plantas, podendo ocorrer variações no número de espécies bacterianas associadas entre espécies de FMAs ou entre isolados da mesma espécie (ANDRADE et al., 1997; ARTURSSON et al., 2005), o que causa efeito na composição das espécies provavelmente devido exsudação da raiz ou de hifas (GARBAYE, 1991). Compostos exsudados pelas hifas de FMAs, como a glicoproteína glomalina, também influenciam na composição da comunidade microbiana na chamada hifosfera, que é a região do solo influenciada pelas hifas de FMAs (BOMBERG et al., 2003).

No entanto, mesmo com elevado número de bactérias que se associam com FMAs, pouco se sabe sobre as funções e atividades que desempenham *in situ* (ARTURSSON et al., 2005). As funções desenvolvidas pela microbiota presente na rizosfera podem afetar não somente a planta hospedeira, como também os demais microrganismos que constituem a comunidade microbiana do solo (LYNCH, 1990; KLOEPPER et al., 1991). Como o efeito sobre a comunidade de microrganismos oxidantes e redutores de Mn, que ocasionaram respostas na nutrição das plantas (POSTA et al., 1994), demonstrado no trabalho de Nogueira e Cardoso (2002), em que plantas de soja micorrizadas apresentaram maior crescimento e os efeitos da toxicidade de Mn reduzidos quando cultivada em comunidade microbiana reestabelecida.

No intuito de inferir neste tema, um trabalho mostrou a avaliação da comunidade bacteriana associada à FMAs em plantas de trevo e trigo, com a finalidade de se observar quais grupos da comunidade respondem a inoculação de *G. mosseae*. Neste estudo, os autores aliaram a identificação taxonômica e a atividade metabólica da microbiota e observaram que os grupos bacterianos foram distintos com relação à inoculação do FMA e a espécie vegetal (ARTURSSON et al., 2005).

Pouco se conhece sobre benefícios específicos que os FMAs podem fornecer às plantas ou aos próprios microrganismos que se associam a eles, sendo este conhecimento dificultado pela impossibilidade de cultivo dos FMAs em meio de cultura. No entanto, as técnicas independentes de cultivo permitem a identificação das bactérias estimuladas pelos FMAs (ARTURSSON et al., 2005), de forma quantitativa e qualitativa. Isto pode auxiliar na identificação das alterações na microbiota devido as mudanças na exsudação radicular de plantas colonizadas por FMAs (MARSCHNER et al., 1997; CORDIER et al., 1999; HODGE, 2000) ou devido a inoculação de isolados de FMAs exógenos ao sistema.

Os mecanismos que atuam na estabilização da simbiose entre plantas e FMAs são desconhecidos, no entanto, sabe-se que ocorre uma seleção da planta hospedeira por parceiros mais cooperativos e esta mesma seleção é feita com relação aos FMAs, na escolha do melhor hospedeiro (KIERS et al., 2011; BEVER et al., 2009). A manutenção do mutualismo é determinada pelo nível com que cada organismo controla a aptidão do parceiro (EDWARDS et al., 2006).

O entendimento dos fatores que podem contribuir para a continuidade destas cooperações é uma questão ampla. Principalmente relacionado à capacidade evolutiva de escolha do parceiro pelos simbioss, além da importância da especialização ou diversificação das funções envolvidas no processo (WERNER et al., 2014). O quanto esta seletividade e cooperação entre os parceiros podem influenciar e direcionar as interações entre bactérias, fungos e planta hospedeira é algo ainda carente de estudos. Associação com endofíticos geralmente o faz indispensável na interação planta-microrganismos, devido a importância das funções que desempenha (PARTIDA-MARTINEZ et al., 2007; LACKNER et al., 2011), e a capacidade de promover o armazenamento de compostos oriundos da planta para posterior utilização, relaciona-se à associação com os FMAs (KIERS et al., 2011; HAMMER et al., 2011).

Alguns estudos propõem a utilização das chamadas teorias de mercado para ampliar o entendimento destas interações mutualistas (BSHARY et al., 2002; AKÇAY, SIMMS, 2011; LEIMAR et al., 2010). Estas teorias são baseadas em seis estratégias para manutenção

do comportamento de cooperação biológica, as quais apresentam definições voltadas para o aspecto de mercados econômicos.

Como exemplos destas estratégias têm-se à necessidade da presença de comerciantes que forneçam produtos distintos, ou seja, para que exista uma cooperação biológica como o mutualismo (BSHARY et al., 2002; AKÇAY, SIMMS, 2011), deve-se ter diferentes espécies de organismos com vantagens a oferecer para ao seu parceiro em troca de algum benefício (geralmente ligado a fator nutricional); a qualidade dos produtos fornecidos pelos comerciantes deve ser considerada, ou seja, os componentes nutricionais disponíveis para a manutenção da interação entre os simbioses devem favorecer os parceiros, e a escolha dos comerciantes deve se basear nos melhores preços e produtos, ou seja, a capacidade de escolha do melhor parceiro deve levar em consideração a qualidade do componente nutricional fornecido e o quanto esta interação poderá beneficiar e gerar esforços de cada parceiro para mantê-la (WERNER et al., 2014).

1.2.4 Invasão microbiana e a organização do sistema solo

O efeito da biodiversidade de comunidades com relação à introdução e ao estabelecimento de espécies exógenas no sistema foi observado em comunidades de plantas (ELTON, 1958; LEVINE, D'ANTONIO, 1999; FARGIONE; TILMAN, 2005) e de microrganismos, estes avaliados no corpo humano (GOPINATH et al., 2012) e no solo (VAN ELSAS et al., 2012; WICKER et al., 2012).

O microrganismo invasor, quando encontra condições aptas a sua perpetuação e disseminação no novo ambiente pode ter impacto neutro, prejudicial ou benéfico (MALLON et al., 2015). De acordo com a teoria de nicho, a competição por recursos nutricionais é um dos fatores que pode limitar a capacidade de uma espécie introduzida no sistema de obter algum sucesso, sendo esta probabilidade também menor em uma comunidade com elevada diversidade (TILMAN, 1999; TILMAN et al., 2001; KENNEDY et al., 2002; LEVINE et al., 2003; ; FARGIONE; TILMAN, 2005).

Isto ocorre principalmente devido à escassez de nutrientes limitantes a multiplicação celular, sendo que sua baixa disponibilidade limita sua disponibilidade para as espécies introduzidas (TILMAN, 1999). Ademais, a comunidade com maior diversidade apresenta elevada redundância de processos funcionais, o que garante variabilidade nos consumidores de nutriente frente às variações ambientais, limitando a ocorrência temporal de nichos de consumo (VAN ELSAS et al., 2006).

A inoculação de microrganismos exógenos podem ainda estimular mudanças na comunidade microbiana residente (MALLON et al., 2015). Neste aspecto, além da caracterização da diversidade e da composição das comunidades microbianas, torna-se importante a observação de sua resposta quanto a introdução de microrganismo invasor.

Baseado na utilização total dos recursos é possível caracterizar uma comunidade microbiana por meio da determinação do nicho da comunidade, ou '*community niche*', que mede a capacidade de consumo de recursos da comunidade quando submetida a alterações ambientais, como por exemplo, quando inoculada com um organismo exógeno. Esta estimativa fornece evidências sobre a capacidade que o nicho de recursos tem em modelar a funcionalidade do ecossistema, de forma a responder ao estímulo, sendo esta resposta dependente de sua biodiversidade (SALLES et al., 2009). Este parâmetro calculado pode ser utilizado para correlacionar a riqueza de espécies com a complementariedade de recursos utilizados em cada situação (MALLON et al., 2015) e indica a importância da complementariedade dos componentes da comunidade para uma eficiente funcionalidade do sistema (SALLES et al., 2012).

Sistemas compostos por comunidades microbianas com elevada diversidade foram submetidas à inoculação de microrganismos exógenos, principalmente patógenos. A resposta obtida no sistema que avaliou a capacidade de invasão por *Pseudomonas aeruginosa* em trigo, mostrou a ineficiência do estabelecimento do patógeno quando inoculado em solos com elevada diversidade microbiana (MATOS et al., 2005). Efeito similar aconteceu para a espécie *Ralstonia solanacearum* em tomate (IRIKIIN et al., 2006). A alta diversidade das comunidades de bactérias e arqueias também foi descrita como importante na caracterização do solo como supressivo, atuando de forma determinante no desenvolvimento de patógenos, como observado para a espécie *Rhizoctonia solani* em solos cultivados com beterraba (MENDES et al., 2011).

Num estudo focado neste aspecto, a comunidade microbiana do solo foi submetida ao método de 'diluição para extinção' de grupos microbianos, dando origem a tratamentos com variações na composição das comunidades microbianas na forma de um gradiente de diversidade. Neste sistema, e a sobrevivência da espécie de *Escherichia coli* O157: H7 foi inversamente proporcional à diversidade das comunidades microbianas (VAN ELSAS et al., 2012). A resistência à invasão neste aspecto tem a função de manter as funções que suportam os ecossistemas terrestres (VITOUSEK et al., 1996).

Devido à amplitude de trabalhos realizados com inoculação de microrganismos patogênicos em situações de maior diversidade microbiana no solo, e em decorrência da

importância da manutenção da biodiversidade do solo e de microrganismos benéficos às plantas e ao sistema microbiano, utilizou-se no presente estudo método similar ao desenvolvido por Van Elsas e colaboradores (2012). Com esta metodologia, a microbiota do solo foi constituída pela variação na composição de suas comunidades, as quais posteriormente receberam os inóculos de cada espécie de FMA, para observação dos efeitos da perda da biodiversidade do solo no estabelecimento das micorrizas arbusculares.

A importância da manutenção de diversidade microbiana do solo no desempenho da colonização micorrízica beneficia o sistema solo-planta, sendo este aspecto necessário e relevante para a qualidade dos solos e para aprimorar o conhecimento sobre as funções que regem as interações planta-microbiota-FMAs.

1.2.5 Cana-de-açúcar e milho: grandes culturas e plantas modelo

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de cana-de-açúcar (DOSSA, 2009). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, a produção brasileira no ano de 2015 foi aproximadamente 73 ton. ha⁻¹, com aumento de 4,3% em relação à safra anterior. O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, responsável por 53% da produção do Brasil, com 51% da área nacional plantada (4.648 mil hectares). A principal finalidade da produção é a obtenção de sacarose, a qual é posteriormente usada para produção de etanol e açúcar, com 57,8% e 71,8% da produção concentrada na região Sudeste do país, respectivamente (CONAB, safra 2015/2016).

A cultura do milho também é de grande extensão, chegando a 15 mil hectares de área plantada (safra 2015/2016), de onde se obtém aproximadamente 82 mil toneladas. A cultura do milho é uma das mais antigas do mundo, com escavações arqueológicas e geológicas que relatam seu cultivo a mais de cinco mil anos. Esta cultura é plantada em escala comercial desde a latitude de 58° Norte (União Soviética) até 40° Sul (Argentina), segundo relatos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e merece destaque no mercado mundial, visto que é matéria prima para diversos produtos utilizados na alimentação humana e de animais, como aves e suínos.

A microbiota do solo é importante para o estabelecimento dos cultivos agrícolas, devido à sucessão de culturas, ou cortes e reformas dos canaviais, sendo, portanto, responsáveis por transformações inorgânicas, mineralização de compostos orgânicos e ciclagem de nutrientes para formas prontamente disponíveis para absorção das culturas (RONNEY et al., 2009; BRAZ, 2011; KHOKHAR et al., 2011). A associação com FMAs é

um dos pilares do aprimoramento do cultivo das plantas, principalmente nos aspectos relacionados ao fósforo no solo (BERBARA et al., 2006).

A estrutura de comunidades microbianas em solos onde ocorre plantio de cana-de-açúcar é altamente variável e o maior o tempo de permanência da cultura na área, aumenta a quantidade de bactérias ocupando a região próxima das raízes das plantas (SAVARIO et al., 2010). A extensa diversidade de bactérias em solos cultivados com cana-de-açúcar foi descrita como sendo composta de organismos de onze filos bacterianos, sendo que os mais abundantes foram *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria*, nesta ordem (DINI-ANDREOTE et al., 2010), devido a este fato torna-se importante avaliar a interação dos grupos bacterianos presentes no solo com espécies de FMAs inoculadas em cultivo de cana-de-açúcar, em busca de melhor entendimento dos fatores que moldam esta interação e sua dinâmica ao longo do tempo.

A esporulação dos principais gêneros de FMAs, com destaque para *Acaulospora*, *Gigaspora* e *Glomus*, foi alterada de acordo com a variedade de cana-de-açúcar, o pH do solo e o período no qual foi feita a avaliação (SRIKUMAR et al., 2009), demonstrando a sensibilidade destes FMAs. Neste sentido, observou-se uma correlação positiva entre a maior porcentagem de raízes colonizadas, densidade de esporos de FMAs e pH do solo cultivado com cana-de-açúcar quando avaliado na estação do verão e a correlação negativa destas variáveis avaliadas no inverno (SIVAKUMAR, 2013), o que reforça a importância de distintos períodos de avaliação dos fatores que serão correlacionados.

As culturas de milho, feijão, sorgo, soja e cana-de-açúcar respondem a inoculação de FMAs e são facilmente colonizadas por várias espécies de FMAs (KHALIL et al., 1994; BERBARA et al., 2006). Bactérias fixadoras de nitrogênio como *Azospirillum* spp. são importantes em plantas de milho e podem reduzir a necessidade de fertilização nitrogenada, manejo que promove o aumento do custo de produção e acarreta danos ambientais (OKON; VANDERLEYDEN, 1997; HUNGRIA et al., 2010), além de alterar a estrutura de comunidades microbianas, inclusive de FMAs (BERBARA et al., 2006).

Alguacil e colaboradores (2008) em estudo realizado em condições subtropicais encontraram maiores taxas de colonização micorrízica em culturas, inclusive milho, submetidos ao sistema de plantio direto que espera-se reduzir o impacto na biodiversidade do solo, pois promove a manutenção da rede de micélios dos FMAs que é responsável pela colonização e transferência de nutrientes entre várias plantas simultaneamente, em alguma etapa do ciclo da espécie vegetal (NEWMAN, 1988).

Nas áreas com cultivos de milho, utiliza-se cultivares geneticamente modificados, que possuem o gene codificador para a molécula com potencial inseticida (gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* - Bt). Genótipos distintos de milho influenciaram diferencialmente a estrutura de comunidades de FMAs (TAN et al., 2011). No entanto, em estudo posterior demonstrou-se que após cultivo de milho modificado geneticamente (milho *Bt*) durante período de cinco anos e posterior plantio de uma linhagem convencional sobre a palhada do milho *Bt*, que foi cultivado durante os cinco anos, não foi relatado alterações na diversidade da comunidade de FMAs do solo e raízes, ou seja, o efeito sobre a diversidade desta comunidade microbiana foi amenizado pelo plantio da linhagem convencional (ZENG et al., 2014).

Este fato demonstra a plasticidade desta comunidade de fungos em se alterar de acordo com as características das plantas e conseqüentemente de seus exsudatos. Comunidades microbianas de plantas de milho *Bt* em relação a sua linhagem parental foram acessadas e os fatores responsáveis pela estruturação da microbiota foram os tipos de solos e as fases de desenvolvimento da cultura (COTTA et al., 2013).

As espécies de FMAs *Acaulospora longula*, *A. rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae* e *Glomus caledonium* foram encontradas em solos com baixa concentração de fósforo cultivados com genótipos de milho eficientes na absorção deste nutriente, indicando que esta característica genotípica apresentou-se como um estimulante de FMAs.

O método molecular para o estudo da estrutura da comunidade microbiana, denominado de eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE), gerou bandas exclusivas de *Acaulosporaceae* e *Glomaceae* para genótipos eficientes na absorção de fósforo no solo com baixa concentração deste nutriente (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns autores atribuem este fato à exsudação característica destes genótipos em condição de deficiência do nutriente (MARSCHNER, 1998; BAREA et al., 2005).

Diante do exposto e devido à dinâmica microbiológica relacionada às plantas de cana-de-açúcar e milho, que são culturas de importância econômica e cultural, justifica-se o uso destas culturas para a composição dos sistemas utilizados como o modelo deste estudo. Para cada planta hospedeira utilizada, empregou-se comunidade microbiana de solo oriundo da própria região (condições tropical e temperada), bem como genótipos cultivados em cada uma das regiões onde o trabalho foi desenvolvido. Neste sentido, pode se verificar o padrão resultante da combinação de espécies de FMAs inoculadas com a microbiota dos solos e sua resposta quanto à capacidade de colonização micorrízica em cada sistema e planta hospedeira.

Referências

- ABDALLA, M.E.; ABDEL-FATTAH, G.M. Influence of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the development of peanut pod rot disease in Egypt. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, p. 29–35, 2000.
- ABDEL-FATTAH, G.M.; SHABANAM, Y.M. Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 109, p. 207–215, 2002.
- AKÇAY, E.; SIMMS, E.L. Negotiation, sanctions, and context dependency in the legume-*Rhizobium* mutualism. **America Naturalist**, Chicago, v. 178, n. 1, p. 1–14, 2011.
- ALGUACIL, M.M.; LUMINI, E.; ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCÍA, J.R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. **Ecological Applications**, Washington, v. 18, n. 2, p. 527–536, 2008.
- ANDRADE, G.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 202, p. 79–87, 1998.
- ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.L. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 192, p. 71–79, 1997.
- ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T. DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 6, p. 528–539, 2014.
- ANGELINI, G.A.R.; LOSS, A.; PEREIRA, M.G.; TORRES, J.L.R.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de Cerrado sob plantio direto e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 115–130, 2012.
- ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z.A. (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 1–38.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Combined bromodeoxyuridine immunocapture 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**, Hoboken, v. 7, p. 1952–1966, 2005.
- _____. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2006.
- ATKINSON, S.; BERTA, G.; HOOKER, J. E. Impact of mycorrhizal colonization on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: ALS, Birkhäuser Verlag, 1994. p. 47–60.

AZEVEDO, L.C.B. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BAREA, J.M. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: TOUTANT, J.P.; BALAZS, E.; GALANTE, E.; LYNCH, J.M.; SCHEPERS, J.S.; WERNER, D.; WERRY, P.A. (Ed.). **Biological resource management: connecting science and policy**. Nancy: Springer; OECD; INRA, 2000. p. 110–125.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 343–351, 2002.

BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: GANGE, A.C.; BROWN, V.K. (Ed.). **Multitrophic interactions in terrestrial systems**. Oxford: Blackwell Science, 1997. p. 65–77.

BAREA, J.M.; WERNER, D.; AZCÓN-AGUILAR, C., AZCÓN, R. Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbioses in sustainable agriculture. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Agriculture, forestry, ecology and the environment**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2005. p. 199–222.

BAREA, J.M.; ANDRADE, G.; BIANCIOTTO, V.V.; DOWLING, D.; LOHRKE, S.; BONFANTE, P. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of pseudomonas strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2304–2307, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol - PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1225–1228, 1998.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 19, p. 135–145, 2002.

BERBARA, R. .L.; SOUZA, F.A. de; FONSECA, H.M.A.C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 53-88.

BERTA, G.; TROTTA, A.; FUSCONI, A.; HOOKER, J.E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D.; GIOVANNETTI, M.; MORINI, S.; FORTUNA, P.; TISSERANT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, p. 281–293, 1995.

BENEDETTI, T.; ANTONIOLLI, Z.I.; GIRACCA, E.M.N.; STEFFEN, R.B. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares na cultura do milho após uso de espécies de plantas de cobertura de solo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 4, n. 1, p. 44-51, 2005.

BEVER, J.D.; RICHARDSON, S.C.; LAWRENCE, B.M.; HOLMES, J.; WATSON, M. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 13–21, 2009.

BHARADWAJ, D.P.; LUNDQUIST, P.; PERSSON, P.; SADHNA ALSTRÖM, S. Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 310–322, 2008.

BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; BONFANTE, P.; VANDAMME, P. ‘*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*’ gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 121–124, 2003.

BIANCIOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H.V.; BONFANTE, P. An obligatory endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligatory intracellular bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3005–3010, 1996.

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

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

BOMBERG, M.; JURGENS, G.; SAANO, A.; SEM, R.; TIMONEN, S. Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 163–171, 2003.

BSHARY, R.; GRUTTER, A.S. Experimental evidence that partner choice is a driving force in the payoff distribution among cooperators or mutualists: The cleaner fish case. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 130–136, 2002.

CARDOSO, I.M.; KUYPER, T.W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 116, p. 72–84, 2006.

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

CHAGNON, P.L.; BRADLEY, R.L.; MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J.N. A trait-based 475 framework to understand life history of mycorrhizal fungi. **Trends in Plant Science**, London, v. 18, p. 476–491, 2013.

CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; BAKKER, M.G.; SUGIYAMA, A.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. 55731, 2013.

CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **ISME Journal**, New York, v. 8, p. 790-803, 2014.

CORDIER, C.; LEMOINE, M.C.; LEMANCEAU, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. The beneficial rhizosphere: a necessary strategy for microplant production. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 530, p. 259–265, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, segundo levantamento, agosto/2015. Brasília, 2015.

COTTA, S.R.; DIAS, A.C.F.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; VAN ELSAS, J.; SELDIN, L. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 103, p. 589–601, 2013.

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

DESIRÓ, A.; SALVIOLI, A.; NGONKEU, E.L.; MONDO, S.J.; EPIS, S.; FACCIO, A.; KAECH, A.; PAWLOWSKA, T.E.; BONFANTE, P. Detection of novel intracellular microbiome hosted in arbuscular mycorrhizal fungi. **ISME Journal**, New York, v. 8, 257–270, 2014.

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**, Dordrecht, v. 336, p. 337-349, 2010.

DOSSA, D. **Projeções do agronegócio, Brasil 2008/09 a 2018/19**. Brasília: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 127 p. 2009.

EDWARDS, D.P.; HASSALL, M.; SUTHERLAND, W.J.; YU, D.W. Selection for protection in an ant-plant mutualism: host sanctions, host modularity, and the principal-agent game. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, Bethesda, v. 273, n. 1586, p. 595–602, 2006.

ELTON, C.S. **The ecology of invasions by animals and plants**. London: Methuen, 196p. 1958.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

FACELLI, E.; SMITH, S.E.; FACELLI, J.M.; CHRISTOPHERSEN, H.M.; ANDERW SMITH, F. Underground friends or enemies: model plants help to unravel direct and indirect effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant competition. **New Phytologist**, Hoboken, v. 185, p. 1050-1061, 2010.

FARGIONE, J.E.; TILMAN, D. Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 604–611, 2005.

FARIA, T.M.; GOMES JÚNIOR, F.G.; SÁ, M.E.; CASSIOLATO, A.M.R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1624-1633, 2009.

FITTER, A.H. Darkness visible: reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, London, v. 93, p. 231-243, 2005.

GARBAYE, J. Biological interactions in the mycorrhizosphere. **Experientia**, Berlin, v. 47, p. 370-375, 1991.

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

GOPINATH, S.; CARDEN, S.; MONACK, D. Shedding light on Salmonella carriers. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 7, 2012.

GOTO, B. T. Aspectos gerais da classificação. Laboratório de Biologia de Micorrizas. Available at: <http://glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas#l1/c229j>. 2014.

GOTO, B.T.; SILVA, G.A.; YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C. Checklist of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) in the Brazilian semiarid. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 113, p. 251-254, 2010.

GRIGERA, M.S.; DRIJBER, R.A.; WIENHOLD, B.J. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in soil coincides with the reproductive stages of maize. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1401-1409, 2007.

GRYNDLER, M.; HRSELOVÁ, H.; STRÍTESKÁ, D. Effect of soil bacteria on growth of hyphae of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus claroideum*. **Folia Microbiology**, Dordrecht, v. 45, p. 545-551, 2000.

HAMMER, E.C.; PALLON, J.; WALLANDER, H.; OLSSON, P.A. Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 236-244, 2011.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 463-471, 2008.

HART, M.M.; READER, R.J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Hoboken, v. 153, p. 335-344, 2002.

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

HODGE, A. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, p. 91-96, 2000.

HOULDEN, A.; TIMMS-WILSON, T.M.; DAY, M.J.; BAILEY, M.J. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 193–201, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E. M; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 331:413-425. 2010.

INCEOGLU, O.; SALLES, J.F.; VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J.D. Effect of plant genotype and growth stage on the β -proteobacterial community associated with different potato cultivars in two fields. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 3675–3684, 2010.

INCEOGLU, O.; AL-SOUD, W.A.; SALLES, J.F.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, p. 23321, 2011.

IRIKIIN, Y.; NISHIYAMA, M.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Rhizobacterial community-level, sole carbon source utilization pattern affects the delay in the bacterial wilt of tomato grown in rhizobacterial community model system. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 27–32, 2006.

JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: HOCK, B. (Ed.). **The mycota**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. v. 9: Fungal associations, p. 95–113.

KENNEDY, T.A.; NAEEM, S.; HOWE KATHERINE, M.; KNOPS JOHANNES.; M.H.; TILMAN, D.; REICH, P.B. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. **Nature**, London, v. 417, p. 636–638, 2002.

KHALIL, S.; LOYNACHAN, T.E.; TABATABAI, M.A. Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. **Agronomy Journal**, Madison, v. 86, p. 949–958, 1994.

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

KIERS, E.T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J. A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. **Science**, Washington, v. 333, p. 880–882, 2011.

KLIRONOMOS, J.N.; HART, M.M.; GURNEY, J.E.; MOUTOGLIS, P. Interspecific differences in the tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi to freezing and drying. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p. 1161–1166, 2001.

KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICK, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 315–326.

LACKNER, G.; MOEBIUS, N.; PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; BOLAND, S.; HERTWECK, C. Evolution of an endofungal lifestyle: deductions from the *Burkholderia rhizoxinica* genome. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 210, 2011.

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 405-413, 2006.

LEIMAR, O.; HAMMERSTEIN, P. Cooperation for direct fitness benefits. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 365, n. 1553, p. 2619-2626, 2010.

LEVINE, J.M.; D'ANTONIO, C. Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility. **Oikos**, Copenhagen, v. 87, p. 15-26, 1999.

LEVINE, J.M.; VILA, M.; D'ANTONIO, C.; DUKES, J.S.; GRIGULIS, K.; LAVOREL, S. Mechanisms underlying the impact of exotic plant invasions. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 270, p. 775-781, 2003.

LUNDBERG, D.S.; LEBEIS, S.L.; PAREDES, S.H.; YORUSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; RIO, T.G.; DGAR, R.C.; EICKHORST, T.; LEY, R.E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, London, v. 488, p. 86-90, 2012.

LYNCH, J.M. **The rhizosphere**. New York: John Wiley, 11-34p. 1990.

MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J.N. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. **Science**, Washington, v. 316, p. 1746-1748, 2007.

MALLON, C.A.; POLY, F.; LE ROUX, X.; MARRING, I.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. **Ecology**, New York, v. 96, p. 915-926, 2015.

MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 56, p. 203-207, 1998.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; HIGASHI, R.M. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, p. 11-20, 1997.

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. **Mycology**, Lawrence, v. 78, p. 426-431, 1986.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VOORT, M. VAN DER; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; SANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington; v. 332, p. 1097-1100, 2011.

MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A.; BONFANTE, P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 725–732, 2001.

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

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 625 p.

_____. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. The need for DGGE and TGGE in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 127–141, 1998.

NEWMAN, E.I. Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. **Advances in Ecological Research**, San Diego, v. 18, p. 243-270, 1988.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 10, n. 10, p. 407-411, 1995.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1605-1612, 2002.

OEHL, F.; SIEVERDING, E. *Pacispora*, a new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes*. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 78, p. 72–82, 2004.

OEHL, F.; SOUZA, F.; SIEVERDING, E. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza forming *Glomeromycetes*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 106, p. 311-360, 2008.

OEHL, F.; SILVA, G.A.; GOTO, B.T.; SIEVERDING, E. *Glomeromycetes*: three new genera and glomoid species reorganized. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 116, p. 75–120, 2011a.

OEHL, F.; SILVA, G.A.; GOTO, B.T.; MAIA, L.C.; SIEVERDING, E. *Glomeromycota*: two new classes and a new order. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 116, p. 365–379, 2011b.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MADER, P.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 134, p. 257–268, 2009.

OEHL, F.; SILVA, D.K.A.; MAIA, L.C.; SOUZA, N.M.F.; VIEIRA, H.E.E.; SILVA, G.A. *Orbispora* gen. nov., ancestral in the *Scutellosporaceae* (*Glomeromycetes*). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 116, p. 161–169, 2011c.

OEHL, F.; SILVA, G.A.; SÁNCHEZ-CASTRO, I.; GOTO, B.T.; MAIA, L.C.; VIEIRA, H.E.E.; BAREA, J.M.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J. Revision of *Glomeromycetes* with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 117, p. 297–316, 2011d.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 366–370, 1997.

OLIVEIRA, C.A.; SÁ, N.M.H.; GOMES, E.A.; MARRIEL, I.E.; SCOTTI, M.R.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied soil ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 249–258, 2009.

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

PACE, N.R.; SAPP, J.; GOLDENFELD, N. Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 4, p. 1011–1018, 2012.

PALENZUELA, J.; FERROL, N.; BOLLER, T.; AZCÓN-AGUILAR, C.; OEHL, F. *Otospora bareai*, a new fungal species in the *Glomeromycetes* from a dolomitic shrub-land in the National Park of Sierra de Baza (Granada, Spain). **Mycology**, Lawrence, v. 100, p. 282–291, 2008.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; MONAJEMBASHI, S.; GREULICH, K.O.; HERTWECK, C. Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. **Current Biology**, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 773–777, 2007.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of roots and tops of sweet potato (*Ipomea batatas*) sugar cane (*Saccharum* sp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p. 111–115, 1991.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W.H. VAN DER. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, p. 789–799, 2013.

- 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 RNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.
- POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 5, p. 119-124, 1994.
- PRINGLE, A.; BEVER, J. Divergent phenologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 89, p. 1439–1446, 2002.
- REDFORD, A.J.; BOWERS, R.M.; KNIGHT, R.; LINHART, Y.; FIERER, N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 12, p. 2885–2893, 2010.
- ROESCH, L.F.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**, New York, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007.
- RONNEY, D.C.; KILLHAM, K.; BENDING, G.D.; BAGGS, E.; WEITH, M.; HODGE, A. Mycorrhizas and biomass crops: opportunities for future sustainable development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, p. 542-549, 2009.
- SALLES, J.F.; POLY, F.; BERNHARD SCHMID, B.; LE ROUX, X. Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages. **Ecology**, Washington, v. 90, n. 12, p. 3324–3332, 2009.
- SALLES, J.F.; LE ROUX, X.; POLY, F. Relating phylogenetic and functional diversity among denitrifiers and quantifying their capacity to predict community functioning. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 209, 2012.
- SANDERS, I.R. Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, S128–S141, 2002.
- SAVARIO, C.F.; HOY, J.W. Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. **Plant and Soil**, London, v. 341, p. 63–73, 2010.
- SCHEUBLIN, T.R.; VAN LOGTESTIJN, R.S.P.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. **Journal of Ecology**, Hoboken, v. 95, p. 631–638, 2007.
- SCHÜßLER, A. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 244, p. 75–83, 2002.
- SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Manchester, v. 102, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, p. 371, 1991.

SIEVERDING, E.; OEHL, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal *Glomeromycetes*. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 80, p. 69–81, 2006.

SIQUEIRA, J.O.; KLAUBERG-FILHO, O. Micorrizas arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R. (Ed.). **I Tópicos em ciências do solo**. Viçosa: SBCS, 2000. p. 235-259.

SIKES, B.A.; COTTENIE, K.; KLIRONOMOS, J.N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas **Journal of Ecology**, Hoboken, v. 97, p. 1274–1280, 2009.

SIVAKUMAR, N. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 63, p. 151-160, 2013.

SPAIN, J.L.; SIEVERDING, E.; OEHL, F. *Appendicispora*, a new genus in the arbuscular mycorrhizal-forming *Glomeromycetes*, with a discussion of the genus *Archaeospora*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 97, p. 163–182, 2006.

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

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International, 2008. p. 537–583.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183–190, 2000.

TAN, F.; WANG, J.; CHEN, Z.; FENG, Y.; CHI, G.; REHMAN, S.U. Assessment of the arbuscular mycorrhizal fungal community in roots and rhizosphere soils of *Bt* corn and their non-*Bt* isolines. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 2473-2479, 2011.

TILMAN, D. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. **Ecology**, Washington, v. 80, p. 1455–1474, 1999.

TILMAN, D., REICH, P.B., KNOPS, J., WEDIN, D., MIELKE, T.; LEHMAN, C. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. **Science**, Washington, v. 294, p. 843–845, 2001.

TORO, M.; NEDIALKOVA, K.; AZCON, R.; BAREA, J.M. Establishment of two rock phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere of mycorrhizal onion plants and their effect

on plant growth in a microcosm. In AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. (Ed.).

Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development. Luxembourg: European Commission, 1996. p. 665–668.

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

VAN ELSAS, J. D.; TORSVIK, V.; HARTMANN, A.; ØUREAS, L.; JANSSON, J. K. The bacteria and archaea in soil, In J. D. van Elsas, J. K. Jansson, and J. T. Trevors (ed.). **Modern soil microbiology II**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 83–106.

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

VÁZQUEZ, M.M.; CÉSAR, S.; AZCON, R.; BAREA, J.M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 261–272, 2000.

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

VITOUSEK, P.M.; DANTONIO, C.M.; LOOPE, L.L.; WESTBROOKS, R. Biological invasions as global environmental change. **American Scientist**, Washington, v. 84, p. 468–478, 1996.

WALKER, C.; SCHÜBLER, A. Nomenclatural clarifications and new taxa in the *Glomeromycota*. **Mycological Research**, Manchester, v. 108, p. 979–982, 2004.

WALLIS, P.D.; HAYNES, R.J.; HUNTER, C.H.; MORRIS, C.D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 147–150, 2010.

WERNER, G.D.A.; STRASSMANN, J.E.; ANIEK, B.F.; IVENS, A.B.F.; DANIEL, J.P.; ENGELMOER, D.J.P.; VERBRUGGEN, E.; QUELLER, D.; NOË, R.; JOHNSON, N.C.; HAMMERSTEIN, P.; KIERS, T.E. Evolution of microbial markets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 111, n. 4, p. 1237–1244, 2014.

WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; CAMBIAIRE, J-C, LEMAIRE, C.; POUSSIER, S.; PHILIPPE PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **ISME Journal**, New York, v. 6, p. 961–974, 2012.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere -microbiologists search for itself. **Microbiology Reviews**, Malden, v. 58, n. 1, p. 1–9, 1994.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5088–5090, 1977.

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

ZENG, H.; TAN, F.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; SHU, Y.; WANG, J. Effects of cultivation and return of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on the diversity of the arbuscular mycorrhizal community in soils and roots of subsequently cultivated conventional maize. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 254-263. 2014.

2 INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E A COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE A COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das culturas de destaque no Brasil e elevadas produtividades são alcançadas devido às práticas culturais e doses crescentes de fertilizantes, que podem afetar a microbiota dos solos e reduzir a sua biodiversidade. A comunidade microbiana do solo é importante para manutenção dos cultivos de cana-de-açúcar, pois dentre várias de suas funções está a transformação e ciclagem de nutrientes. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) se associam a comunidade microbiana e com a maioria das plantas cultivadas, sendo que o desenvolvimento e manutenção desta associação são influenciados pelo manejo do ecossistema e pelas interações dos FMAs com outros microrganismos do solo. Neste trabalho foram avaliadas as interações de três espécies de FMAs (*Dentiscutata heterogama*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*) inoculadas em solo com diferentes composições de comunidades microbianas. Estas comunidades constituíram um gradiente de diversidade formado pela metodologia de ‘diluição para extinção’, que gerou diluições microbianas seriadas (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) a partir da microbiota natural do solo. Nestes tratamentos, foram inoculados esporos de cada FMA de interesse em sistemas separados e foram avaliadas as taxas de colonização micorrízica (%CM) de raízes de cana-de-açúcar, além das comunidades de fungos e bactérias do solo, amostradas aos 30, 60 e 120 dias de cultivo. As taxas de %CM obtidas com inoculação de *R. clarus* e *Gi. rosea* apresentaram variações quanto ao período de amostragem e gradiente de comunidades microbianas. No entanto, *R. clarus* apresentou-se mais responsivo as variações na composição das comunidades microbianas encontradas nas diluições, com maiores taxas de %CM na presença de maior biodiversidade microbiana (menores diluições). Em contrapartida, as taxas de %CM foram elevadas em todos os tratamentos quando *D. heterogama* foi inoculado. As variações quanto à capacidade de colonização micorrízica da planta pode ser relacionada à característica funcional do FMA ou da espécie vegetal utilizada, além da diferenciação observada nas comunidades de bactérias e fungos do solo que pode refletir na interação destes organismos. Foi também verificado que as estruturas das comunidades de bactérias e de fungos do solo foram distintas entre os tratamentos com as espécies de FMAs inoculadas, com destaque para a diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana em solos inoculados com a espécie *R. clarus* e da comunidade de fungos do solo devido a inoculação com *Gi. rosea*. Em síntese, este trabalho mostra de forma inovadora, a importância da interação entre FMAs e a microbiota do solo para a eficiente colonização micorrízica das plantas. Adicionalmente, fica demonstrado que a inoculação destes fungos benéficos às plantas molda de maneira determinante a estrutura das comunidades de fungos e bactérias do solo.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Colonização micorrízica; Comunidade bacteriana; Fungos do solo

Abstract

The sugarcane is one of main crops in Brazil, where high productivity is achieved due to cultural practices and high concentrations of fertilizers that can affect the microbiota of soils and reduce their biodiversity.. The microbial community of soil is important for the

maintenance of sugarcane crops, as it is responsible for nutrient cycling. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are associated with bacterial community of soils and most cultivated plants, and the development and maintenance of this association are influenced by ecosystem management and interactions of the AMF with other soil microorganisms. In this work we evaluated the interactions of three AMF species (*Dentiscutata heterogama*, *Rhizophagus clarus* and *Gigaspora rosea*) inoculated in soil with different composition of soil microbial communities. These communities composed a diversity gradient generated by the 'dilution to extinction' method, where microbial dilutions (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} and 10^{-9}) were created from soil microbial community. In these treatments, the spores for each AMF were separately inoculated and the mycorrhizal colonization (%MC) rates of sugarcane roots were quantified, in addition the monitoring of fungi and bacterial communities of soils sampled at 30, 60 and 120 days of plant cultivation. The rates of %MC obtained with inoculation of *R. clarus* and *Gi. rosea* showed variations according to the sampling period and gradient of microbial communities. However, *R. clarus* showed to be more responsive to variations in the composition of the microbial communities found along the community dilution, with higher rates of %MC in the presence of most diverse microbial communities (lower dilution). In contrast, the %MC rate was high in all treatments when *D. heterogama* was inoculated. Variations on the capacity in mycorrhizal colonization of plant may be related to the functional features of the AMF or plant species used, besides to the differentiation observed in microbial communities of soil (fungi and bacterial), which may reflect the interaction of these organisms. It was also found that the structures of microbial communities (bacteria and fungi) of soil were different between treatments with each AMF inoculated; highlighting the differentiation of the bacterial community structure in soil inoculated with *R. clarus* species and fungal community due to inoculation with AMF *Gi. rosea*. In summary, this study innovatively shows the importance of interactions between AMF and soil microbial community for efficient mycorrhizal colonization in plants. Additionally, it was demonstrated that the inoculation of these beneficial fungi for plants is determinant to structure of fungal and bacterial communities.

Keywords: Microbial diversity; Mycorrhizal colonization; Bacterial community; Fungi of soil

2.1 Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e a região Centro-Sul apresenta-se com maior produção nacional, com aproximadamente 602 mil toneladas (CONAB, 2015). Esta cultura se destaca em âmbito social e econômico no país, pois é matéria prima para produção de açúcar e etanol. A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea perene, mas adota característica semi-perene no cultivo comercial. Esta planta possui folhas alongadas, constituindo porte ereto, grande capacidade de perfilhamento e altura determinada pela limitação no suprimento de água, baixas temperaturas ou florescimento, sendo este último indesejável e controlado nas culturas comerciais por diminuir consideravelmente o teor de açúcares na planta (DALRI et al., 2002).

A fertilidade dos solos, principalmente relacionado ao nutriente fósforo (P), é fator preponderante na produção desta cultura. Este nutriente está presente em grandes quantidades

nos solos, no entanto é encontrado em baixas concentrações na solução do solo, devido principalmente a sua retenção e fixação nos óxidos de ferro e alumínio em solos ácidos ou no cálcio em solos alcalinos (NOVAIS; SMITH, 1999).

A microbiota do solo tem importância direta na fertilidade dos solos e na produtividade vegetal, participando de ciclos biogeoquímicos, supressão de patógenos do solo, produção de hormônios de importância vegetal e metabolismo de princípios ativos oriundos de produtos fitossanitários ou contaminantes (BOTTOMLEY, 2005). As elevadas doses de fertilizantes aplicados e outros fatores de manejo levam a seleção da microbiota e por consequência, sua diversidade é diminuída em solos utilizados para a agricultura (RODRIGUES et al., 2013).

As interações entre a comunidade microbiana do solo e os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), ainda são carentes de estudos. O conhecimento sobre estas associações e a descrição dos fatores que conferem a perfeita integração e organização das comunidades de fungos e bactérias em solo cultivado é de grande interesse. Sabe-se que algumas bactérias possuem a capacidade de auxiliar o desenvolvimento dos FMAs (XAVIER; GERMIDA, 2003; BIANCIOTTO et al., 2003; BHARADWAJ et al., 2008), mas ainda não há relato sobre a interação a nível de comunidade microbiana com estes fungos, o que pode trazer uma nova atribuição ao microbioma do solo, no suporte de importantes interações entre as plantas e microrganismos benéficos no sistema solo.

Na busca pelo entendimento desta complexa interação, foram avaliados neste trabalho os efeitos entre composições de comunidades microbianas e inoculação de espécies de FMAs em solo submetido ao cultivo com plantas de cana-de-açúcar. A influência dos tratamentos foi avaliada quanto à colonização micorrízica da planta hospedeira e estruturação das comunidades de bactérias e fungos que compõem a microbiota do solo nestes sistemas.

2.2 Hipótese Geral

A composição diferencial da comunidade microbiana do solo tem influência na taxa de colonização micorrízica do FMA inoculado durante cultivo de cana-de-açúcar. Adicionalmente, o FMA inoculado resulta em uma estruturação diferenciada das comunidades de bactérias e fungos do solo.

2.3 Objetivos específicos

- 1) Determinar a colonização micorrízica das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solos com gradiente de diversidade microbiana e FMA inoculado;
- 2) Verificar a ocorrência de alterações na estrutura das comunidades microbianas do solo devido a inoculação do FMA.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Descrição dos tratamentos e amostragens

Os tratamentos constaram de três espécies de FMAs (*Dentiscutata heterogama*-referência IL 203, anteriormente classificada como *Scutellospora heterogama*; *Rhizophagus clarus*-referência FL979A, previamente classificada como *Glomus clarum* e *Gigaspora rosea*-referência FL105), inoculadas separadamente em um mesmo solo com diferentes níveis de diversidade da comunidade microbiana, resultando em sistema composto por cada FMA inoculado.

As espécies de FMAs fazem parte da coleção da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Departamento de Ciência do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo. A identificação destes fungos foi baseada em informações da Coleção Internacional de Fungos Micorrízicos (Vesículo) Arbusculares disponíveis no site do INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/>), em conjunto com metodologias tradicionais que utilizam a morfologia do esporo, como presença ou ausência de características (por exemplo, tubo germinativo e células auxiliares), tipo de formação do esporo e estruturação de sua parede celular (GERDEMANN; TRAPPE, 1974; WALKER; SANDERS, 1986; MORTON; BENNY, 1990).

As espécies *Dentiscutata heterogama* e *Gigaspora rosea* pertencem à família Gigasporaceae e a espécie *Rhizophagus clarus* é membro da família Glomeraceae, conforme a nova classificação proposta por Redecker et al. (2013).

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 2009) e está localizado em área pertencente à ESALQ (cultivado com gramínea rasteira do gênero *Brachiaria* spp.). Este foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm e utilizado para a geração do gradiente de diversidade microbiano. A caracterização das espécies de FMAs presentes no solo utilizado para obtenção do gradiente de diversidade microbiano foi

realizada, através de extração dos esporos (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e posterior identificação.

A comunidade microbiana do solo foi submetida a diluições seriadas de suas células microbianas, utilizando-se o método de diluição para extinção (WERTZ et al., 2006, 2007; VAN ELSAS et al., 2012; MALLON et al., 2015). As diluições da comunidade microbiana do solo foram obtidas nas suspensões de células em concentrações 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} , com posterior inoculação em solo esterilizado (apêndice A).

A esterilização das amostras de solo que receberam a inoculação com as diferentes diluições foi realizada em autoclave com elevada temperatura e pressão (120°C - 1atm) por uma hora, seguida de repouso da amostra em temperatura ambiente durante a noite. Este processo foi repetido por dois dias consecutivos, a partir dos quais amostras do solo esterilizado foram obtidas e comparadas às amostras originais em relação a suas propriedades químicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades químicas do solo utilizado na composição do experimento, antes e após o processo de esterilização (120°C - 1atm)

Propriedades químicas	Solo não esterilizado	Solo esterilizado
pH	5,30	5,00
	<i>mmolc dm⁻³</i>	
K	1,90	2,10
Ca	16,00	15,00
Mg	7,00	7,00
Al	0,00	1,00
H + Al	20,00	31,00
CTC	44,2	54,50
	<i>mg dm⁻³</i>	
P	9,00	7,00
Mn	9,50	29,00
Cu	0,70	0,70
Zn	2,50	2,10
B	0,09	0,13

Nota: pH em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; fósforo (P) método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons, potássio (K) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica, alumínio trocável (Al) método colorimétrico extraído com cloreto de potássio 1 mol L⁻¹, acidez potencial (H + Al) extraído com tampão SMP. CTC: Capacidade de troca de cátions. Boro (B) extração com água quente e determinação por colorimetria; cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica. De acordo com o manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais (2001)

Após o processo de esterilização do solo, o único valor que sofreu considerável alteração foi para o micronutriente Mn (de 9,5 para 29 mg dm⁻³) e este valor não foi considerado prejudicial para a formação da micorriza, devido a observação de valores mais elevados (acima de 300 mg dm⁻³) que prejudica esta associação, conforme demonstrado por Nogueira e Cardoso (2002). O aumento desse valor após o processo de esterilização do solo ocorre devido ao fato da elevada temperatura causar a decomposição térmica dos quelatos orgânicos e consequente liberação dos íons de Mn (MIYAZAWA et al., 1993).

A partir destas observações e após a manutenção do solo em repouso por aproximadamente uma semana, amostras do solo esterilizado foram posteriormente acondicionadas em recipientes com capacidade para 3 kg, constituindo os microcosmos para implantação do experimento em casa de vegetação.

As mudas de cana-de-açúcar (variedade SP803280), que foram transplantadas para cada recipiente contendo os tratamentos, foram obtidas a partir de plantas cultivadas na Fazenda Areão (ESALQ). As plantas selecionadas foram cortadas em toletes e submetidas à desinfecção superficial com solução de Hipoclorito de Sódio a 2% durante 1 minuto, seguido de enxágue em água destilada previamente esterilizada. A germinação das gemas ocorreu em bandejas com areia lavada e esterilizada (120°C - 1atm, durante 60 min). Após aproximadamente 20 dias, as mudas com tamanhos regulares foram selecionadas para compor o experimento.

Cada microcosmo contendo solo estéril recebeu uma quantidade de 100 ml de diferentes diluições (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) das suspensões celulares oriundas do solo original e aproximadamente 50 esporos de cada FMA (*Dentiscutata heterogama*, *Rhizophagus clarus* ou *Gigaspora rosea*), e plantio de uma muda de cana-de-açúcar com cerca de 20 cm de altura de parte aérea.

Os microcosmos referentes à inoculação de cada espécie de FMA associado às comunidades microbianas foram dispostos em diferentes bancadas na casa de vegetação. Os tratamentos foram constituídos em esquema fatorial 5×3 , com cinco composições de células microbianas que resultaram no gradiente de diversidade (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} e ausência de microbiota inoculada) e três espécies de FMAs (*Dentiscutata heterogama*, *Rhizophagus clarus* ou *Gigaspora rosea*) inoculadas separadamente, com três repetições e amostragens realizadas em períodos (30, 60 e 120 dias). Os tratamentos foram organizadas em blocos para cada FMA inoculado para que não houvesse contaminação dos tratamentos com relação ao gradiente de diversidade inoculado.

O experimento foi mantido em casa-de-vegetação, com amostragens realizadas nos períodos de 30, 60 e 120 dias de cultivo das mudas e inoculação dos tratamentos. As amostras de solo para extração de DNA e análises posteriores foram acondicionadas em freezer a -80°C , as raízes finas das plantas de cana-de-açúcar foram coletadas para avaliação das taxas de colonização micorrízica e a parte aérea das plantas foi utilizada para determinação da matéria seca.

2.4.2 Quantificação da colonização micorrízica em amostra de raízes dos diferentes tratamentos

As raízes finas foram lavadas e colocadas em tubos plásticos de 50 ml devidamente identificados e armazenados em solução de etanol em concentração de 70%. Posteriormente, estas raízes foram clarificadas com solução de KOH 10%, com aquecimento por 40 minutos à temperatura de 90° C, em seguida lavadas em água corrente para retirada do excesso de reagente (PHILLIPS; HAYMAN; 1970).

Posteriormente, adicionou-se solução de tinta de caneta (40 ml de tinta de caneta em 1L de ácido acético 5%) nas raízes descoradas e estas foram mantidas a 90° C por 1 minuto. O armazenamento das raízes após a coloração foi feito em solução de manutenção constituída de ácido láctico, glicerina e água em mesma proporção (1:1:1) até o momento da visualização e quantificação da colonização micorrízica (VIERHEILIG et al., 1998).

As taxas de colonização micorrízica foram determinadas com microscópio estereoscópico (lupa) com aumento mínimo de 40x, aplicando o método de intercessão das linhas cruzadas ou '*grid line method*' que é baseado na observação de fragmentos de raízes na placa quadriculada (1mm x 1mm) e mensuração de fragmentos colonizados e não colonizados pelo FMA. Com esta proporção estimou-se a porcentagem de raízes colonizadas, mencionada no texto pela sigla %CM (GIOVANETTI; MOSSE, 1980).

Os valores de %CM encontradas nas amostras de raízes para cada tratamento foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias de Tukey, onde foi observada a significância com valores de probabilidade de erro abaixo de 5%, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002, 2006).

2.4.3 Determinação de massa seca da parte aérea das plantas nos diferentes tratamentos

A parte aérea das plantas foi amostrada e submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65° C durante o período de 48 horas. Após este período, determinou-se a massa seca destas plantas, através de pesagem do material vegetal em balança simples.

Os valores de massa seca da parte aérea das plantas foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias de Tukey, onde foi observada a significância

com valores de probabilidade de erro abaixo de 5%, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002, 2006).

2.4.4 Extração do DNA das amostras de solo

A extração de DNA das amostras de solo obtidas nos períodos de coletas, foi realizada com o kit *Power Soil DNA Isolation* (MoBio laboratories, Carlsbab, CA), posteriormente verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com solução de Gel Red[®] e visualizado em luz ultravioleta (UV).

2.4.5 Análise das comunidades de fungos e bactérias nas amostras de solo dos diferentes tratamentos

As amostras de DNA foram amplificadas utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para a análise das comunidades de fungos e bactérias presentes em cada amostra. A seleção dos *primers* foi feita para permitir a análise posterior dos fragmentos amplificados pela metodologia de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* - T-RFLP), que é um método comparativo que possibilita analisar comunidades microbianas complexas (LUI et al., 1997).

Para comunidade bacteriana, foram utilizados os *primers* universais para amplificação da região do gene ribossomal 16S rRNA, FAM-8fm (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 926R-Eub (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') descrito por HEUER et al. (1997). A análise da comunidade de fungos foi acessada pela amplificação da região intergênica do DNA ribossômico (ITS), com os *primers* ITS1F-FAM (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), seguindo a metodologia descrita por Avis et al. (2006).

As reações de PCR para a amplificação do gene 16S rRNA resultaram em volume de 50 µl e incluíram 1,0 µl de DNA genômico (aproximadamente 50ng), 0,1 µl de cada primer (100 pmol/µl), 0,20 µl de Taq polymerase (5U/µl), 4,0 µl de dNTPs (2,5 mM), 6,0 µl de MgCl₂ (25mM), 5,0 µl de PCR buffer (10x) e 33,60 µl de água deionizada esterilizada. As condições para amplificação foram a 95° C por 4 min e 30 ciclos a 95° C por 30s, 57° C por 30s e 72° C por 45s e 10 min a 72° C.

Para amplificação da região intergênica do ‘operon’ ribossomal (ITS), as reações foram compostas para volume final de 50 µl incluindo 1,0 µl de DNA genômico (aproximadamente 50ng), 0,2 µl de cada primer (100 pmol/µl), 0,50 µl de Taq polymerase (5U/µl), 4,0 µl de dNTPs (2,5 mM), 6,0 µl de MgCl₂ (25 mM), 5,0 µl de PCR buffer (10x) e 33,10 µl de água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 94° C por 1 min e 30s, 13 ciclos a 94° C por 35s, 55° C por 55s e 72° C por 45s; 13 ciclos a 94° C por 35s, 55° C por 2 min, 72° C por 45s, 9 ciclos a 94° C por 35s, 55° C por 3 min, 72° C por 45s e 10 min a 72° C.

Os produtos da PCR foram purificados com *QuiaQuick PCR purification kit* (Quiagen) e quantificados em géis de agarose a 2% de concentração em tampão TAE 1X, corado com Gel Red[®] e visualizado em luz UV. As clivagens foram realizadas com aproximadamente 200 ng de produtos de amplificação para as reações de 16S rRNA e ITS a 37° C durante 3 horas.

A reação para a restrição do produto de amplificação do gene 16S rRNA foi constituída de 7,5 µl de água deionizada esterilizada, 2,0 µl de buffer (10x), 0,5 µl da enzima *HhaI* (10U/µl) e 10 µl da amostra purificada; enquanto a reação para restrição da região ITS constituiu-se de 2,5 µl de água deionizada esterilizada, 2,0 µl de buffer (10x), 0,5 µl da enzima *HhaIII* (10U/µl) e 15 µl da amostra purificada. Posteriormente, foi feita a precipitação das amostras com a adição de 2,0 µl de EDTA (125 mM), 2,0 µl Acetato de Sódio (3M) e 50µl de álcool etílico, seguido por centrifugação com rotação de 4000 rpm durante 30 min a 4° C . O DNA fragmentado e precipitado foi lavado com etanol a 70% de concentração e previamente resfriado, em seguida as placas foram secas em temperatura ambiente e as amostras submetidas à ressuspensão em 9,5 µl de Formamida Hi-D e 0,5 µl de Liz 1200 no momento da leitura. A leitura das soluções finais foi realizada em sequenciador automático *ABI Prism 3500 (Applied Biosystems)*.

A ocorrência e a intensidade de picos com fragmentos de diferentes tamanhos foram comparadas no programa GeneMapper[®] v.4.1, o qual gerou matrizes com informações dos picos gerados pelos fragmentos de restrição terminal (TRFs). Foram gerados 624 picos para as leituras de fragmentos do gene 16S rRNA e 762 picos oriundos das leituras das reações da região ITS. A matriz composta da ocorrência e áreas destes picos foi utilizada para análises no programa Paleontological Statistics Software (programa PAST) (HAMMER et al., 2001).

A comparação das matrizes geradas com dados de áreas dos picos das amostras foi realizada pela análise de coordenadas principais (PCoAs), utilizando índice de similaridade *Bray-Curtis* para observação da estruturação dos tratamentos. A confirmação da semelhança ou distinção entre os grupos gerados foi feita pela análise de similaridade (ANOSIM), onde se obtém valores de R que são posteriormente interpretados. A interpretação dos valores de R foi feita da seguinte maneira: $R > 0,75$ significa que os grupos representados são totalmente distintos; $R < 0,50$ indica que os grupos representados não são diferentes; enquanto valores de R entre 0,50 e 0,75 indicam que os grupos observados apresentam distinção, mas preservam algumas semelhanças (CLARKE, 1993; CLARKE; GORLEY, 2001).

2.5 Resultados e Discussão

A comunidade de FMAs natural do solo utilizada para obtenção de comunidades microbianas a partir da ‘diluição para extinção’ de grupos microbianos, era constituída de uma pequena quantidade de esporos de FMAs (3 a 6 esporos por 50 g^{-1} de solo) em sua composição, com predomínio do gênero *Rhizophagus*. Desta forma, como os tratamentos constaram da inoculação de 50 esporos por microcosmo, acredita-se que os efeitos observados tenham sido preponderantemente causados pelos FMAs inoculados.

De acordo com Lekberg e Koide (2005), a abundância de FMAs no solo é um dos fatores importantes para suportar suas funções nas plantas hospedeiras. Adicionalmente, sabe-se que a inoculação de FMAs exóticos melhora as taxas de micorrização na planta hospedeira quando as espécies nativas de FMAs estão em quantidade e/ou qualidade inadequadas (KOIDE; MOOSE, 2004).

2.5.1 Dinâmica da micorrização nos diferentes tratamentos

As taxas de colonização micorrízica (%CM) na cultura de cana-de-açúcar foram distintas com relação à inoculação das espécies de FMAs e ao gradiente de diversidade microbiana do solo (Figura 1). Em algumas situações, a composição da comunidade microbiana do solo pode ter atuado de forma determinante na formação da micorriza, alterando as taxas de %CM das raízes da planta hospedeira.

As espécies de FMAs inoculadas mostraram comportamentos distintos quanto à capacidade e à dinâmica de colonização micorrízica da planta e frente ao gradiente de diversidade microbiano que compôs os tratamentos e foram inoculados no solo. Estas observações sugerem que características funcionais de cada espécie de FMA que foi inoculada podem estar envolvidas em sua associação com o hospedeiro e com o ambiente microbiano encontrado (CHAGNON et al., 2013). Constatações estas, que podem contribuir para o maior entendimento da complexidade que rege estas interações entre plantas, ambiente e FMAs, o que é altamente desejado para o avanço do conhecimento sobre micorrizas.

Em relação à variação temporal quanto aos valores de colonização, as espécies de FMAs inoculadas mostraram diferenças estatísticas na colonização das raízes de cana-de-açúcar, sendo que não houve diferenças entre as médias nos períodos de 30 e 120 dias do desenvolvimento das plantas ($p < 0,05$) e observou-se diferença dos dados na amostragem feita aos 60 dias ($p < 0,01$) (dados detalhados no apêndice B). A espécie *D. heterogama* se apresentou superior às demais e a menor média foi obtida com inoculação de *Gi. rosea*, neste período de amostragem.

2.5.2 Comportamento diferencial de cada espécie de FMA

A espécie de FMA *D. heterogama* apresentou aptidão superior ao desenvolvimento da micorriza em praticamente todas as situações, sendo que esta resposta foi diferente para os outros FMAs inoculados (dados apresentados no apêndice B). As taxas de %CM de *D. heterogama* na ausência de comunidade microbiana inoculada, representadas pela sigla FM nos gráficos, foram de 44%, 34% e 48%, respectivamente para 30, 60 e 120 dias de cultivo das plantas e inoculação dos tratamentos (Figura 1A).

Quando este FMA foi associada às diferentes composições microbianas inoculadas ($FM+10^{-1}$, $FM+10^{-3}$, $FM+10^{-6}$ e $FM+10^{-9}$) foram observadas maiores taxas de %CM na amostragem realizada aos 60 dias de cultivo das plantas. Aos 30 dias, os maiores valores de %CM foram obtidos para os tratamentos com comunidades microbianas em situação de menor biodiversidade ($FM+10^{-6}$ e $FM+10^{-9}$ com valores de, 46% e 50%, respectivamente), com valores próximos ao obtido somente com inoculação do FMA (44%) (Figura 1A).

Figura 1 - Taxas de colonização micorrízica (%CM) da cultura de cana-de-açúcar quando inoculado com cada espécie de FMA A) *D. heterogama*, B) *R. clarus* e C) *Gi. rosea* associadas aos níveis de diversidade da comunidade microbiana do solo (FM+10⁻¹, FM+10⁻³, FM+10⁻⁶ e FM+10⁻⁹) e os FMAs inoculados (FM) em ausência de comunidade microbiana inoculada aos 30, 60 e 120 dias de cultivo das plantas de cana-de-açúcar. As barras dos gráficos representam os valores referentes à interação dos tratamentos (apêndice B) e a barra de erro padrão é referente as três réplicas de cada tratamento

Talvez uma observação adicional seja importante para os dados obtidos aos 60 dias de desenvolvimento das plantas, quando os tratamentos com inoculação de células microbianas resultaram em maiores valores de colonização (%CM) quando comparado ao tratamento livre da comunidade microbiana inoculada (FM). Neste caso, observou-se um aumento médio de 16% nas taxas de micorrização, o que pode ser relacionado à presença da comunidade microbiana, que atuou como fator estimulante da colonização micorrízica, promovendo o seu aumento. No entanto, com 120 dias de desenvolvimento da cana-de-açúcar, o maior valor de %CM foi obtido para *D. heterogama* em ausência de microbiota inoculada (FM= 48%).

Estes dados mostram que esta espécie apresentou alta capacidade de estabelecer a relação simbiótica com o hospedeiro, independente das alterações ambientais (NOE; HAMMESTEIN, 1995; WERNER et al., 2014). Esta capacidade de estabelecer os processos simbióticos de forma eficiente, guiada pela maior cooperação entre os componente do sistema foi demonstrada em experimentos manipulados (KIERS et al., 2011) e foi chamada de mercado biológico.

Neste processo, de maneira análoga ao que ocorre no mercado financeiro, os parceiros - aqui representados pelos simbioses - tem a opção de escolha de seus pares e a decisão de quando desejam investir nesta interação, de maneira à mesma dar retorno proporcional aos organismos que estão em simbiose (FELLBAUM et al., 2014).

Nas plantas inoculadas com *R. clarus* (Figura 1B) observa-se variações nas taxas de %CM entre os tratamentos contendo diferentes composições da comunidade microbiana. Os tratamentos com inoculação desta espécie de FMA e as diluições iniciais da comunidade microbiana apresentaram maiores taxas de micorrização, observadas aos 30 dias para os tratamentos FM+10⁻¹ e FM+10⁻³, e aos 120 dias para o tratamento FM+10⁻¹. Aos 60 dias de desenvolvimento das plantas, a associação desta espécie com os maiores níveis de biodiversidade do solo (FM+10⁻¹, FM+10⁻³ e FM+10⁻⁶) mostraram maiores taxas de %CM, com valores próximos de 40%. Estes valores foram superiores ao obtido com inoculação desta espécie na ausência de células microbianas inoculadas (FM= 16%) neste mesmo período de amostragem.

Na última amostragem (120 dias), o sistema com associação da maior diversidade microbiana com *R. clarus* (FM+10⁻¹) manteve-se com a maior taxa de %CM (49%), valor superior aos demais tratamentos e praticamente o dobro da taxa de %CM com inoculação apenas do FMA (FM= 25%).

Estas observações sugerem que *R. clarus* pode ter recebido auxílio de grupos microbianos que compõem a microbiota do solo e que estavam presentes em nas diluições microbianas, que ao desenvolverem suas funções promoveram condições ambientais ou nutricionais propícias para a colonização do FMA. Estas observações vão de encontro à história evolutiva destes microrganismos, com relatos de que a transição das plantas do ambiente aquático para o terrestre foi suportada por inúmeras e importantes interações da microbiota com os FMAs, inclusive com fungos precursores dos FMAs e outros membros da microbiota (SCHÜßLER, 2002).

Na terceira situação de estudo, com inoculação de esporos de *Gi. rosea*, houve predominância de elevadas taxas de %CM na avaliação realizada aos 30 dias de desenvolvimento da planta hospedeira. Neste período, foram observadas diferenças na %CM em valores próximos a 10%, com valores maiores no tratamento com inoculação do FMA em solos com maior biodiversidade (FM+10⁻¹) (Figura 1C).

Observa-se ainda, variações das taxas de %CM ao longo dos tratamentos FM+10⁻¹, FM+10⁻³ e FM+10⁻⁶, que originou um decréscimo na %CM à medida que ocorreu o aumento da diluição microbiana do solo. Esta diferenciação gerou diferença de 20% na taxa de %CM entre o tratamento com maior (FM+10⁻¹) e menor (FM+10⁻⁶) composição de células microbianas, e ausência deste efeito nos tratamentos FM+10⁻⁹ e FM.

Possivelmente, este fato foi observado devido à colonização do solo nestes tratamentos pela microbiota oriunda das plantas, que mesmo devido à realização de desinfecção superficial de suas partes vegetativas (colmos e gemas), não estão livres da microbiota endofítica, que possivelmente encontraram melhores condições de sobrevivência em solos com menores valores de biodiversidade (VAN ELSAS et al., 2012).

Este mesmo padrão se apresenta na amostragem aos 120 dias de desenvolvimento da planta hospedeira, porém com destaque para o tratamento FM+10⁻¹, com taxa de %CM de 57% contra 40% no tratamento apenas com a inoculação do FMA (FM). Os valores de %CM aos 60 dias apresentaram pequenas variações, com taxas de até 30% para os tratamentos compostos da combinação FMA e microbiota do solo independente da composição microbiana, enquanto o valor de 22% foi encontrado para o tratamento somente com inoculação do FMA (FM) e ausência de microbiota inoculada.

De maneira comparativa, pode-se observar que existe um comportamento diferencial dos FMAs quando inoculados em composições diferenciais da comunidade microbiana do solo. O padrão observado para cada espécie varia tanto temporalmente, como principalmente na habilidade de estabelecer a colonização micorrízica quando associado a diferentes grupos microbianos presentes nos solos. Algumas teorias e modelos podem auxiliar na explicação destas diferenças, seguindo determinações anteriormente realizadas no intuito de descrever o comportamento ecológico diferencial de espécies aquáticas (WINEMILLER; ROSE, 1992) e de comunidades vegetais (GRIME, 1979, citado por CHAGNON et al. 2013).

A literatura relaciona as respostas funcionais de espécies vegetais a situações de estresse e/ou distúrbio, obtendo uma estrutura denominada C-S-R, que classifica as espécies como competidoras, tolerantes ao estresse ou ruderais (GRIME, 1979, citado por CHAGNON et al. 2013). Estrutura similar foi usada para estudar variações em respostas observadas em comunidades de corais (DARLING et al., 2012) e microrganismos que colonizam a filosfera (NIX-STOHR et al., 2008). Para se aplicar este conceito aos FMAs, é necessário considerar condições ambientais que podem levar o FMA ao estresse ou a situações que podem resultar em distúrbio e observar a partir daí suas características funcionais de resposta a estas situações (CHAGNON et al., 2013).

De acordo com Chagnon e colaboradores (2013), a espécie de FMA competitiva é aquela que através de suas características, aumenta a concentração de carbono oriundo das plantas, mesmo quando submetida a condições desfavoráveis. O fluxo de substâncias entre os simbioses deve ser proporcional (KIERS et al., 2011), por isso as espécies ditas competitivas devem investir em produção de micélio extrarradicular para garantir a nutrição do hospedeiro (principalmente com fósforo) e consequentemente recebe mais carbono da planta. Membros da família Gigasporaceae foram caracterizados como competitivos, principalmente em condições de baixa disponibilidade nutricional (situação de recurso limitante) e em associação com plantas que não são tolerantes a situações que levam ao estresse (CHAGNON et al., 2013).

No presente estudo foram utilizadas duas espécies pertencentes à família Gigasporaceae (*D. heterogama* e *Gi. rosea*), inoculadas em solo com baixo teor de fósforo e associadas a gradiente de diversidade microbiana. No entanto, observa-se que apenas com a inoculação da espécie de FMA *D. heterogama* (Figura 1A) houve manutenção de altas taxas %CM ao longo do período de cultivo da planta hospedeira e gradiente de diversidade microbiano, sugerindo a caracterização do sistema composto pela inoculação desta espécie como competitivo.

Provavelmente, a planta estava recebendo proventos nutricionais do fungo, devido as suas características competitivas e a transferência de carbono para o FMA estava ocorrendo com manutenção do 'feedback' entre os simbioses, garantindo as elevadas taxas de %CM. Fato este que não foi observado com a inoculação de *Gi. rosea* durante as avaliações, sendo que pode-se dizer que esta espécie apresentou característica competitiva somente na fase inicial de desenvolvimento da planta, apresentando maior capacidade de colonização da

planta neste período (30 dias) ou quando foi associada a maior composição de células microbianas (10^{-1}) na fase final de avaliação (120 dias).

Os FMAs ruderais apresentam a capacidade de se reestabelecer rapidamente após algum distúrbio, por exemplo, devido ao rearranjo de sua rede de micélios após algum evento que resultou em sua ruptura. Estas espécies dispõem de mecanismos para fusão destas hifas, tornando-as novamente funcionais (AVIO et al., 2006), além de rápida formação de propágulos no solo (POWELL et al., 2009), o que garante a disseminação e perpetuação de suas espécies.

Componentes da família Glomeraceae apresentam estas características, principalmente os pertencentes ao gênero *Glomus*, que tiveram algumas de suas espécies remanejadas e atualmente classificadas como *Rhizophagus*. As características deste grupo de FMAs foram demonstradas em estudos realizados em solos oriundos de áreas submetidas ao manejo convencional, que ocasionaram a fragmentação da rede de hifas no solo e a baixa diversidade de FMAs principalmente pertencentes a este gênero (HELGASON et al., 1998; JANSÁ et al., 2002; MAHERALI; KLIRONOMOS, 2012).

Portanto, pode-se dizer que FMAs que compõem este grupo (ruderal) apresentam habilidade de se manterem ativas no solo mesmo submetidas à condição desfavorável. No entanto, a dependência que estes microrganismos podem apresentar com relação às suas interações com outros organismos para expressarem este fenótipo, necessita ainda de descrição.

O comportamento de FMAs deste grupo foi avaliado no sistema composto por gradiente de diversidade microbiana com inoculação de uma espécie pertencente ao gênero *Rhizophagus* (classificado anteriormente como *Glomus*), membro da família Glomeraceae (Figura 1B). Observou-se diferente capacidade de colonização de *R. clarus* quando comparado com a espécie competitiva *D. heterogama*, quanto à dinâmica de colonização entre os tratamentos com composições de comunidades microbianas (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) e ao efeito da alteração da diversidade microbiana do solo sobre a colonização das plantas por este FMA.

Neste sentido, com a inoculação do FMA caracterizado como ruderal (*R. clarus*) nota-se o favorecimento desta espécie em solo com maior diversidade microbiana, que resultou em maiores taxas de %CM nestas situações durante os períodos de amostragem da

planta hospedeira. Isto sugere que a menor diversidade microbiana gerou um distúrbio intenso sobre a associação planta - FMA e resultou em menor eficiência de colonização da planta.

Resposta contrária foi observada em trabalho realizado por Van Elsas e colaboradores (2012), que demonstraram que a limitação de sobrevivência e colonização de um microrganismo exógeno (*Escherichia coli*) inoculado no solo ocorreu em sistemas compostos de maior diversidade microbiana.

Espécies de FMAs tolerantes a fatores de estresse, devido ao baixo suprimento de carbono da planta hospedeira ou a condição de acidez do solo, apresentam maior capacidade de colonização em simbiote que também sejam tolerantes a estresses, por exemplo, devido a habilidade de baixa produção de biomassa vegetal. Esta característica é relatada para as espécies da família Acaulosporaceae (MORTON et al., 1986; PORTER et al., 1987; OEHL et al., 2010), não utilizadas no presente estudo.

Em síntese, os dados apresentados mostram um comportamento diferenciado dos grupos funcionais de FMAs quando expostos a solo com distintas composições de comunidades microbianas. Esta informação está complementada e fundamentada na visualização da estrutura das comunidades de bactérias e fungos presentes em cada um dos tratamentos, que podem ser relacionadas ao processo de micorrização e consequente desenvolvimento vegetal.

2.5.3 Massa seca da parte aérea das plantas para os diferentes tratamentos

De maneira geral, a massa seca da parte aérea das plantas (MSPA) não apresentou diferenças estatísticas quanto à interação dos tratamentos do gradiente de diversidade e as espécies de FMAs inoculadas (apêndice B). Porém, de maneira similar ao observado para %CM, foi observado aos 60 dias de cultivo que a massa seca das plantas foi superior para inoculação do FMA *D. heterogama* ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Matéria seca da parte aérea das plantas (MSPA) de cana-de-açúcar inoculadas com os FMAs aos 60 dias de desenvolvimento das plantas de milho

FMAs	MSPA
<i>D. heterogama</i>	7,57 a
<i>R. clarus</i>	5,72 b
<i>Gi. rosea</i>	6,57 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey (5%); Diferença mínima significativa (dms) = 1,17

Estudos relatam sobre variações em respostas obtidas pelas plantas hospedeiras com inoculação de FMAs, sendo descritas até mesmo respostas diferentes quando plantas são inoculadas com isolados de mesma espécie (ABBOTT; GAZEY, 1994; CAVALCANTE et al., 2002). Algumas espécies de FMAs quando associadas à determinada espécie vegetal promovem aumento de sua biomassa seca e dos teores de P e N na parte aérea das plantas (CRUZ; MARTINS, 1997). Há também relatos sobre alterações nas quantidades de outros nutrientes no tecido vegetal, como N, K, Ca, Mg e Fe, devido a inoculação de diferentes espécies de FMAs, no entanto nem sempre a ocorrência das micorrizas é correlacionada com alterações na matéria seca das plantas (SILVEIRA et al., 2002).

Vale a ressalva de que o teor de P no solo deve também ser considerado quando se observa resultados de massa seca, pois mesmo estando em concentração considerada baixa para determinada cultura, este nutriente pode favorecer o crescimento da espécie vegetal no período de desenvolvimento avaliado. Neste mesmo momento, o FMA pode continuar apresentando o efeito fisiológico na planta, realizando sua colonização e a permanência desta colonização continua dependente da sensibilidade do simbionte ao suprimento nutricional (SMITH; GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Infelizmente, esta determinação não foi realizada neste experimento, mas deverá compor estudos posteriores nesta linha de pesquisa do grupo.

2.5.4 Alterações na comunidade bacteriana do solo promovida pela inoculação de FMAs

Resultados complementares surgiram durante o monitoramento das comunidades microbianas no solo com os diferentes tratamentos ao longo do cultivo das plantas de cana-de-açúcar. A comparação das estruturas das comunidades bacterianas indicou sua segregação

primordialmente de acordo com a espécie de FMA inoculada, em detrimento do período em que as plantas foram cultivadas ou do gradiente de diversidade microbiano gerado ao longo das diluições (Figura 2).

Figura 2 - Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na composição diferencial das comunidades bacterianas encontradas nos solos inoculados com as espécies de FMAs (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) e associados as diferentes diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}). As amostras coletadas nos três períodos (30, 60 e 120 dias de desenvolvimento das plantas) são demonstradas. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

Observa-se a separação das amostras do tratamento onde foi inoculado *R. clarus* em relação aos demais (separação no primeiro eixo), enquanto que as amostras inoculadas com *D. heterogama* e *Gi. rosea* hospedam comunidades bacterianas com maior similaridade. Este agrupamento segue a estruturação taxonômica destes FMAs, sendo as espécies *D. heterogama* e *Gi. rosea* pertencentes a família Gigasporaceae, enquanto que *R. clarus* pertence a família Glomeraceae.

Estas separações não foram validadas estatisticamente pela análise de similaridade (ANOSIM), que indicou a ocorrência de sobreposições entre os grupos formados pelas amostras dos diferentes tratamentos. Esta insensibilidade da ANOSIM pode estar ligada ao fato da baixa capacidade de detectar possíveis variações relacionadas à inoculação das

espécies de FMAs e ao gradiente de diversidade microbiano nos tratamentos (Tabela 3). Outro fator que pode ter diluído esta significância foi a análise de todas as amostras, dos três períodos amostrais, conjuntamente. No entanto, esta decisão facilitou a visualização do efeito primordial da inoculação do FMA na estruturação das comunidades alvo de estudo.

Tabela 3 - Valores de R, obtidos pela análise de similaridade (ANOSIM), onde foram comparados os perfis de áreas dos picos de fragmentos terminais do gene 16S rRNA de solo, gerados pela inoculação de espécies de FMAs associados as composições de comunidades microbianas

ANOSIM	<i>D. heterogama</i>	<i>R. clarus</i>	<i>Gi. rosea</i>
<i>D. heterogama</i>	-	0,32	0,19
<i>R. clarus</i>	0,32	-	0,33
<i>Gi. Rósea</i>	0,19	0,33	-

Provavelmente, a seletividade dos FMAs pertencentes à mesma família siga o mesmo padrão descrito para outras interações entre comunidades bacterianas e diferentes sistemas biológicos. Este tipo de seletividade já foi descrito para as comunidades bacterianas associadas às plantas, tanto as encontradas na filosfera (LAMBAIS et al., 2006) como as componentes da rizosfera (BULGARELLI et al., 2013; DIAS et al., 2013). Em associação com fungos, sabe-se que alguns fungos ectomicorrízicos podem selecionar os componentes de suas respectivas micosferas (corpos de frutificação), gerando divergentes estruturas de comunidades bacterianas (BOERSMA et al., 2009), no entanto pouco se conhece sobre esta seletividade, encontrada de forma intensa, devido a inoculação de FMAs.

No presente estudo, o FMA que selecionou a comunidade bacteriana estruturalmente mais distinta (Figura 2), foi o que apresentou maior efeito das diluições microbianas sobre as taxas de %CM (Figura 1B). Esta observação pode indicar certa ineficiência na seleção dos simbiontes desejados, levando a menor capacidade deste FMA em estabelecer a interação com o hospedeiro em condições de baixa diversidade microbiana no solo.

Efeitos positivos ou negativos da inoculação de FMAs na composição de comunidades bacterianas já foram relatados (MEYER; LINDERMAN, 1986; PAULITZ;

LINDERMAN, 1991). Andrade e colaboradores (1997) sugerem que a preferência por grupos bacterianos em relação à determinada espécie de FMA ocorreu devido às condições propiciadas por este fungo para o estabelecimento bacteriano. Estas condições foram sugeridas como sendo derivadas da alteração no padrão de exsudação da planta colonizada por determinado FMA e da própria exsudação de hifas fúngicas (AZAIZEH et al., 1995).

Outro trabalho, baseado na técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE), mostrou que a seleção da comunidade de bactérias associada a plantas de milho foi diferente quando comparado às variações nas taxas de %CM durante o período avaliado (MARSCHNER; BAUMANN, 2003). A especificidade de bactérias que se associam a esporos de FMAs foi também descrita (BHARADWAY et al., 2008), sendo esta relacionada à formação de nichos específicos nos esporos e a geração de ambientes particulares pelos micélios fúngicos ao longo de sua dispersão nos solos (SCANNERINI; BONFANTE, 1991; SCHÜßLER, 2002). No entanto, estes trabalhos tratam de relações pontuais entre determinadas espécies de bactérias e de FMAs.

A proposta do presente estudo se diferencia por avaliar o impacto causado na micorrização devido à alteração da comunidade microbiana total do solo, além de descrever o efeito de FMAs inoculados na estruturação das comunidades de bactérias e fungos no solo. Este tipo de interação foi descrito atualmente com detalhes para a associação entre bactérias e fungos ectomicorrízicos (DEVEAU, 2016), onde o autor relata a presença de um ‘core’ bacteriano, composto de diversos gêneros, influenciados pelas raízes colonizadas por estes organismos, principalmente devido à diferenciação da exsudação radicular.

A separação temporal de amostras inoculadas com cada espécie de FMA também foi analisada. Observa-se efeito do tempo nas comunidades microbianas inoculadas com *D. heterogama* e *Gi. rosea*, enquanto solos inoculadas com *R. clarus* mostraram comunidades bacterianas mais uniformes (Figura 3). Esta maior estabilidade das comunidades associadas a *R. clarus* pode indicar a essencialidade desta interação para o fungo, que limita as variações temporais, assumindo papel primordial na composição das comunidades bacterianas dos solos.

Figura 3 - Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a estruturação temporal das comunidades bacterianas nas amostras de solos inoculados com as espécies de FMAs (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) e associados as diferentes diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}). As amostras coletadas nos três períodos (30, 60 e 120 dias de desenvolvimento das plantas) são demonstradas. Os valores dos eixos indicam a porcentagem de variância dos dados representados em cada eixo

Esta variação dos grupos formados durante as avaliações das comunidades bacterianas foi observada no estudo realizado com fungos ectomicorrízicos e foi mencionado que o fator determinante para este efeito foi o funcionamento da associação entre os organismos associados, ou seja, planta hospedeira e os fungos ectomicorrízicos (DEVEAU, 2016). É possível, portanto, sugerir que em alguns casos a simbiose é explorada de maneira diferencial ao longo do tempo, fazendo com que algumas das interações entre FMAs e as bactérias do solo possam também apresentar variação temporal.

Comportamento similar ocorre na exsudação das raízes das plantas, que se altera de forma qualitativa e quantitativa ao longo do seu desenvolvimento e resulta em mudanças na comunidade microbiana que responde ou pode interagir com estes exsudatos e consequentemente com a planta hospedeira (MICALLEF et al., 2009; CHAPARRO et al., 2013). Por isto, deve-se considerar que diferentes espécies de FMAs tem a habilidade de promover a sucessão trófica e funcional de distintas comunidades bacterianas.

2.5.5 Diferenciação das comunidades de bactérias ao longo das diluições e tempo

Devido às variações causadas pela inoculação dos FMAs e pela dinâmica temporal das comunidades, a visualização direta da diferenciação destas comunidades devido ao gradiente formada pelas diluições do solo utilizados nos tratamentos ficou comprometida. Na busca por esta visualização, os dados foram detalhadamente comparados quanto às composições das comunidades bacterianas em cada tempo, com as amostras unicamente inoculadas com cada FMA (Figura 4).

De maneira geral, houve tendência de separação das amostras inoculadas com menores diluições microbianas (10^{-1} e 10^{-3}) das demais, sendo este efeito observado mais claramente em algumas situações com inoculação de *D. heterogama* e *Gi. rosea*. Adicionalmente, observa-se nestes tratamentos uma maior uniformidade entre as repetições e a segregação das amostras com maiores diluições microbianas (10^{-6} e 10^{-9}). As amostras inoculadas com *R. clarus* mostraram uma menor de separação entre os tratamentos, sendo este efeito anulado nas amostras coletadas aos 120 dias de desenvolvimento das plantas (Figura 4).

A explicação para esta pequena diferenciação observada entre os grupos dos distintos tratamentos microbianos pode estar na metodologia de análise. A técnica molecular do TRFLP apresenta deficiência quanto à cobertura de elevada quantidade de grupos, não havendo a possibilidade de estabelecer correlações diretas entre os tratamentos.

Figura 4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) com a organização da comunidade bacteriana em função das diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) para cada FMA inoculado (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) durante os períodos de amostragens. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

De forma mais detalhada, observa-se que com a inoculação do FMA *D. heterogama*, os pontos referentes à diluição microbiana 10^{-1} ficaram próximos aos 30, 60 e 120 dias e sempre houve a formação de outro grupo microbiano composto das diluições microbianas 10^{-6} e 10^{-9} (Figura 4). No entanto, a correlação entre a observação de comunidades bacterianas específicas e alterações nas taxas de %CM não foi observada, ou seja, os grupos encontrados nesta análise não refletiram em diferenciação nos valores de %CM.

Quando se inoculou a espécie de FMA *Gi. rosea*, observou-se agrupamento das repetições da diluição microbiana 10^{-3} aos 30 dias (Figura 4). Na amostragem feita aos 60 dias não foi possível observar distinções claras entre as comunidades presentes nos diferentes tratamentos (apenas um maior agrupamento das amostras do tratamento 10^{-1} foi observado). Aos 120 dias observou-se a formação de dois grupos distintos; um formado pelas diluições com maior diversidade de células microbianas (10^{-1} e 10^{-3}) e outro grupo formado pelos tratamentos com menor diversidade microbiana (10^{-6} e 10^{-9}).

O agrupamento dos pontos da diluição microbiana 10^{-1} coincidiu com o tratamento com maior taxa de %CM aos 120 dias, porém o agrupamento das amostras 10^{-3} (próximo as amostras 10^{-1}) não corrobora esta observação. De maneira similar, a maior taxa de %CM aos 30 dias de desenvolvimento das plantas foi obtida com a associação deste FMA e a diluição 10^{-1} , o qual não apresentou os pontos distintos dos demais na presente análise. Estas observações indicam uma correlação parcial entre a ocorrência de grupos particulares de bactérias no solo e as taxas de %CM encontradas nos diferentes tratamentos.

A capacidade de influenciar a comunidade bacteriana pode ser relacionada a características intrínsecas do FMA inoculado ou mesmo a sua família (POWEL et al., 2009; CHAGNON et al., 2013), como demonstrado pelos FMAs classificados na família Gigasporaceae.

Quando foi feita a inoculação com *R. clarus* não se observou uma separação clara dos tratamentos formados pelas diluições da comunidade microbiana, mesmo no primeiro período de amostragem, aos 30 dias (Figura 4). No entanto, os maiores valores de %CM foram observados com associação deste FMA com as diluições 10^{-1} e 10^{-3} . Na amostragem feita aos 60 dias, apenas uma tendência de separação ocorre para os tratamentos 10^{-6} e 10^{-9} dos demais tratamentos, mas que não condiz com diferenças nos valores de %CM.

Em conjunto, isto indica a impossibilidade de se correlacionar a estrutura destas comunidades diretamente com alterações nas taxas de %CM. Possivelmente, este FMA tenha uma grande capacidade de seleção da comunidade bacteriana, tornando-a mais homogênea entre os tratamentos. Isto contrapõe o fato da variação observada nos valores de %CM, o que pode indicar que o detrimento de interações essenciais a este FMA nos tratamentos mais diluídos esteja relacionada a grupos de baixa frequência na comunidade microbiana, pouco representados na análise de T-RFLP. Neste caso, uma análise mais detalhada, como a baseada no sequenciamento de DNA poderia suprir dados adicionais neste tema.

2.5.6 Alterações na comunidade de fungos do solo promovida pela inoculação de FMAs

O monitoramento da estrutura da comunidade de fungos do solo forneceu uma visão detalhada do efeito dos FMAs inoculados neste grupo. A análise revela a capacidade de separação dos grupos fúngicos de acordo com o FMA inoculado, neste caso com destaque para o tratamento onde foi inoculado *Gi. rosea* em relação a inoculação dos FMAs *D. heterogama* e *R. clarus* (Figura 5). Observa-se, portanto, de maneira similar ao encontrado para a comunidade bacteriana, que os menores efeitos sobre a comunidade de fungos foram os períodos de amostragens (tempo) e as diluições da comunidade microbiana.

Figura 5 - Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na composição diferencial das comunidades de fungos encontradas nos solos inoculados com as espécies de FMAs (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) e associados as diferentes diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}). As amostras coletadas nos três períodos (30, 60 e 120 dias de desenvolvimento das plantas) são demonstradas. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

A diferenciação dos agrupamentos formados foi confirmada pela análise de similaridade (ANOSIM) entre os grupos de amostras inoculadas ou não com *Gi. rosea* (Tabela 4). Os dados demonstram que o grupo de fungos gerado em função da inoculação de *Gi. rosea* é distinto dos demais, no entanto apresentam similaridades (valores de R inferiores a 75%). É também importante destacar o valor obtido para a comparação entre os grupos

formados pela inoculação das espécies pertencentes à mesma família, que apresentaram maior diferença entre os agrupamentos (66%).

Tabela 4 - Valores de R, obtidos pela análise de similaridade (ANOSIM), onde foram comparados os perfis das áreas dos picos de fragmentos terminais do gene ITS de solo, gerados pela inoculação de espécies de FMAs associados às diferentes comunidades microbianas

ANOSIM	<i>D. heterogama</i>	<i>R. clarus</i>	<i>Gi. rosea</i>
<i>D. heterogama</i>	-	0,15	0,66
<i>R. clarus</i>	0,15	-	0,59
<i>Gi. rosea</i>	0,66	0,59	-

O agrupamento preferencial das amostras inoculadas com *Gi. rosea* contrapõe o observado na comunidade de bactérias, onde a maior diferenciação foi encontrada para o tratamento inoculado com *R. clarus*. Esta constatação pode levar a inferências sobre os mecanismos utilizados por cada FMA para selecionar a microbiota associada.

Inicialmente, pode-se sugerir que espécies classificadas na família Gigasporaceae (*Gi. rosea* e *D. heterogama*) provavelmente utilizam mecanismos semelhantes com relação a seleção de grupos bacterianos. No entanto, os dados não corroboram esta hipótese, sendo que os grupos de fungos formados pela inoculação de *R. clarus* e *D. heterogama* (de famílias distintas) foram considerados idênticos pela análise de similaridade, com apenas 15% de diferença entre eles (Figura 5, Tabela 4).

Neste caso, pode-se dizer que a seleção de grupos fúngicos independe de características relacionadas à família em que o FMA se classifica, ou seja, este fato pode não ser relacionado à atividade metabólica do FMA. Sugerindo que a ocorrência deste efeito seja devido a formação de uma situação propícia formada pelos FMAs, devido a alteração de alguma condição prejudicial ou mesmo pela disponibilidade de nichos para outros grupos de fungos.

Outro ponto que se mostrou distinto do previamente observado para a análise da comunidade bacteriana, foi o efeito temporal na disposição das comunidades de fungos do

solo com relação aos FMAs inoculadas que não mostrou claro padrão de separação destes grupos nos períodos de amostragem (Figura 6). Esta comunidade se apresenta mais estável ao longo do tempo, sendo que as amostras oriundas dos períodos de análise se encontram misturadas nas PCoAs.

Figura 6 - Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a estruturação temporal das comunidades de fungos nas amostras de solos inoculados com as espécies de FMAs (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) e associados as diferentes diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}). As amostras coletadas nos três períodos (30, 60 e 120 dias de desenvolvimento das plantas) são demonstradas. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

Observa-se ainda uma tendência no agrupamento de pontos de amostras coletadas aos 120 dias, principalmente para aqueles inoculados com *Gi. rosea* e *R. clarus*. Os pontos referentes à amostragem realizada aos 60 dias do tratamento inoculado com FMA *R. clarus* também apresentaram-se próximos (Figura 6). Estas observações sugerem que as comunidades de fungos do solo foram menos influenciadas pelo efeito do tempo de colonização dos FMAs, desenvolvimento vegetal ou incubação das diluições microbianas, mas podem ser consideradas mais homogêneas dentro de cada tratamento ao longo do tempo.

2.5.7 Diferenciação das comunidades de fungos ao longo das diluições e tempo

Devido à verificação da influencia dos FMAs inoculados na formação dos grupos fúngicos em detrimento da organização temporal destas comunidades, procedeu-se as análises dos agrupamentos para observar o efeito de cada FMA no gradiente de diversidade formado

pelas diluições microbianas (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) durante as amostragens (Figura 7). A ordenação das comunidades de fungos do solo em função das diluições microbianas para cada FMA inoculado mostrou a capacidade do FMA em organizar esta comunidade em função da diversidade microbiana dos sistemas.

Figura 7 - Análise de coordenadas principais (PCoA) com a organização da comunidade de fungos em função das diluições da comunidade microbiana (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) para cada FMA inoculado (*D. heterogama*, *R. clarus* e *Gi. rosea*) durante os períodos de amostragens. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

Nos tratamentos inoculados com os FMAs *R. clarus* e *Gi rosea* foi possível observar a separação das amostras das diluições 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} , que formaram um grupo separado dos pontos referente a diluição microbiana 10^{-1} . Esta observação sugere que estes FMAs apresentam maior efeito seletivo nas comunidades de fungos em condição de menor diversidade microbiana (maiores diluições microbianas). Este fato pode ter contribuído para as alterações observadas nas taxas de %CM.

Com a inoculação do FMA *D. heterogama* observou-se estruturação das comunidades de fungos do solo em função das diluições microbianas aos 30 e 120 dias. Aos 30 dias após inoculação, nota-se que os pontos das diluições microbianas 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} se aproximam entre si e aos 120 dias observa-se que os pontos 10^{-1} e 10^{-3} ficam próximos, e se separam do grupo formado pelos pontos referentes à comunidade microbiana formada pelas maiores diluições (10^{-6} e 10^{-9}).

Sabe-se que grupos microbianos podem interagir de forma positiva, negativa ou neutra com FMAs (BAREA et al., 2002) e que estes grupos são importantes pois desempenham uma amplitude de serviços ao ecossistema e consequentemente beneficiam as plantas (MENDES et al., 2013). A interação da microbiota com FMAs pode ocorrer em seus esporos e micélios (BHARADWAY et al., 2008; SCHÜßLER, 2002) e esta microbiota geralmente é selecionada devido ao FMA que compõem o sistema, além da observação de importante impacto e alteração na exsudação da planta que é colonizada por determinado FMA (CHAPARRO et al., 2013; MICALLEF et al., 2009).

No entanto, os dados de interação e seleção microbiana disponíveis na literatura se baseiam em grupos específicos de bactérias ou fungos, e não em comunidades microbianas do solo, o que fornece singularidade a este trabalho, devido à observação do efeito que as espécies de FMAs inoculadas promoveram na estruturação de comunidades de fungos do solo.

Muitas lacunas permanecem a serem preenchidas com relação à diversidade e ecologia deste grupo de microrganismos do solo (STERKENBURG et al., 2015), pois os diferentes grupos funcionais de fungos respondem as alterações no ambiente de maneira distinta (MATHENY et al., 2006; KOIDE et al., 2013; CROWTHER et al., 2014). Adicionalmente, sabe-se que em alguns casos ocorrem efeitos negativos de FMAs sobre a comunidade de fungos saprofíticos presentes na rizosfera de plantas, principalmente devido a elevada concentração de micélio extra radicular no solo (SMITH et al., 2004). Em

combinação, pode-se indicar que o balanço de carbono no solo seja fator fundamental para a estruturação das comunidades de fungos, diferencialmente encontrada no presente estudo.

2.6 Conclusões

- a) Os fungos micorrízicos arbusculares inoculados em solos com diferencial composição da comunidade microbiana promoveram distintas taxas de colonização micorrízica na planta de cana-de-açúcar;
- b) A resposta de cada FMA foi diferenciada com relação ao gradiente de diversidade microbiana dos solos, sendo *R. clarus* o mais sensível a perda da diversidade do sistema e *D. heterogama* a espécie menos sensível a este efeito;
- c) A inoculação do FMA em diferentes composições da microbiota do solo resultou na diferenciação das comunidades de fungos e bactérias do solo, sendo que a comunidade bacteriana mostrou-se mais diferenciada a presença de *R. clarus*, enquanto que a comunidade de fungos mostrou-se mais distinta devido a inoculação de *Gi. rosea*.

Estes resultados indicam a ocorrência de uma intrínseca interação entre os FMAs e a microbiota dos solos, dando necessidades maiores a funcionalidade deste sistema do que a previamente descrita entre a relação planta- FMA.

Referências

- ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhiza. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, p. 69–78, 1994.
- ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 192, p. 71–79, 1997.
- AVIO, L.; PELLEGRINO, E.; BONARI, E.; GIOVANNETTI, M. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. **New Phytologist**, Hoboken, v. 172, p. 347–357, 2006.

AVIS, P.G.; DICKIE, I.A.; MUELLER, G.M. A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 15, p. 873-882, 2006.

AZAIZEH, H.A.; MARSCHNER, A.; RÖMHELD, V.; WITTENMAYER, L. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth, mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. **Mycorrhiza**, New York, v. 5, p. 321-327, 1995.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 343-351, 2002.

BHARADWAJ, D.P.; LUNDQUIST, P.; PERSSON, P.; SADHNA ALSTRÖM, S. Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 310-322, 2008.

BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; BONFANTE, P.; VANDAMME, P. '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 121-124, 2003.

BOERSMA, 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* fruiting bodies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 1979-1989, 2009.

BOTTOMLEY, P.J. Microbial ecology. In: SYLVIA, D.M.; FURRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. **Principles and applications of soil microbiology**. 2nd ed. New Jersey: Upper Saddle River, 2005. p. 463-488.

BULGARELLI, D.; SPAEPEN, S.S.; THEMAAT, E.V. L.; SHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 807-838, 2013.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; CAVALCANTE, A.T.; SANTOS, V.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 1099-1106, 2002.

CHAGNON, P-L.; BRADLEY, R.L.; MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J.N. A trait-based 475 framework to understand life history of mycorrhizal fungi. **Trends Plant Science**, London, v. 18, p. 476-491, 2013.

CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; BAKKER, M.G.; SUGIYAMA, A.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **PLoS One**, Oxford, v. 8, p. 55731, 2013.

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

CLARKE, K.R.; GORLEY, R. **PRIMER v5**: user manual/tutorial PRIMER-E. Plymouth, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, 2013. v. 1.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**: v. 2; safra 2015/16, n. 2: segundo levantamento. Brasília, 2015.

CROWTHER, T.W.; MAYNARD, D.S.; CROWTHER, T.R.; PECCIA, J.; SMITH, J.R.; BRADFORD, M.A. Untangling the fungal niche: the trait-based approach. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 579, 2014.

CRUZ, A.F.; MARTINS, M.A. Transferência de nitrogênio entre plantas interconectadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 559–565, 1997.

DALRI, A.B; CRUZ, R.L. Efeito da frequência de irrigação subsuperficial por gotejamento no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Brazilian Journal of Irrigation and Drainage**, Botucatu, v. 7, p. 29-34, 2002.

DARLING, E.S.; ALVAREZ-FILIP, L.; OLIVER, T.A.; McCLANAHAN, T.R.; CÔTE, I.M. Evaluating life-history strategies of reef corals from species traits. **Ecology Letters**, Oxford, v. 15, p. 1378–1386, 2012.

DEVEAU, A. How does the tree root microbiome assemble? Influence of ectomycorrhizal species on *Pinus sylvestris* root bacterial communities. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 18, n. 5, p.1303-1305, 2016.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; HANNULA, S.E.; ANDREOTE, F.D.; PEREIRA, E.; SILVA, M.D.C.; SALLES, J.F.; VAN ELSAS, J.D. Different selective effects on rhizosphere bacteria exerted by genetically modified versus conventional potato lines. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, e67948, 2013.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, SPI, 397p. 2009.

FELLBAUM, C.R.; MENSAH, J.A.; CLOOS, A.J.; STRAHAN, G.E.; PFEFFER, P.E.; KIERS, T.E; BÜCKING, H. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. **New Phytologist**, Hoboken, v. 203, p. 646–656, 2014.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Manchester, v. 46, p. 235-246, 1963.

GERDEMANN, J.W.; TRAPPE, J.M. The *Endogonaceae* of the Pacific Northwest. **Mycology**, Lawrence, v. 5, p. 1–76, 1974.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Hoboken, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GRIME, J.P. **Plant strategies and vegetation processes**. New York: John Wiley, 1979. 247 p.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** (Coquina Press), California, vol. 4, n.1, art. 4: 9pp. 2001.

HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 394, n.30, p. 394- 431, 1998.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I.R.; FROSSARD, E. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. **Mycorrhiza**, New York, v. 12, p. 225–234, 2002.

KIERS, E.T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J.A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; FELLBAUM, C.R.; KOWALCHUK, G.A.; HART, M.; BAGO, A.; PALMER, T.M.; WEST, S.A.; VAN DEN KOORNHUYSE, P.; JANSA, J. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. **Science**, Washington, v. 333, p. 880–882, 2011.

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

KOIDE, R.T.; FERNANDEZ, C.; MALCOLM, G. Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function. **New Phytologist**, Hoboken, v. 201, p. 433–439, 2013.

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 405-413, 2006.

LEKBERG, Y.; KOIDE, R.T. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. **New Phytologist**, Hoboken, v. 168, p. 189-204, 2005.

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

MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J. N. Phylogenetic and trait-based assembly of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **PLoS One**, Oxford, v. 7, p. 36695, 2012.

- MALLON, C.A.; POLY, F.; LE ROUX, X.; MARRING, I.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. **Ecology**, Washington, v.96, p. 915-926, 2015.
- MARSCHNER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 251, p. 279–289, 2003.
- MATHENY, P.B.; CURTIS, J.M.; HOFSTETTER, V.; AIME, M.C.; MONCALVO, J.M.; GE, Z.W.; YANG, Z.L.; SLOT, J.C.; AMMIRATI, J.F.; BARONI, T.J. Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. **Mycology**, Lawrence, v. 98, p. 982–995, 2006.
- MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology**, New York, v. 37, p. 634–663, 2013.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 191–196, 1986.
- MICALLEF, S.A.; CHANNER, S.; SHIARIS, M.P., COLON-CARMONA, A. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the Arabidopsis rhizosphere. **Plant Signaling & Behavior**, Seattle, v. 4, p. 777–780, 2009.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MARTIN NETO, L. Provável mecanismo de liberação do manganês no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 725-731, 1993.
- MORTON, J.B. Three new species of Acaulospora (Endogonaceae) from high-aluminium, low pH soils in West Virginia. **Mycology**, Lawrence, v. 78, p. 641–648, 1986.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 471–491, 1990.
- NIX-STOHR, S.; MOSHE, R.; DIGHTON, J. Effects of propagule density and survival strategies on establishment and growth: further investigations in the phylloplane fungal model system. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 38–44, 2008.
- NOË, R.; HAMMERSTEIN, P. Biological markets. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 10, p. 336–339, 1995.
- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1605-1612, 2002.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. (Ed.). **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, 1999. 399 p.

OEHL, F.; LACZKO, E.; BOGENRIEDER, A.; STAHR, K.; BÖSCH, R.; VAN DER HEIJDEN, M.; SIEVERDING, E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 724–738, 2010.

PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: In: AURORA, D. K.; RAI, B.; MUKERJI, K. G.; KNUDSEN, G. (Ed.). **Handbook of applied mycology, soil and plants**. New York: Marcel Dekker, v. 1, p. 77-129. 1991.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasite an arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British of Mycological Society**, Manchester, v. 55, p. 158-161, 1970.

PORTER, W.M.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Field survey of the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. **Journal of Applied Ecology**, Manchester, v. 24, p. 659-662, 1987.

POWELL, J.R.; PARRENT, J.L.; HART, M.M.; KLIRONOMOS, J.N.; RILLIG, M.C.; MAHERALI, H. Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. **Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences**. Boston, v. 276, p. 4237–4245, 2009.

REDECKER, D.; SCHÜßLER, A.; STOCKING, H.; STÜRMER, S.; MORTON, J.; WALKER, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). **Mycorrhiza**, New York, v. 23, p. 515–531, 2013.

RODRIGUES, J.L.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS EDA, C.; PAULA, F.S. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 110, p. 988–993, 2013.

SCANNERINI, S.; BONFANTE, P. Bacteria and bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi. In: MARGULIS, L.; FESTER, R. (Ed.). **Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis**. Cambridge: MIT Press, 1991. p. 273–287.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

_____. A new version of the Assistat -statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SILVEIRA, S.V.; SOUZA, P.V.D.; KOLLER, O.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de abacateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 303–309, 2002.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 221–244, 1988.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A.; JAKOBSEN, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. **New Phytologist**, Hoboken, v. 162, p. 511–524, 2004.

SCHÜßLER, A. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 244, p. 75–83, 2002.

STERKENBURG, E.; BAHR, A.; DURLING, M.B.; CLEMMENSEN, K.E.; LINDAHL, B.D. Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. **New Phytologist**, Hoboken, v. 207, p. 1145–1158, 2015.

VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVÁ, D.; KRIŠTUFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1159–1164, 2012.

VIERHEILIG, H.; GOUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHE, Y. Ink and Vinegar, a simple staining technique for arbuscular - mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 5004–5007, 1998.

WALKER, C.; SANDERS, F.E. Taxonomic concepts in the *Endogonaceae*: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. and Trappe. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 27, p. 169–182, 1986.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J.I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; GUILLAUMAUD, N.; LE ROUX, X. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 9, p. 2211–2219, 2007.

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

WERNER, G.D.A.; STRASSMANN, J.E.; IVENS, A.B.F.; ENGELMOER, D.J.P.; VERBRUGGEN, E.; QUELLER, D.C.; NOË, R.; JOHNSON, N.C.; HAMMERSTEIN, P.; KIERS, E.T. Evolution of microbial markets. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 111, p. 1237–1244, 2014.

WINEMILLER, K.O.; ROSE, K.A. Patterns of life-history diversification in North American fishes: implications for population regulation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 49, p. 2196–2218, 1992.

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

3 ASSOCIAÇÕES ENTRE A MICROBIOTA DE SOLOS E *Rhizophagus clarus* NA COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA DE PLANTAS DE MILHO

Resumo

Entender as mudanças que ocorrem em decorrência da associação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e comunidades microbianas durante a colonização da planta hospedeira é um tema pouco explorado e de grande interesse. A funcionalidade e composição da comunidade microbiana do solo em decorrência desta associação podem fornecer indícios do metabolismo microbiano e grupos de microrganismos que podem estar envolvidos no aprimoramento desta interação. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da composição diferencial de comunidades microbianas na colonização micorrízica de *Rhizophagus clarus* em plantas de milho. Estas inferências foram realizadas em dois solos (denominados de A e B), submetidos à metodologia de diluição para extinção, onde foram utilizadas as diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} das comunidades microbianas originais, avaliadas quando inoculadas ou não com o FMA. As amostragens de solo e de raízes finas foram realizadas aos 20, 30 e 40 dias de desenvolvimento das plantas de milho e procederam-se as análises da comunidade bacteriana associada, por meio de técnicas de quantificação por qPCR, sequenciamento do gene 16S rRNA e determinação das taxas de colonização micorrízica (%CM) nas raízes. O metabolismo das comunidades bacterianas dos solos foi baseado no consumo de fontes de carbono (placas de BIOLOG), utilizando amostras das fases inicial e final de desenvolvimento das plantas (20 e 40 dias). A abundância das comunidades bacterianas dos solos se manteve praticamente constante durante a condução do experimento, enquanto ocorreu decréscimo no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e diversidade filogenética (PD) nos tratamentos obtidos ao longo do gradiente de diversidade microbiana (diluições). Houve influência do gradiente de diversidade das comunidades microbianas inoculadas nas taxas de colonização micorrízica (%CM) dos tratamentos com inoculação do FMA, com destaque para a fase inicial de desenvolvimento da planta hospedeira. Estes dados se correlacionaram de forma positiva e significativa com o número de OTUs e PD das comunidades microbianas dos solos. A inoculação de *R. clarus* alterou o metabolismo das comunidades bacterianas, as quais apresentaram diferenciada estrutura com relação ao consumo das fontes de carbono, além de um acréscimo na quantidade de carbono consumida (determinada como ‘community niche’). Em conjunto, os dados indicam uma grande conexão da comunidade microbiana dos solos com a colonização das plantas por *R. clarus*, sendo que alterações em um destes componentes pode resultar em alterações na interação do FMA com a planta.

Palavras-chave: Colonização micorrízica; Comunidade microbiana; Diversidade bacteriana; Interações microbianas

Abstract

Understanding the changes that occur due to the association between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and microbial communities of soils during the colonization of the host plant is a relatively unexplored and greatly important subject. The composition and the functionality of the microbial community of soils resulting from this association can provide evidences of microbial metabolism and groups of microorganisms that may be involved in the improvement of this interaction. The aim of this study was to investigate the effect of the differential composition of microbial communities in mycorrhizal colonization of

Rhizophagus clarus in maize plants. These inferences were made in two soils (denominated A and B) subjected to the ‘dilution to extinction’ methodology, with dilutions 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-6} of the original microbial communities evaluated in the presence or not of the inoculated FMA. Sampling of soil and fine roots were performed at 20, 30 and 40 days of maize development, and analyses encompassed the quantification and description of bacterial communities by qPCR and sequencing of the 16S rRNA gene and determination of mycorrhizal colonization rates (%MC) in plant roots. The metabolism of the microbial communities of soil samples was determined on the basis of the differential consumption of carbon sources (Biolog plates), using samples of the beginning and final stage of plant growth (20 and 40 days). The abundance of bacterial communities of soil has remained fairly constant during the experiment, while a decrease in the number of operational taxonomic units (OTUs) and phylogenetic diversity (PD) along the gradient microbial diversity (dilutions) was found. The diversity gradient along the inoculated microbial communities influenced the %MC rates in treatments inoculated with the AMF, remarkably during the early stage of the host plant development. These data are correlated positive and significantly with the number of OTUs and phylogenetic diversity of soil bacterial communities. The inoculation of *R. clarus* changes the metabolism of the bacterial communities with differentiated structure with regard the consumption of the carbon source, in addition to an increase in the amount of carbon consumed (determined as *community niche*). In summary, the data show the strong connection of the microbial community of soil with the colonization of plants by *R. clarus*, and alterations in one of these components can result in changes in the interaction of the AMF with plant.

Keywords: Mycorrhizal colonization; Microbial community; Bacterial diversity; Microbial interactions

3.1 Introdução

Micorriza arbuscular (MA) é uma associação entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e aproximadamente 74% das espécies de plantas (SMITH; READ, 2008; BRUNDRETT, 2009). Esta simbiose gera benefícios mútuos aos simbioss (BEVER, 2003). As hifas dos FMAs são importantes para aprimoramento na absorção de água e de nutrientes do solo, com destaque para a absorção de nutrientes menos móveis no sistema como o fósforo (VAN DER HEIJDEN et al., 2015), conferindo proteção física as raízes das plantas contra patógenos de solo e tolerância a estresses hídrico ou de contaminantes (SCHENCK, 1981; GRIFFIOEN, 1989). A eficiência da associação é demonstrada pela eficaz transferência realizada pela planta de fontes nutricionais (carbono) para o FMA, garantindo a manutenção desta simbiose (GRIGERA et al., 2007).

O reconhecimento entre os simbioss é mediado por sinais moleculares (OLDROYD, 2013), assim como ocorre na interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas, porém, os processos e compostos envolvidos nesta associação ainda necessitam de estudos (LAMBAIS, 2006). Sabe-se que os FMAs são sensíveis a compostos presentes na

rizosfera de plantas hospedeiras, devido exsudação da própria planta ou alterações causadas por componentes do sistema (BECARD; PICHE, 1989; GIANINAZZI-PEARSON et al., 1989; NAIR et al., 1991), como a microbiota associada (DANIELS; TRAPPE, 1980; MAYO et al., 1986; ARTURSSON et al., 2005; SALVIOLI et al., 2016).

Os efeitos de espécies bacterianas em espécies de FMAs podem ser variáveis (CARPENTER-BOGGS et al., 1995; XAVIER; GERMIDA, 2003) e pouco se sabe sobre suas funções e atividades *in situ* (ARTURSSON et al., 2005) ou quando associadas em comunidades ou ainda, sobre a importância da diversidade bacteriana para a eficiente colonização da planta por FMAs. Bomberg e colaboradores (2003) relataram alterações na composição da comunidade bacteriana do solo pela presença do FMA, principalmente devido à influência de hifas.

Neste sentido, o objetivo desta etapa do estudo foi verificar o efeito do gradiente de diversidade de comunidades microbianas distintas na colonização micorrízica de plantas de milho, além de avaliar os efeitos da inoculação de *R. clarus* sobre a composição, diversidade e metabolismo da comunidade microbiana do solo.

3.2 Hipótese Geral

A interação de *Rhizophagus clarus* com comunidades microbianas de solos altera as taxas de colonização micorrízica em plantas de milho e o FMA inoculado tem efeito na composição e funcionalidade das comunidades microbianas do solo.

3.3 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da diminuição gradual na diversidade microbiana do solo nas taxas de colonização micorrízica de *R. clarus* em plantas de milho.
- b) Avaliar a alteração da comunidade microbiana do solo e de sua capacidade funcional quanto ao consumo de carbono, frente ao gradiente de diversidade ou pela inoculação do FMA *R. clarus* em solo cultivado com milho.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Desenho experimental e amostragens

O experimento foi conduzido na Universidade de Groningen (Groningen, Holanda) e os tratamentos foram constituídos por dois solos alterados por atividade antrópica, mais especificamente por adição de material orgânico, denominados de solo 'A' e solo 'B'. O solo 'A' foi coletado em uma área utilizada para agricultura na cidade de Buinen (Holanda) (52°55'386'' N, 06°49'217'' E) e foi utilizado para obtenção da comunidade microbiana 'A'. O solo 'B' foi coletado em área agrícola da cidade de Wildekamp (Holanda) (51°59'771'' N, 05°40'157'' E) e foi utilizado para obtenção da comunidade microbiana 'B'. As amostras dos dois solos foram coletadas na profundidade de 0-20 cm.

O solo 'A' também foi utilizado para compor os microcosmos, para isto, foram submetidos à esterilização com radiação gama em intensidade de 50 kiloGray (Synergy Health Ede B.V. [®]). Após este tratamento, uma alíquota foi amostrada e submetida à análise de suas propriedades químicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades químicas do substrato utilizado para constituição dos microcosmos.

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H +Al	CTC	M.O	Mn	Zn
CaCl ₂	mg dm ⁻³		-----mmolc dm ⁻³ -----					g dm ⁻³	-----mg dm ⁻³ -----	
4,1	10,9	1,3	12	4	5	88	105,3	55	19,3	9,6

Nota: pH em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; fósforo (P) método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons, potássio (K) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica, alumínio trocável (Al) método colorimétrico extraído com cloreto de potássio 1 mol L⁻¹, acidez potencial (H+Al) extraído com tampão SMP, CTC: Capacidade de troca de cátions. M.O: Colorimétrica. Cobre (Cu) e manganês (Mn) extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica. (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2001)

O solo utilizado no estudo possui elevada concentração de matéria orgânica, o que também os caracteriza com elevada capacidade de troca de cátions (CTC), mesmo sendo um solo arenoso, porém com baixa soma de bases (Ca, K e Mg). Esta característica gera um valor baixo de saturação por bases (V%), neste caso de aproximadamente 16%. Devido a estas

observações, pode-se considerar que o solo utilizado neste estudo apresenta baixa fertilidade natural, característica similar ao solo utilizado no capítulo 2 desta tese.

As suspensões microbianas que deram origem ao gradiente de diversidade das comunidades microbianas 'A' e 'B' foram obtidas pelo método de diluição para extinção (WERTZ et al., 2006, 2007; VAN ELSAS et al., 2012; MALLON et al., 2015). Foram utilizadas neste estudo as diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} (apêndice C), além de ausência de microbiota inoculada. As diluições de células microbianas foram obtidas a partir dos solos utilizados (solos A e B) e posteriormente inoculadas apenas sobre alíquotas do solo 'A' previamente esterilizado e acondicionado em recipientes com capacidade para 2 kg de solo. Em cada um destes vasos foram inoculados 60 ml de cada uma das diluições microbianas.

Após a inoculação das diluições, estes foram mantidos em casa de vegetação em condições controladas (descritas abaixo) e com adição diária de água esterilizada durante o período de 30 dias. Este período serviu para que os grupos microbianos presentes em cada tratamento atingissem similar abundância de suas respectivas comunidades (conforme item 1.2.4).

A verificação da abundância bacteriana ao longo do gradiente de diversidade microbiano durante o período de incubação foi realizada por meio da coleta de amostras de solo e contagem das colônias de bactérias. Para tanto, as amostras foram utilizadas para gerar uma diluição seriada (10^{-2} e 10^{-3}) em solução de NaCl 0,9%, as quais foram posteriormente incubadas (100 μ l) em placas de cultivo contendo o meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) com adição de antifúngico ciclohexamida (10 mg ml^{-1}). A incubação foi feita a 26° C durante 48 horas e posteriormente obteve-se a contagem das colônias formadas, em seguida foi feita a transformação do valor para unidades formadoras de colônias (UFC) para cada tratamento.

A inoculação de esporos da *R. clarus* e o plantio de sementes de milho foi realizada quando as diluições inoculadas atingiram aproximadamente 10^7 UFC g^{-1} de solo em todos os tratamentos. Neste momento, foram adicionados aproximadamente 30 esporos do FMA e quatro sementes de milho (híbrido DELITOP CRM 88) em cada um dos microcosmos. Após a germinação das sementes foi feito o desbaste e manteve-se apenas uma planta por microcosmo.

Para um maior controle dos dados, foram também gerados microcosmos contendo apenas as diferentes comunidades microbianas, porém sem a inoculação do FMA. Os microcosmos foram mantidos em casa-de-vegetação, com temperatura média de 25° C e alternância de período de luminosidade de 8 em 8 horas e manutenção de umidade dos

microcosmos a 75% da capacidade de campo, com pesagem diária dos vasos e adição de água esterilizada.

Para cada uma das comunidades microbianas foram gerados sete tratamentos, compostos pelas diluições de células microbianas 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} com inoculação de *R. clarus* (FM+ 10^{-1} , FM+ 10^{-3} e FM+ 10^{-6}) e as diluições microbianas em ausência de inoculação do FMA (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}), além do FMA na ausência de microbiota inoculada (FM).

Os microcosmos com inoculação das comunidades microbianas 'A' e 'B' foram separados por bancadas na casa de vegetação e os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e três períodos de coleta. As amostragens foram realizadas aos 20, 30 e 40 dias de desenvolvimento das plantas de milho (que coincide com o período de inoculação do FMA).

As amostras de solo foram armazenadas em freezer a -80°C para extração de DNA e análises posteriores do gene 16S rRNA, enquanto as amostras de raízes finas foram armazenadas em álcool a concentração de 70% para posterior análise da colonização por FMA. Adicionalmente, foram coletadas amostras de solo, diretamente levadas para a avaliação do consumo de fontes de carbono (BIOLOG).

3.4.2 Determinação das taxas de colonização micorrízica nas amostras de raízes

As raízes finas das plantas foram utilizadas para mensuração da taxa de colonização micorrízica (%CM). Após as coletas, as raízes foram lavadas e armazenadas em tubos plásticos com adição de etanol na concentração de 70% até o momento de seu preparo para posterior determinação da %CM. Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente, para retirada do excesso de álcool e posteriormente imersas em solução de KOH 10%. Após 24 horas substitui-se a solução anteriormente adicionada por uma nova solução de KOH 10%, que foi mantida por mais 24 horas com a finalidade de descorar totalmente as raízes. Após este período as raízes foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de reagente (PHILLIPS; HAYMAN, 1970).

Adicionou-se então a solução de tinta de caneta (40 ml de tinta de caneta em 1L de ácido acético 5%), onde as raízes foram mantidas por 1 minuto a 90°C , e após este período as raízes foram separadas por peneiramento. O armazenamento das raízes coradas foi feito em solução de ácido láctico, glicerina e água (1:1:1) até o momento da determinação da %CM (VIERHEILIG et al., 1998).

A determinação das taxas de colonização micorrízica foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico (lupa) com aumento mínimo de 40x, utilizando o método de intercessão das linhas cruzadas (*grid line method*). Este método é baseado na observação de fragmentos de raízes em placa quadriculada (1 mm por 1 mm) e determinação de fragmentos colonizados e não colonizados pelo FMA, para o cálculo da porcentagem de raízes colonizadas (%CM) na amostra (GIOVANETTI; MOSSE, 1980).

Os valores obtidos referentes às taxas de %CM foram analisados quanto à variância dos dados e teste de comparação de médias de Tukey, onde foi observada a significância com valores de probabilidade de erro abaixo de 5%, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002, 2006).

3.4.3 Extração de DNA das amostras de solo

As amostras de solo previamente armazenadas em freezer (-80° C) foram utilizadas para extração de DNA com o kit *Power Soil DNA Isolation* (MoBio laboratories, Carlsbad, CA). Posteriormente, foi feita a quantificação de DNA nas amostras com utilização do kit Quant-iT™ PicoGreen®.

3.4.4 Avaliação da comunidade bacteriana

A quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA foi feita pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e a análise da composição das comunidades bacterianas foi realizada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, segundo metodologia MySeq (Illumina).

As amplificações do gene 16S DNAr para quantificação foram realizadas utilizando os *primers* 16SFP (GGTAGTCYAYGCMSTAAACG) e 16SRP (GACARCCATGCASCACCTG) (BACH et al., 2002), em reações contendo 12,5 µl do Power Sybr Green PCR Master mix 2,0 µl de cada primer (10mM); 0,5 BSA (*Bovine serum albumin*) a 20 mg ml⁻¹; 3,0 µl de água esterilizada e 5,0 µl de DNA genômico (aproximadamente 20 ng). A ciclagem de temperatura foi feita no equipamento 7300 *System Software* e foi estabelecida da seguinte forma: 95° C por 10 min (um ciclo); 35 ciclos de

amplificação de 27s a 95° C, 1 min a 62° C e 30s a 72° C, seguido por extensão final de 10 min a 72° C (PEREIRA E SILVA et al., 2012).

A curva padrão foi obtida pelas diluições seriadas 10^2 a 10^{10} do DNA plasmidial contendo o inserto molde de amplificação (264 pb) e os valores de concentração total (Ct) obtidos foram interpolados para obtenção da equação da reta, que posteriormente foi utilizada para o cálculo do número de cópias do gene 16S DNAr por grama de solo em cada uma das amostras. As amostras foram quantificadas sempre por meio da obtenção de três valores de Ct, derivados de três reações de amplificação, na busca de uma minimização de variações técnicas na quantificação das comunidades.

As composições das comunidades bacterianas presentes nos tratamentos foram acessadas pelo método do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA. Para isto, a região deste gene que hospeda as regiões variáveis (V4 e V5) foram amplificadas em reações de PCR com os *primers* 0515F (GYCAGCMGCCGCGGTA) e 926R (CCGYCAATTYMTTTRAGTTT). Estes *primers* foram adicionados a sequências adaptadoras específicas para posterior uso dos fragmentos amplificados no sequenciamento, realizado no equipamento Miseq Sequencing System (Illumina). Adicionalmente, cada amostra foi amplificada com *primers* contendo uma sequência específica de nucleotídeos (ou MID) em cada um dos *primers*.

As reações para amplificação foram constituídas em 25 µl, contendo 2 µl de DNA genômico (aproximadamente 20 ng), 0,5 µl de cada um dos *primers* (10 mM), 0,25 µl de Taq DNA polimerase de alta fidelidade (*FastStart High Fidelity PCR System*) (5U/µl), 0,5 µl de solução de dNTPs (10 mM) e 0,25 µl de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 20 mg ml⁻¹. A amplificação do fragmento alvo foi então promovida pela submissão das amostras aos ciclos: desnaturação inicial a 95° C por 5 min (1 ciclo), 30 ciclos de amplificação a 95° C por 40s, 56° C por 45s e 72° C por 30s, seguido por extensão final com duração de 10 min a 72° C. As amplificações foram confirmadas por visualização do fragmento (aproximadamente 450 pb) em eletroforese desenvolvida em gel de agarose 1,5% posteriormente corado com solução de brometo e visualizado em luz ultravioleta (UV).

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação de PCR *QuiaQuick* (Quiagen), com posterior quantificação da concentração do DNA no equipamento NanoDrop. A quantidade de cada amostra foi determinada de maneira a compor de forma equimolar o

‘pool’ com todas as amostras enviadas para o sequenciamento (60ng de cada amostra). O sequenciamento foi realizado pela empresa Beckman Coulter Genomics (Danvers-USA).

Os dados gerados foram analisados com Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 1.9.1). Inicialmente, as leituras L01/R01 e L02/R02 de cada uma das sequências foram unidas e as sequências de baixa qualidade (qualidade Phred menor que 30 ou contendo bases ambíguas) foram removidas da análise. As sequências dos *primers* e adaptadores foram também removidos das sequências. Posteriormente, separaram-se as sequências de acordo com sua amostra de origem, com base na sequência contida em cada uma das MIDs (MID *forward* e MID *reverse*). Estas foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs ou *OTUs*), geradas com base na identidade de 97% entre as sequências pertencentes a uma mesma OTU. A tabela de OTUs gerada foi rarificada, para que apenas 5.426 sequências de cada uma das amostras fossem consideradas nas análises posteriores.

Inicialmente uma comparação entre as comunidades bacterianas foi realizada pela análise de coordenadas principais (PCoA). Foram também realizadas estimativas de dados ecológicos, como a riqueza das comunidades (número de OTUs e estimador de riqueza de Chao1) e diversidade filogenética (PD) das comunidades bacterianas. Estes dados foram comparados e posteriormente utilizados para o cálculo de correlações de Pearson entre os valores de OTUs e PD com relação às taxas de %CM, utilizando o programa Paleontological Statistics Software - programa PAST (HAMMER et al., 2001).

Este arquivo contendo as sequências rarificadas foi também usado para determinação da afiliação taxonômica de cada uma das OTUs, obtida comparando uma sequência de cada OTU com as contidas no banco de dados do Ribossomal Database Project (RDP). Sendo apresentados nas figuras os grupos oriundos do sequenciamento que apresentaram abundância relativa maior ou igual a 2%, para melhor visualização da afiliação contida em cada tratamento.

Com estes dados taxonômicos buscaram-se na literatura algumas características e particularidades dos gêneros ou famílias, com a finalidade de fazer associações aos tratamentos e ao ambiente formado pela inoculação dos mesmos. Além da observação de gêneros de bactérias que foram relatadas como auxiliares ou condicionadoras do processo de micorrização por alguns FMAs (ARTURSSON et al., 2006).

3.4.5 Determinação dos perfis metabólicos das comunidades microbianas

O acesso ao perfil metabólico das comunidades microbianas foi obtido utilizando-se placas de BIOLOG tipo GENIII MicroPlate™ (BIOLOG, Hayward, CA, USA), compostas por 71 fontes de carbono que simulam fontes presentes no solo devido a exsudação radicular. Nesta análise, foram utilizadas amostras de solo coletadas nas fases de 20 e 40 dias de desenvolvimento das plantas em ausência ou presença de interação com *R. clarus*.

O ajuste da melhor diluição a ser utilizada foi feito em análise inicial apenas com amostras de solo contendo a menor ou maior diluição da comunidade microbiana (10^{-1} e 10^{-6} , respectivamente). Após o teste foi determinado que as amostras de solo deveriam ser diluídas na razão 1: 100 na solução de NaCl 0,8% previamente a incubação das amostras nas placas de análise.

As amostras de solo dos diferentes tratamentos, coletadas nos períodos de 20 e 40 dias de desenvolvimento das plantas, foram submetidas à diluição apropriada em solução de NaCl 0,8%, e alíquotas de 1,2 ml foram adicionadas a 10,8 ml da solução denominada IF-B (solução componente do kit para utilização das placas de BIOLOG). Esta mistura foi lentamente homogeneizada e uma amostra de 100µl foi adicionada em cada poço da placa de BIOLOG GENIII MicroPlate™. Todas as instruções para o uso destas placas, informações gerais e certificados de análises são encontradas no site: /www.biolog.com.

Incubaram-se estas placas a 26° C e as mensurações foram feitas em intervalos regulares de 3 horas entre as leituras até 70 horas de incubação, o qual gerou a cinética de consumo das comunidades para cada fonte de carbono (MALLON et al., 2015). Em cada uma das mensurações, os poços foram analisados em espectrofotômetro para leitor de placas (VERSAMAX) em absorbância a 560 nm.

Os valores oriundos das leituras foram normalizados e utilizados para calcular o consumo total de cada uma das fontes de carbono para as comunidades microbianas. Para determinar o consumo total das diferentes fontes de carbono, a área do gráfico gerada pela dinâmica de consumo de cada uma das fontes de carbono, em cada amostra, foi integralizada, e a somatória das 71 áreas de cada uma das amostras deu origem ao valor do consumo total das fontes de carbono, denominada de *community niche*. Estes valores foram também utilizados na comparação dos perfis metabólicos de cada comunidade microbiana, indicado tanto pela degradação diferencial das fontes de carbono (perfil metabólico) como pela sua capacidade total de utilização das fontes (*community niche*) pelas comunidades analisadas.

As mensurações do consumo das fontes de carbono para os tratamentos foram submetidas a análises multivariadas no programa Paleontological Statistics Software-programa PAST (HAMMER et al., 2001). Os dados de consumo total de fontes de carbono (*community niche*) foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias de Tukey, onde foi observada a significância com valores de probabilidade de erro abaixo de 5%, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002, 2006).

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Taxas de colonização micorrízica nos diferentes tratamentos

Os resultados para colonização de *R. clarus* mostraram tendências similares as observadas no capítulo 2, porém agora com novas comunidades microbianas e colonizando plantas de milho. As taxas de colonização micorrízica (%CM) quantificadas aos 20 dias de desenvolvimento das plantas foram distintas ao longo dos tratamentos compostos pelas diluições microbianas (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) para ambas as comunidades avaliadas (comunidade microbiana 'A' $p < 0,05$ e comunidade microbiana 'B' $p < 0,01$).

O resumo da ANOVA para os dados de %CM para as comunidades microbianas e períodos amostrais está apresentado no Apêndice D. Os tratamentos apenas inoculados com o fungo apresentaram menores valores de %CM em relação à inoculação da diluição microbiana 10^{-1} com *R. clarus*, para as duas comunidades avaliadas (Figura 1).

A observação deste padrão de colonização na amostragem realizada aos 20 dias de desenvolvimento das plantas de milho, com diminuição nas taxas de %CM nas suspensões mais diluídas de células das comunidades microbianas em plantas de milho, fortalece a inferência sobre a importância da diversidade microbiana do solo para a melhor colonização micorrízica da planta hospedeira (Figura 1).

Figura 1 - Taxas de colonização micorrízica (%CM) determinada em plantas de milhos cultivadas em solo com diferentes composições das comunidades microbianas (FM+10⁻¹, FM+10⁻³ e FM+10⁻⁶) e inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *R. clarus*. Os dados mostram os valores de %CM para as avaliações realizadas aos 20 dias, 30 dias e 40 dias de cultivo do milho. As barras indicam os valores de médias, as barras de erro indicam o desvio padrão da média (n=3) e barras contendo letras distintas possuem valores estatisticamente distintos, de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05).

Os dados de %CM obtidos nas amostragens realizadas aos 30 e 40 dias de desenvolvimento das plantas mostraram colonização mais uniforme entre os tratamentos. De maneira mais detalhada, aos 30 dias de desenvolvimento das plantas não foram observadas diferenças estatísticas para os tratamentos com diferentes diluições da comunidade microbiana A, enquanto que na comunidade B as taxas de %CM foram apenas diminuídas no tratamento da diluição 10^{-3} . Aos 40 dias de desenvolvimento das plantas os tratamentos mostraram valores de %CM similares ao longo dos tratamentos da diluição das comunidades microbianas nas duas comunidades avaliadas (Figura 1).

As médias obtidas para cada tratamento nos períodos de amostragens (20, 30 e 40 dias) para as comunidades microbianas 'A' e 'B' em suas respectivas diluições e associadas à espécie *R. clarus* ou em ausência de associação com o FMA, estão apresentados no apêndice D, juntamente com o resumo da análise de variância (ANOVA) dos dados. Os tratamentos com inoculação das diluições (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) das comunidades microbianas estudadas em ausência de inoculação micorrízica do milho pelo *R. clarus*, apresentaram as menores taxas de %CM e com valores aproximados para cada período de amostragem (apêndice D). Esta observação suporta a inferência de que as respostas de maiores taxas de %CM foram causadas pela colonização das plantas em decorrência do FMA inoculado. Este efeito foi também observado na literatura, onde a colonização preferencial das plantas por espécies exógenas de FMA foi demonstrada (KOIDE; MOOSE, 2004).

A baixa diversidade de microrganismos no solo pode acarretar em menor atividade microbiana, o que pode comprometer a ocorrência de importantes processos que ocorrem neste sistema, com destaque para eficiente decomposição ou mineralização de compostos (SCHMIDT et al., 2011; NUCCIO et al., 2013), principalmente realizada por microrganismos participantes do desenvolvimento vegetal. Alterações na microbiota do solo podem justificar mudanças relacionadas à simbiose de FMAs devido principalmente a ciclagem biogeoquímica (HODGE; FITTER, 2010), aquisição de nutrientes (BAREA et al., 2002) e inibição de patógenos do sistema radicular das plantas (BUDI et al., 1999).

Estas mudanças na funcionalidade do sistema solo podem resultar em melhor benefício para as plantas, ocasionando suprimento nutricional ideal para as mesmas ou causar efeito negativo no desenvolvimento vegetal, numa possível falta de importantes associações que as protegem contra estresses bióticos ou abióticos.

As informações sobre interações entre FMA e outros microrganismos pertencentes à microbiota do solo são escassos (HODGE; FITTER, 2010). Neste estudo, observou-se variação nas taxas de %CM devido à formação do gradiente de diversidade microbiana, sendo este efeito principalmente encontrado na fase inicial de desenvolvimento de plantas de milho.

Alguns estudos com interação entre rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e espécies de FMAs relatam maiores taxas de colonização micorrízica quando a microbiota conta com a presença de outros organismos simbiotes (MOSSE, 1962; MEYER; LINDERMAN, 1986; TORO et al., 1997; BUDI et al., 1999; XAVIER; GEMIDA, 2003). Estudos estes, que corroboram os resultados apresentados, o que suporta a hipótese da importância de maior diversidade microbiana no solo para obtenção de elevadas taxas de %CM em plantas.

Observando o sistema que compôs este estudo, pode-se dizer que a resposta obtida com inoculação do FMA em distintas composições de diversidade microbiana é diferente com relação a outros estudos realizados com organismos com características distintas dos FMAs (MATOS et al., 2005; IRIKIN et al., 2006; VAN ELSAS et al., 2012). Estudos feitos com organismos patogênicos de planta ou animais mostram que estes tem maior chance de se estabelecer no sistema quando inoculados em solos com menor diversidade biológica, e encontram condições de maior competitividade em solos com maior diversidade microbiana, como exposto no item 1.2.4.

Em nosso modelo de estudo, com a inoculação de microrganismo benéfico à maioria das plantas, os FMAs, observou-se resultado favorável a maior capacidade de colonização micorrízica da planta quando este foi associado a comunidades microbianas com maior diversidade. Este fato mostra a capacidade da microbiota do solo em se moldar de acordo com as características do microrganismo que foi inoculado, o que resultou na diferenciação de suas funções, levando ao auxílio do FMA inoculado.

Na tentativa de elucidar como a comunidade bacteriana se moldou de forma a beneficiar o FMA *R. clarus*, auxiliando na melhoria da colonização das raízes de plantas de milho, procedeu-se algumas análises da comunidade bacteriana voltadas aos principais fatores que podem contribuir para as respostas com inoculação de microrganismo invasor ou exógeno ao sistema, como mencionado no item 1.2.4. Estas análises são relacionadas à composição bacteriana dos níveis de diversidade e aos recursos nutricionais utilizados em cada situação, além da observação da abundância de células bacterianas nos tratamentos.

3.5.2 Efeito dos tratamentos na comunidade bacteriana do solo

A abundância das comunidades bacterianas foi monitorada utilizando a técnica de qPCR (*Real Time*) durante condução do experimento. Os dados obtidos não mostraram variações na quantidade de cópias do gene 16S DNAr, utilizado como indicador da abundância de bactérias, entre os tratamentos nos períodos de amostragens. O número de cópias do gene alvo ficou entre 10^9 e 10^{11} cópias por grama de solo para os tratamentos das comunidades microbianas inoculadas 'A' e 'B', respectivamente (Apêndice E). Este fato foi demonstrado em estudos prévios (VAN ELSAS et al., 2012; MALLON et al., 2015), que indicam que mudanças na estrutura microbiana estão mais relacionadas a alterações ambientais do que a abundância de células.

A composição das comunidades bacterianas em cada sistema microbiano foi monitorada com base em um conjunto de 4.635.800 sequências das regiões V4 e V5 do gene 16S DNAr, que permitiram um detalhado acesso à diversidade quantitativa e qualitativa de comunidades microbianas. Esta característica é descrita como ponto crucial na descrição da estrutura das comunidades e possibilita inferências subsequentes sobre sua funcionalidade e dinâmica ecológica (WILSON, 1999; LOREAU et al., 2001; LOREAU, 2010; COLWELL, 2012).

A utilização da tabela de OTUs rarificada para 5.426 sequências por tratamento, permitiu inicialmente a quantificação das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) nos diferentes tratamentos, revelando um decréscimo de valores ao longo do gradiente formado pelas diluições (Figura 2).

Figura 2 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) das amostras de solo com inoculação das diluições microbianas (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) das comunidades microbianas 'A' e 'B' e solo estéril (SE) sem microbiota inoculada, durante a condução do experimento

As OTUs são compostas por agrupamentos com sequências similares de determinado gene ou região, considerados como uma unidade de diversidade básica que se aproxima dos táxons microbianos que compõem a comunidade (SCHMIDT et al., 2014). Esta unidade pode ser vista por dois critérios: quanto à filogenia destas espécies, pois representam grupos monofiléticos de organismos, ou relacionado a fatores ecológicos que causam diferenciação e especiação dos grupos formados (GEVERS et al., 2005; COHAN, 2006; KOEPEL et al., 2008; HUNT et al., 2008; VOS, 2011; PREHEIM et al., 2013).

A partir desta unidade de diversidade obtida para os tratamentos foi possível observar que a premissa básica para o desenvolvimento deste estudo foi atendida, pois foi encontrado o efeito do método de diluição pra extinção na diminuição seriada da riqueza (Figura 2) e da diversidade (Figura 3) de espécies bacterianas.

Figura 3 - Diversidade filogenética (PD) das amostras de solo com inoculação das diluições microbianas (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) das comunidades microbianas 'A' e 'B' e solo estéril (SE) sem microbiota inoculada, durante a condução do experimento

A mensuração da PD representa uma informação quantitativa da diversidade, que foi definida como sendo o somatório das distâncias mínimas dos intervalos de todas as ramificações filogenéticas de um grupo de táxons na árvore filogenética composta pelos indivíduos de uma comunidade (FAITH, 1992a). Os padrões filogenéticos observados entre grupos fornecem um resumo das variações ao nível genético ou de características destes táxons (FAITH; BAKER, 2006). Maiores valores de PD podem expressar elevada diversidade e pode relacionar-se ao nível de conservação da biodiversidade de localidades ou sistemas (FAITH, 1992b, 1994).

As correlações entre os valores de número de OTUs, diversidade filogenética (PD) e %CM mostraram o efeito da alteração na riqueza de espécies de bactérias nas taxas de %CM. As correlações mostraram-se positivas e significativas para o período inicial de avaliação (20 dias) nas duas comunidades avaliadas (Tabela 2 e Apêndice F).

Os valores de R^2 foram maiores para as análises deste período, com valores de 0,42 e 0,69 para as análises de número de OTUs, e 0,45 e 0,65 para as análises de PD, nas comunidades A e B, respectivamente. Os dados obtidos aos 30 e 40 dias de cultivo das plantas indicam que a correlação observada para os dados de 20 dias é transiente, uma vez que nas análises com maiores períodos os valores R^2 foram menores e a significância estatística não foi observada (Tabela 2 e Apêndice F).

Em conjunto, estes dados reiteram as observações anteriores, onde um efeito da diluição da comunidade, e consequente diminuição em sua diversidade e riqueza, interfere de forma determinante na associação de *R. clarus* com plantas de milho.

Tabela 2 - Regressões e correlações de Pearson entre os dados de riqueza e diversidade de espécies de bactérias com relação as taxas de %CM obtidas nos períodos de avaliação do experimento cultivado com plantas de milho

<i>OTUs</i>				
Dias	Comunidade Microbiana 'A'		Comunidade Microbiana 'B'	
	Regressões	Correlações	Regressões	Correlações
20	$R^2 = 0,42$	0,65*	$R^2 = 0,69$	0,83**
30	$R^2 = 0,17$	0,42	$R^2 = 0,06$	-0,01
40	$R^2 = 0,28$	0,53	$R^2 = 0,20$	-0,46
<i>PD</i>				
Dias	Comunidade Microbiana 'A'		Comunidade Microbiana 'B'	
	Regressões	Correlações	Regressões	Correlações
20	$R^2 = 0,45$	0,67*	$R^2 = 0,65$	0,80**
30	$R^2 = 0,22$	0,47	$R^2 = 0,03$	-0,187
40	$R^2 = 0,28$	0,53	$R^2 = 0,20$	-0,45

** significativo a 1%; * significativo a 5%

Alguns gêneros de bactéria foram relatados como auxiliares de algumas espécies de FMAs, conforme demonstrado por Artursson et al. (2006). Estas bactérias foram consideradas sinérgicas a estes FMAs, o que pode contribuir para explicações quanto a resposta obtida pela inoculação de *R. clarus* na presença destes gêneros bacterianos no solo. Na busca por estes grupos no presente estudo, se organizou os grupos bacterianos mais abundantes nas amostras analisadas aos 20 dias desenvolvimento das plantas (com frequência acima de 2% do total) para serem analisados graficamente.

Figura 4 - Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'A' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 20 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total

A composição taxonômica da microbiota apresenta diferenças ao longo do gradiente de diversidade. Os gêneros predominantes nas comunidades formadas em cada tratamento foram *Burkholderia* e *Rhodanobacter*, além da família Xanthomonadaceae e da ordem Ellin 329.

Espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* colonizam uma amplitude de ambientes, como solo, plantas, outros microrganismos e humanos, com potencial agrícola e biotecnológico (SIMÕES-ARAÚJO; REIS, 2006). Várias espécies deste gênero foram isoladas de amostras de solo utilizados para agricultura (ACHOUAK, et al., 1999; BRAMER

et al., 2001; GORIS et al., 2002) e interação de forma não patogênica com plantas agrícolas como milho, trigo, alho, batata, tomate e uva (DI CELLO et al., 1997; VIALARD et al., 1998; BALANDREAU et al., 2001; LODEWYCKX et al., 2002; SESSITSCH et al., 2005).

Algumas espécies deste gênero foram encontradas em associação simbiótica com outros fungos (*Phanerochaete chrysosporium* e *P. sordicola*) que tem efeito em biorremediação de ambientes e decomposição de lignina (COENYE et al., 2001; SHING, CHEN, 2008). O que mostra a importância deste gênero e a possibilidade de suas espécies apresentarem sinergismo com outros microrganismos de solo que atuam em processos importantes neste sistema.

O gênero *Rhodanobacter* é composto por espécies que colonizadoras de solo (LEE et al., 2007) e são ligados predominantemente aos processos de decomposição da matéria orgânica (IM et al., 2004; DE CLERCQ et al., 2006) e desnitrificação (KOSTKA et al., 2012). Algumas espécies deste gênero podem também colonizar os tecidos internos de plantas (LODEWYCKX et al., 2002). A ordem Ellin 329 também foi anteriormente encontrada como mais abundante dentro da classe Alphaproteobacteria em comunidade microbiana de solo (WALSH et al., 2014). No entanto, não foi possível associá-la a processos do solo.

O gênero *Planctomyces* e a ordem WD2101 apareceram em maior abundância nos tratamentos com maior diversidade (FM+10⁻¹ e FM+10⁻³), sendo esta tendência oposta para o gênero *Nevskia* e para a família Xanthomonadaceae, que se comportaram de forma inversa ao gradiente de diversidade, com aumento de sua abundância nos tratamentos FM+10⁻⁶ e FM. O gênero *Salinispora* foi observado somente no tratamento com menor diversidade microbiana (FM+10⁻⁶).

Algumas características destes gêneros podem ser relatadas, como *Planctomyces* que são organismos de genoma amplo, devido ao estilo de vida livre, bactérias do gênero *Nevskia* já foram identificadas como endofíticas de plantas (LODEWYCKX et al., 2002) e o gênero *Salinispora* compreende bactérias nativas de ambiente marinho (MALDONADO et al., 2005). Estas características podem indicar que as bactérias sejam invasores do sistema, oriundo do ambiente ou da própria planta, que quando colocada no microcosmo, levaram consigo seus endófitos. Outra possibilidade é a ocorrência de bactérias associadas aos esporos do FMA, ou mesmo estimuladas pela presença dos mesmos.

Outra verificação com relação ao sequenciamento parcial das bactérias presentes nos sistemas foi analisada nos tratamentos onde não foi inoculado o FMA (Apêndice G). Nestes, uma diferenciação das comunidades ao longo dos tratamentos também pode ser observada.

Pontualmente, destaca-se que o gênero *Nevskia* e a família Oxalobacteraceae se apresentaram em abundância muito baixa na ausência de inoculação do FMA, bem como o gênero *Chitinophaga* mostrou-se ausente nesta situação. Contrariamente, observou-se maior concentração da família Sphingobacteraceae nestes tratamentos. Havendo ainda o decréscimo na abundância da família Rhodospirillaceae, gênero *Planctomyces* e Ordem WD2101 ao longo das diluições.

Componentes da família Oxalobacteraceae geralmente são endofíticos diazotróficos, como por exemplo, *Herbaspirillum* spp. (MONTEIRO et al., 2008). Membros da família Sphingobacteraceae e do gênero *Chitinophaga* estão ligados a degradação e conversão de biomoléculas (DEL RIO et al., 2010; PRASAD et al., 2013). Estas observações sugerem que com inoculação do FMA houve condições para manutenção de gêneros importantes para o sistema, como os ligados a fixação de nitrogênio e decomposição biológica.

Os principais grupos, em abundância, devido a inoculação do gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'B' e de *R. clarus* foram acessados e nota-se algumas diferenças pontuais (Figura 5).

Figura 5 - Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'B' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 20 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total

Se observa predominância do gênero *Burkholderia*, família Xanthomonadaceae e a ordem Ellin 329, assim como observado para inoculação da comunidade microbiana 'A'. Os gêneros *Bradyrhizobium* e *Planctomyces* e a ordem WD2101 se apresentaram em maiores abundâncias nos tratamentos com maior diversidade microbiana (FM+10⁻¹ e FM+10⁻³). Outros grupos bacterianos apresentaram-se em menor abundância nestes tratamentos, como observado para os gêneros *Nevskia*, *Ramlibacter*, *Sphingomonas*, as famílias Oxalobacteraceae e Nocardiodaceae e Ordem Pedosphaerales.

Algumas características destes gêneros, por exemplo, *Ramlibacter* que apresentou espécies isoladas de região árida e estudos relatam que ocorre deposição de fosfato no interior e na parede de suas células (BENZERARA et al., 2004). Espécies de *Sphingomonas* geralmente são encontradas em solos contaminados, pois utilizam compostos aromáticos como fonte de carbono e energia (LYES et al., 2004).

O gênero *Rhodanobacter* praticamente não foi observado no tratamento com ausência de microbiota inoculada (FM), resposta diferente quanto à presença deste gênero foi observada para este tratamento no sistema com inoculação da comunidade microbiana 'A' (Figura 4), em que o mesmo apresentou-se em elevada abundância ao longo de todo gradiente de diversidade. Este gênero está ligado a processos de decomposição e transformação de compostos (DE CLERCQ et al., 2006), e sua ausência na composição da microbiota pode acarretar a redução destes processos no solo.

Os tratamentos que resultaram no gradiente da comunidade microbiana 'B' em ausência de inoculação do FMA *R. clarus* também foram acessados quanto a abundância relativa de seus principais grupos de bactérias (Apêndice G).

Observou-se tendência de redução da abundância de vários grupos bacterianos (gêneros *Nevskia*, *Sphingomonas* e *Planctomyces*, famílias Sinobacteraceae, Comamonadaceae, Isosphaeraceae e Acidobacteriaceae) à medida que a comunidade foi submetida às maiores diluições. Esta tendência foi observada para um maior número de gêneros e famílias quando comparado com a resposta obtida com inoculação da comunidade microbiana 'A', o que pode indicar maior sensibilidade desta comunidade microbiana ao método utilizado para formação das microbiotas.

A família Xanthomonadaceae e o gênero *Edaphobacter* aumentaram sua abundância nos tratamentos com menor diversidade bacteriana (10⁻⁶), o primeiro apresenta ampla gama de membros que são patógenos de plantas (PIERETTI et al., 2009) e o segundo conta com espécie descritas em situação de baixa concentração de carbono orgânico e condição neutra a

levemente ácida do solo (KOCH et al., 2008). Características que podem ter auxiliado a sua abrangência na situação de menor diversidade.

Em conjunto os dados apontaram para a ocorrência diferencial de gêneros dentre os tratamentos ao longo das diluições, mas também mostram a diferenciação das comunidades devido a presença ou ausência do FMA inoculado. Isto indica que o FMA pode alterar a microbiota do solo, assim como foi descrito para a comunidade saprofítica do solo (NUCCIO et al., 2013). Este fato pode ocorrer devido ao suprimento de carbono a partir da produção da glicoproteína glomalina (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996) e exsudatos das hifas que estimulam bactérias do solo (TOLJANDER et al., 2007). Alguns grupos microbianos podem ser reprimidos com a presença do FMA (WELC et al., 2010) e alguns podem ainda inibir o desenvolvimento do FMA (LEIGH et al., 2011).

As representações gráficas do sequenciamento dos tratamentos das comunidades microbianas estudadas (solo 'A' e solo 'B') com inoculação do FMA *R. clarus*, referente as amostragens realizadas aos 30 e 40 dias estão apresentadas no apêndice E. Estas não foram abordadas devido a ausência de respostas quanto as taxas de %CM nestes períodos e a pequena diferenciação em abundância relativa dos grupos bacterianos nestas avaliações.

Os gêneros de bactérias citados por Artursson e colaboradores (2006) como sinérgicos a algumas espécies de FMAs não foram encontrados entre os gêneros considerados mais abundantes ($>$ ou $= 2\%$) nas comunidades microbianas 'A' e 'B'. Estes foram, no entanto, encontrados com frequências menores nas duas comunidades estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Gêneros bacterianos considerados sinérgicos a espécies de FMAs (ARTURSSON et al., 2006) e encontrados nas comunidades bacterianas presentes nas amostras de solo analisadas aos 20 dias de condução do experimento

Gêneros	Comunidade Microbiana 'A'	Comunidade Microbiana 'B'
<i>Bacillus</i>	0,07%	0,5%
<i>Paenibacillus</i>	0,2%	0,3%
<i>Corynebacterium</i>	*	*
<i>Streptomyces</i>	*	*
<i>Enterobacter</i>	*	*
<i>Pseudomonas</i>	*	*
<i>Rhizobium</i>	*	0,9%

*Presente nas sequências, mas em % muito baixa

Dentre os gêneros descritos com esta características, os mais frequentes no presente estudo foram *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Rhizobium*. Espécies do gênero *Bacillus* foram isoladas de diversos ambientes e muitas apresentam efeito de inibição ao desenvolvimento de outros organismos (YILMAZ et al., 2006; DURAIPANDIYAN et al., 2010). Este gênero quando associado ao FMA *Glomus clarum* (atualmente classificado como *R. clarus*), aumentou a multiplicação celular do fungo, a germinação de esporos e as taxas de colonização do FMA (XAVIER; GEMIDA, 2003). Corroborar a estes benefícios, o aumento da solubilização de fosfato devido a associação entre isolados de *Bacillus* spp. e *G. intraradices* (TORO et al., 1997).

O gênero *Paenibacillus* conta com espécies isoladas em ampla gama de ambientes (BERGE et al., 2002; SILVEIRA, 2003) e apresentam atividade antimicrobiana e produção de metabólitos secundários como toxinas, que são indutores de competição e simbioses com outros microrganismos, além de serem importantes promotores de crescimento vegetal (YOON et al., 2002; DASMAN et al., 2003). Este gênero associado à espécie de FMA *G. mosseae* auxiliou na multiplicação celular do fungo, na germinação de seus esporos, na melhoria nas taxas de %CM e inibição de patógenos na planta (BUDI et al., 1999). Há também o relato de promoção do crescimento da espécie de FMA *G. intraradices* (HILDEBRANDT et al., 2002).

O gênero *Rhizobium* é importante no processo de fixação biológica em plantas leguminosas, com características simbióticas fortemente influenciadas pelos mecanismos

moleculares de seu hospedeiro (PERRET et al., 2000; LODEWYCKX et al., 2002; OLDROYD, 2013). A associação de espécie bacteriana deste gênero ao FMA *G. mosseae* promoveu aumento da taxa de fixação de nitrogênio (TORO et al., 1998).

A presença destes gêneros em baixas concentrações nos tratamentos submetidos as diluições, pode ter impactado diretamente a composição da comunidade bacteriana (fatores antimicrobianos) e causado interferência no estabelecimento do FMA na fase inicial de desenvolvimento das plantas. Por ocorrerem em baixas frequências, pode-se sugerir que estes sejam perdidos ao longo das diluições, corroborando com a perda da capacidade do FMA em colonizar a planta hospedeira.

Esta observação juntamente com a alteração na composição destas comunidades pela inoculação do FMA podem ser pontos cruciais na explicação das variações nas taxas de %CM. Os grupos predominantes nas microbiotas podem ser considerados grupos com potencial na adequação de nichos para colonização do FMA e os que se apresentaram em abundância nas situações de maior diversidade podem ser considerados ‘auxiliares’ de *R. clarus* e consequentemente da simbiose MA.

Vinculado a esta ideia, torna-se importante o conhecimento de que em diversas situações ou processos do solo a identificação taxonômica pode não fornecer informação suficiente no que diz respeito à capacidade de execução de determinado processo pelo organismo identificado (SALLES et al., 2012). Para melhor acessar a funcionalidade da microbiota do solo, métodos relacionados ao metabolismo celular são mais adequados.

3.5.3 Efeitos dos tratamentos no perfil metabólico da microbiota dos solos

A avaliação do perfil metabólico da comunidade bacteriana do solo presente nos tratamentos foi baseada no consumo diferencial de 71 fontes de carbono (que compõem as placas de BIOLOG GENIII MicroPlate™).

Na análise dos tratamentos com a comunidade ‘A’, a comparação dos perfis metabólicos das comunidades microbianas inoculadas com o FMA *R. clarus* mostra o efeito deste organismo na modulação do metabolismo das comunidades bacterianas, de modo a possibilitar o agrupamento das repetições da diluição com maior diversidade (FM+10⁻¹), que ficou separado das demais diluições da microbiota com a inoculação do FMA (Figura 6A).

Nota-se que o microrganismo inoculado (FMA) apresentou efeito no metabolismo da microbiota em função da diversidade microbiana, com maior efeito no tratamento com a maior diversidade. Contrariamente, para os tratamentos sem a inoculação do FMA ocorreu

uma sobreposição dos pontos das amostras referente às diluições da comunidade bacteriana (Figura 6B).

Figura 6 - Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo 'A' em diferentes composições da microbiota, baseado na utilização diferencial de 71 fontes de carbono. (A) diluições microbianas com a inoculação do FMA e (B) diluições microbianas em ausência de inoculação do FMA. Os dados que deram origem a figura foram obtidos em amostragem realizada aos 20 dias de cultivo do milho. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

Este padrão de separação observado na fase inicial de desenvolvimento das plantas de milho (20 dias) foi inverso quando se observou o perfil metabólico na avaliação realizada no período final do experimento, aos 40 dias (Apêndice H). Neste caso, as amostras oriundas de tratamentos inoculados com o FMA formaram grupos menos distintos entre as diluições, enquanto que as amostras apenas inoculadas com as comunidades foram distintas entre as diluições (Apêndice H). Isto sugere que a microbiota foi capaz de se reestabelecer ao longo do período de incubação ou que a diferenciação que ocorreu entre as diluições foi acelerada pela inoculação do FMA.

Em análise similar com os dados da comunidade 'B', o mesmo padrão observado anteriormente pôde ser constatado para esta microbiota no período inicial de avaliação (20 dias) para as composições da comunidade microbiana com inoculação do FMA *R. clarus*. Neste caso, os tratamentos com inoculação das diluições com maior diversidade microbiana (10⁻¹ e 10⁻³) resultaram no agrupamento de suas repetições (Figura 7A).

Figura 7 - Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo 'B' em diferentes composições da microbiota, baseado na utilização diferencial de 71 fontes de carbono. (A) diluições microbianas com a inoculação do FMA e (B) diluições microbianas em ausência de inoculação do FMA. Os dados que deram origem a figura foram obtidos em amostragem realizada aos 20 dias de cultivo do milho. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo

Houve agrupamento dos pontos procedentes dos tratamentos com maior diversidade de bactérias quando foi inoculado *R. clarus* (FM+10⁻¹ e FM+10⁻³) e maior dispersão entre os pontos com inoculação do tratamento com menor diversidade bacteriana (FM+10⁻⁶). Os tratamentos que não receberam a inoculação de *R. clarus* resultaram em sobreposição dos pontos de diferentes diluições, não havendo agrupamento dos tratamentos com similar composição (diluição) na PCoA (Figura 7B).

Na avaliação realizada aos 40 dias de incubação dos tratamentos e cultivo das plantas, observou-se para esta microbiota a mesma tendência de organização do perfil metabólico da comunidade microbiana 'A' neste período. Havendo agrupamento dos pontos referentes aos tratamentos com maior diversidade da microbiota em ausência de inoculação do FMA, o que mostra a capacidade de recuperação microbiana após o efeito de diluição de células da microbiota (Apêndice H).

Os resultados referentes ao perfil metabólico das comunidades microbianas (A e B) estudadas indicam que a colonização bacteriana do solo foi semelhante para os tratamentos microbianos que receberam a inoculação do FMA exótico, durante os períodos de avaliação. Os resultados de Mallon e colaboradores (2015) corroboram os dados apresentados neste

estudo, pois demonstra a capacidade que o invasor inoculado apresenta na alteração do perfil metabólico das comunidades microbianas do solo submetidas a alteração de diversidade.

A redundância funcional dos grupos de bactérias pode ocasionar a ausência de alterações funcionais mesmo quando as comunidades microbianas são diferenciadas a nível taxonômico (SALLES et al., 2012). Provavelmente, isto explica a similaridade entre os perfis metabólicos encontrados em diferentes diluições da comunidade. No entanto, quando se compara comunidades com diferenças muito grandes em sua composição, como, por exemplo, nos extremos de diluições utilizadas neste estudo, as diferenças metabólicas surgem com mais clareza, uma vez que a redundância funcional das comunidades menos diversas é menor.

Isto reforça a necessidade de conexão entre as análises taxonômicas e funcionais na descrição de processos desempenhados pelas comunidades microbianas dos solos. Quando se acessa a estrutura destas comunidades aliada as mudanças na funcionalidade do sistema, pode-se inferir sobre ausência ou supressão de determinada função no solo (STRICKLAND et al., 2009).

Esta comparação entre os perfis taxonômicos e funcionais promovem maior suporte as inferências sobre a resposta da comunidade microbiana do solo à entrada de um organismo exógeno. No presente estudo, fica evidente o efeito do FMA na atividade metabólica da comunidade microbiana na fase inicial de avaliação do experimento, o que pode ser relacionado as variações nas taxas de %CM encontradas neste período.

Outro fator que pode contribuir para a observação da variação funcional destas microbiotas e a análise das fontes de carbono que foram mais consumidas em ausência ou presença de inoculação do FMA *R. clarus* (Apêndice I).

A fonte de carbono mais consumida no tratamento com maior diversidade microbiana e inoculação do FMA (FM+10⁻¹) quando se inoculou a comunidade 'A' foi α -D-Glucose, nas avaliações realizadas aos 20 e 40 dias de desenvolvimento das plantas; enquanto a fonte D-Gluconic Acid foi mais consumida nos tratamentos apenas com inoculação do FMA, nos dois períodos de avaliação. Os tratamentos com diversidades intermediárias (FM+10⁻³ e FM+10⁻⁶) apresentaram diferentes fontes de carbono como as mais consumidas, as quais variaram também durante os períodos de avaliação (Apêndice I). Nos tratamentos constituídos somente das composições da comunidade microbiana (ausência de inoculação do FMA), a fonte Tween 40 foi mais consumida no tratamento 10⁻³ nos dois períodos de avaliação. Os tratamentos com maior ou menor diversidade, 10⁻¹ e 10⁻⁶, respectivamente, apresentaram diferentes fontes mais consumidas nos períodos avaliados.

Com relação a inoculação da comunidade microbiana 'B', observou-se distintas fontes de carbono mais consumidas ao longo das avaliações e tratamentos inoculados com presença do FMA. A mesma resposta foi observada para os tratamentos com inoculação apenas das diluições microbianas (ausência de FMA), não sendo possível constatar a mesma fonte de carbono para nenhum dos tratamentos durante as avaliações (Apêndice I). Em virtude destas observações, pode-se dizer que esta microbiota foi mais fortemente alterada quanto à mudanças de sua funcionalidade devido às diluições microbianas, inoculação do FMA e tempo de desenvolvimento das plantas.

Outra diferenciação observada entre os tratamentos está relacionada ao consumo total das fontes de carbono disponíveis (71 fontes). Os valores determinados de *community niche* com as amostras analisadas aos 20 dias de desenvolvimento das plantas indicam que as maiores taxas de consumo de carbono foram observadas nas comunidades bacterianas que receberam a inoculação do FMA. Este efeito foi observado para todos os tratamentos da comunidade 'A', e dependente do gradiente de diversidade na comunidade 'B' (Figura 8).

Figura 8 - Consumo total de fontes de carbono (*community niche*) das comunidades microbianas nos tratamentos gerados pelo gradiente de diversidade, com inoculação da espécie de FMA *R. clarus* (FM+10⁻¹, FM+10⁻³, FM+10⁻⁶), inoculação apenas do FMA (FM) e diluições da comunidade microbiana em ausência de inoculação do FMA (10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁶). Os dados foram obtidos aos 20 dias de desenvolvimento de plantas de milho. Médias comparadas pelo teste Tukey a 5%

O estímulo ao maior consumo de fontes de carbono devido a inoculação do FMA foi mantido aos 40 dias de desenvolvimento das plantas (apêndice J). Neste período, foi possível verificar que as comunidades bacterianas apresentaram um acréscimo nas taxas de consumo de carbono, principalmente para os tratamentos com ausência de inoculação do invasor, o que

ocasionou em menor diferença entre os tratamentos. Este acréscimo pode ter ocorrido devido ao maior agrupamento das diluições com elevada diversidade, o que favoreceu o similar metabolismo destas comunidades.

Os valores de *community niche* forneceram uma grande evidência da capacidade modeladora do invasor (FMA) inoculado na comunidade microbiana, corroborando os dados descritos anteriormente por Salles e colaboradores (2009), que relatam sobre a importância desta medição funcional para relacionar aos processos correspondentes à microbiota. A probabilidade de sucesso de estabelecimento de um organismo invasor pode decrescer com o aumento da diversidade, de acordo com a teoria do nicho (TILMAN, 2004). No entanto, os tratamentos com inoculação das diluições das comunidades microbianas e do invasor (FMA) mostraram que este microrganismo desempenha melhor suas funções num sistema com maior diversidade microbiana, demonstrado pelas taxas de %CM, mesmo que este não seja distinto dos demais em relação a sua capacidade de consumo de carbono.

A teoria das comunidades residentes indica que ocorre maior resistência à inoculação do invasor pela microbiota quando a captação e suprimento de recursos são coincidentes (DAVIS et al., 2000). Isto sugere, portanto, que a funcionalidade das comunidades e do organismo exógeno foi moldada pela complementariedade de recursos (SALLES et al., 2012), e que a riqueza e diversidade das comunidades bacterianas parece não ter relação com as maiores taxas de consumo nos tratamentos com inoculação de FMA. Reposta inversa foi descrita na literatura no estudo de comunidades bacterianas que realizam o processo de desnitrificação no solo (SALLES et al., 2009), o que pode ser explicado devido a redundância de funções presentes nas comunidades microbianas empregadas no presente estudo.

3.6 Conclusões

- a) As taxas de colonização micorrízica de *Rhizophagus clarus* foram alteradas devido à diminuição nos valores de riqueza e diversidade de espécies de bactérias, sendo este efeito observado na fase inicial de desenvolvimento das plantas de milho.
- b) A inoculação do fungo micorrízico arbuscular nos sistemas microbianos promoveu mudanças no perfil metabólico, no consumo total de fontes de carbono, na diversidade e número de OTUs das comunidades bacterianas dos solos.

Referências

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M.H.; HEULIN H. *Burkholderia caribensis* sp. nov., na exopolysaccharideproducing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 787-794, 1999.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Combined bromodeoxyuridine immunocapture 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**, Hoboken, v. 7, p. 1952–1966, 2005.
- _____. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 8, p. 1- 10, 2006.
- BACH, H-J.; TOMANOVA, J.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J.C. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p. 235–245, 2002.
- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAESENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacea* genomovars III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.
- BAREA, J.M.; AZCON, R.; AZCON-AGUILAR, C. Myc- orrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 343-351, 2002.
- BECARD, G.; PICHE, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, Hoboken, v. 112, p. 785-791, 1989.
- BENZERARA, K.; MENGUY, N.; GUYOT, F.; FERIAEL SKOURI, F.; LUCA, G., BARAKAT, M.; HEULIN, T. Biologically controlled precipitation of calcium phosphate by *Ramlibacter tataouinensis*. **Earth and Planetary Science Letters**, Berkeley, v. 228, p. 439-449, 2004.
- BERGE, O.; GUINEBRETIERE, M.H.; ACHOUAK, W.; NORMAD, P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov., and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 607–616, 2002.
- BEVER, J.D. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. **New Phytologist**, Hoboken, v. 157, p. 465-473, 2003.
- BOMBERG, M.; JURGENS, G.; SAANO, A.; SEM, R.; TIMONEN, S. Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 163-171, 2003.

BUDI, S.W.; VAN TUINEN, D.; MARTINOTTI, G.; GIANINAZZI, S. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil borne fungal pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5148–5150, 1999.

BRAMER, C.O.; VANDAMME, P.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; STEINBUHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1709–1713, 2001.

BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 320, p. 37–77, 2009.

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

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J.J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D.P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacea* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1481–1490, 2001.

COHAN, F.M. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Bethesda, v. 361, p. 1985–1996, 2006.

COLWELL, R.K.; CHAO, A.; GOTELLI, N.J.; LIN, S.Y.; MAO, C.X.; CHAZDON, R.L.; LONGINO, J.T. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v. 5, p. 3–21, 2012.

DASMAN, S.K., KAWASAKI, H.; YAGI, M.; SEKI, T.; FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. *Paenibacillus glycanolyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produce by the cyanobacterium *Nostoc commune*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1669–1674, 2003.

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

DAVIS, M.; GRIME, J.; THOMPSON, K. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. **Journal of Ecology**, Hoboken, v. 88, p. 528–534, 2000.

DE CLERQ, D.; VAN TRAPPEN, S.; CLEENWERCK, I.; CEUSTERMANS, A.; SWINGS, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOER, J. *Rhodanobacter spathiphylli* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the roots of *Spathiphyllum* plants grown in a compost-

amended potting mix. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1755–1759, 2006.

DEL RIO, T.G.; ABT, B.; SPRING, S.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; TICE, H.; COPELAND, A.; CHENG, J-F.; CHEN, F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y-J.; JEFFRIES, C.D.; CHAIN, P.; SAUNDERS, E.; DETTER, J.C.; BRETTIN, T.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; EISEN, J.A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N.C.; KLENK, H-P.; LUCAS, S. Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034T). **Standards in Genomic Sciences**, London, v. 2, p. 87-95, 2010.

DI CELLO, F.; BEVIVIVNO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; ABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4485-4493, 1997.

DURAI PANDIYAN, V.; SASI, A.H.; IALAM, V.I.H.; VALANARASU, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. **Journal de Mycologie Médicale**, Issy, v. 20, p. 15-20, 2010.

FAITH, D.P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological Conservation**, Oxford, v. 61, p. 1-10, 1992a.

_____. Systematics and conservation: on predicting the feature diversity of subsets of taxa. **Cladistics**, New York, v. 8, p. 361-373, 1992b.

_____. Phylogenetic pattern and the quantification of organismal biodiversity. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 345, p. 45-58, 1994a.

FAITH, D.P.; BAKER, A.M. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. **Evolutionary Bioinformatics**, New Zealand, v. 2, p. 121–128, 2006.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Reevaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 733–739, 2005.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 7, p. 243-255, 1989.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GORIS, J.; DEJONGHE, W.; FALSSEN, E.; CLERK, E.D.E.; GEERAERTS, B.; ILLEMS, A.; TOP, E.M.; VANDAMME, P.; DE VOS, P. Diversity of trans conjugants that acquired plasmid pJP4 or p EMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B- horizon of an

agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, p. 340-352, 2002.

GRIFFIOEN, W.A.J.; ERNST, W.H.O. The role of VA mycorrhiza in the heavy metal tolerance of *Agrostis capillaris* L. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 29, p. 173–177, 1989.

GRIGERA, M.S.; DRIJBER, R.A.; WIENHOLD, B.J. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in soil coincides with the reproductive stages of maize. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1401–1409, 2007.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** (Coquina Press), Califórnia, vol. 4, n.1, art. 4: 9pp. 2001.

HILDEBRANDT, U.; JANETTA, K.; BOTHE, H. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1919–1924, 2002.

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

HUNT, D.E.; DAVID, L.A.; GEVERS, D.; PREHEIM, S.P.; ALM, E.J.; POLZ, M.F. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. **Science**, Washington, v. 320, p. 1081–1085, 2008.

IM, W.-T.; LEE, S.-T.; YOKOTA, A. *Rhodanobacter fulvus* sp. nov., a b galactosidase-producing gammaproteobacterium. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 50, p. 143–147, 2004.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Manual análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas, 189p. 2001.

IRIKIIN, Y.; NISHIYAMA, M.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Rhizobacterial community-level, sole carbon source utilization pattern affects the delay in the bacterial wilt of tomato grown in rhizobacterial community model system. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 27–32, 2006.

KOCH, I.H.; GICH, F.; DUNFIELD, P.F.; OVERMANN, J. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1114–1122, 2008.

KOEPEL, A.; PERRY, E.B.; SIKORSKI, J.; KRIZANC, D.; WARNER, A.; WARD, D.M.; ROONEY, A.P.; BRAMBILLA, E.; CONNOR, N.; RATCLIFF, R.M.; NEVO, E.; COHAN, F.M. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, Bethesda, v. 105, p. 2504–2509, 2008.

KOSTKA, J.E.; GREEN, S.J.; RISHISHWAR, L.; PRAKASH, O.; KATZ, L.S.; MARÍÑO-RAMÍREZ, L.; JORDAN, I.K.; MUNK, C.; IVANOVA, N.; MIKHAILOVA, N.; WATSON, D.B.; BROWN, S.D.; PALUMBO, A.V.; BROOKS, S.C. Genome sequences for six *Rhodanobacter* strains, isolated from soils and the terrestrial subsurface, with variable denitrification capabilities. **Journal of Bacteriology**, Washington v. 194, n. 16, p. 4461-4462, 2012.

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

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 405-413, 2006.

LEE, C.S.; KIM, K.K.; ASLAM, Z.; LEE, S-T. *Rhodanobacter thiooxydans* sp. nov., isolated from a biofilm on sulfur particles used in an autotrophic denitrification process. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 1775-1779, 2007.

LEIGH, J.; FITTER, A.H.; HODGE, A. Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 76, p. 428-438, 2011.

LEYS, M.E.J.N.; ANNEMIE RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; EVA, M.; TOP, E.M.; SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1944-1955, 2004.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOREAU, M. **From populations to ecosystems**: theoretical foundations for a new ecological synthesis. Princeton: Princeton University, 320 p. 2010.

LOREAU, M.; NAEEM, S.; INCHAUSTI, P.; BENGTSSON, J.; GRIME, J.P.; HECTOR, A. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**, Washington, v. 294, p. 804-808, 2001.

MALDONADO, L.A.; STACH, J.E.M.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A.C.; BULL, A.T.; GOODFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 87, p. 11-18, 2005.

MALLON, C.A.; POLY, F.; LE ROUX, X.; MARRING, I.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. **Ecology**, New York, v. 96, p. 915-926, 2015.

MATOS, A.; KERKHOLF, 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**, Lawrence, v. 78, p. 426–431, 1986.

MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular- arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.18, p. 185–190, 1986.

MONTEIRO, R.A.; SCHMIDT, M.A.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R., YATES, M.G.; RANDI, M.A.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 932-937, 2008.

MOSSE, B. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. **Journal General Microbiology**, London, v. 27, p. 509–520, 1962.

NAIR, M.G.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 434-439, 1991.

NUCCIO, E.E.; HODGE, A.; PETT-RIDGE, J.; HERMAN, D.J.; WEBER, P.K.; FIRESTONE, M.K. An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 15, p. 1870-1881, 2013.

OLDROYD, G.E.D. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, p. 252–263, 2013.

PEREIRA E SILVA, M.C.; DIAS, A.C.F.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e51554, 2012.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 180–201, 2000.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasite an arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British of Mycological Society**, London, v. 55, p. 158-161, 1970.

PIERETTI, I.; ROYER, M.; BARBE, V.; CARRERE, S.; RALF KOEBNIK, R.; COCIANCICH, S.; COULOUX, A.; ARRASSE, A.; GOUZY, J.; JACQUES, M-A.; LAUBER, E.; MANCEAU, C.; MANGENOT, S.; POUSIER, S.; SEGURENS, B.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; ARLAT, M.; ROTT, P. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 616, 2009.

PRASAD, S.B.; MANASA, P.; BUDDHI, S.; PRATIBHA, M.S.; ZAREENA BEGUM, Z.; SUNIL BANDI, S.; PREETHI TIRUNAGARI, P.; SHIVAJI, S. Arcticibacter svalbardensis

gen. nov., sp. nov., of the family Sphingobacteriaceae in the phylum Bacteroidetes, isolated from Arctic soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 1627–1632, 2013.

PREHEIM, S.P.; PERROTTA, A.R.; MARTIN-PLATERO, A.M.; GUPTA, A.; ALM, E.J. Distribution-based clustering: using ecology to refine the operational taxonomic unit. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 6593–6603, 2013.

SALLES, J.F.; LE ROUX, X.; POLY, F. Relating phylogenetic and functional diversity among denitrifiers and quantifying their capacity to predict community functioning. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 209, 2012.

SALLES, J.F.; POLY, F.; SCHMID, B.; LE ROUX, X. Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages. **Ecology**, New York, v. 90, p. 3324–3332, 2009.

SALVIOLI, A.; GHIGNONE, S.; NOVERO, M.; NAVAIZIO, L.; VENICE, F.; BAGNARESI, P.; BONFANTE, P. Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. **ISME Journal**, New York, v. 10(1), p. 130-144, 2016.

SCHENCK, N.C. Can mycorrhizae control root diseases? **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 65, p. 230–234, 1981.

SCHMIDT, M.W.I.; TORN, M.S.; ABIVEN, S.; DITTMAR, T.; GUGGENBERGER, G.; JANSSENS, I.A.; KLEBER, M.; KÖGEL-KNABNER, I.; LEHMANN, J.; MANNING, D.A.; NANNIPIERI, P.; RASSE, D.P.; WEINER, S.; TRUMBORE, S.E. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, Washington, v. 478, p. 49–56, 2011.

SCHMIDT, T.S.B.; RODRIGUES, J.F.M.; MERING, C.V. Ecological consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale. **PLOS Computational Biology**, San Francisco, v. 10, e1003594, 2014.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; SALLES, J.F.; VAN ELSAS, J.D.; STURZ, A.V.; VANDAMME, P.; AIT BARKA, E.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B.R.; WANG-PRUSKI, G.; NOWAK, J. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V.de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

_____. A new version of the Assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Proceedings...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SILVEIRA, A.B. **Identificação e caracterização genética de isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostra de água e solo**. 2003. 146p. Tese (MSc Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, M.V. **O gênero Burkholderia**: um importante componente da comunidade microbiana. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 32 p. (Documentos, 219).

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 81, p. 399–417, 2008.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 227–250, 2011.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. London: Academic Press, 800p. 2008.

STRICKLAND, M.S.; LAUBER, C.; FIERER, N.; BRADFORD, M.A. Testing the functional significance of microbial community composition. **Ecology**, New York, v. 90, p. 441–451, 2009.

TILMAN, D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 10854–10861, 2004.

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. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4408–4412, 1997.

_____. 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**, Hoboken, v. 138, p. 265–273, 1998.

VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVÁ, D.; KRIRIŠUFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1159–1164, 2012.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; MARTIN, F.M.; SELOSSE, M.-A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New Phytologist**, Hoboken, v. 205, p. 1406–1423, 2008.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BRUIN, S.; LUCKERHOFF, L.; VAN LOGTESTIJN, R.S.P.; SCHLAEPPPI, K. A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. **ISME Journal**, New York, v. 10, p. 1–11, 2015.

VIALARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHEL, K.; BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizosferic *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic and Microbiology**, Reading, v. 48, p. 549-563, 1998.

VIERHEILIG, H.; GOUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHÉ, Y. Ink and Vinegar, a simple staining technique for arbuscular - mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

VOS, M. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. **Trends Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 1-7, 2011.

WALSH, F.; SMITH, D.P.; SARAH, M.; OWENS, S.M.; DUFFY, B.; FREY, J.E. Restricted streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacteria communities. **Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, Denmark, v. 4, p. 383, 2014.

WELC, M.; RAVNSKOV, S.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; LARSEN, J. Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in root-free soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1534-1540, 2010.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J.I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; GUILLAUMAUD, N.; LE ROUX, X. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 9, p. 2211-2219, 2007.

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

WILSON, E.O. **The diversity of life**. New York: W.W. Norton, 424 p. 1999.

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

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

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil. **Microbiological Research**, Denmark, v. 161, p. 127-131, 2006.

YOON, J.H.; SEO, W.T.; SHIN, Y.K.; KHO, Y.H.; KANG, K.H.; PARK, Y.H. *Paenibacillus chijuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Microbiology**, Reading, v. 52, p. 415-421, 2002.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho revelou que as interações entre os FMAs e as plantas são também determinadas pelo restante da microbiota do solo. Esta visão mais abrangente do sistema de formação das micorrizas arbusculares constitui o ponto principal de avanço científico dentro desta tese de doutorado. Em diversas oportunidades ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, foi claramente observado que alterações na microbiota dos solos levam a mudanças nos padrões de colonização dos FMAs nas plantas hospedeiras. O desenvolvimento de estudos em diferentes solos e utilizando duas plantas hospedeiras deram origem a resultados similares para o mesmo FMA (*R. clarus*), quanto as taxas de CM.

Esta observação indica claramente que o processo descrito aqui, onde este FMA depende da diversidade biológica do solo para o sucesso na colonização do hospedeiro, é algo abrangente, possivelmente ligado a diversos sistemas FMA-planta hospedeira e não restrito a um único par de organismos.

O Capítulo 2 mostra que as espécies FMAs respondem de forma diferente as alterações na microbiota dos solos. Enquanto alguns fungos parecem agir de forma menos dependente de outros organismos, há a clara indicação de que *R. clarus* tem comportamento diferenciado, com as taxas de CM sensíveis a perda de biodiversidade do solo. Neste capítulo, surgem também as primeiras observações referentes ao efeito da inoculação dos FMAs sobre a composição da microbiota dos solos, indicando a ocorrência de um processo de resposta da comunidade à invasão do sistema pelos FMAs ou de um sistema de seleção dos FMAs sobre as comunidades de fungos e bactérias, do solo, de forma similar a desempenhada pelas plantas, na rizosfera.

Provavelmente, este comportamento diferencial dos FMAs, tanto na colonização das plantas, como na alteração da microbiota do solo, esteja relacionado à sua funcionalidade no sistema e resistência aos estresses. A classificação destes organismos nos grupos denominados de ruderais ou competitivos indica a ocorrência de características que podem justificar estas observações, ainda a serem comprovadas de forma mais clara em estudos posteriores.

O Capítulo 3 busca a comprovação dos efeitos observados no Capítulo 2, de maneira a detalhar as respostas da colonização de *R. clarus* frente a variações na diversidade da microbiota dos solos. Este capítulo incorpora metodologias de estudo que visam tanto comprovar o efeito da metodologia utilizada na geração de comunidades microbianas distintas a partir de solos originais, bem como fornecem dados mais detalhados sobre estas alterações.

Esta descrição detalhada ocorreu por meio da descrição de alterações na composição das comunidades microbianas dos solos e pela detecção de alterações metabólicas dos solos hospedando as distintas comunidades microbianas. A utilização de dois solos para este estudo forneceu um embasamento mais sólido sobre as alterações observadas.

Os resultados do Capítulo 3 reforçam a ocorrência de um processo de dependência da biodiversidade do solo para a eficiente colonização da planta hospedeira pelo FMA *R. clarus*. Esta observação, obtida neste capítulo onde dois solos foram utilizados, e com uma planta diferente do alvo de estudo no capítulo 2, enfatiza a dimensão da ocorrência deste processo de forma mais generalizada. Por fim, verificou-se que um aumento no metabolismo da comunidade microbiana do solo ocorre devido a inoculação do FMA, sugerindo que o efeito do FMA sobre a composição da microbiota do solo esteja mais relacionado à resposta da mesma ao processo de invasão do sistema e menos determinado pela seleção do FMA sobre os componentes da microbiota.

Nos dois capítulos experimentais, os resultados mais expressivos nas alterações entre plantas e FMAs ocorreram nos períodos iniciais do desenvolvimento vegetal. Esta observação corrobora a importância das interações entre hospedeiros e seus simbiossiontes no início de seu desenvolvimento. Agronomicamente, pode-se sugerir que a ausência de interações importantes neste período de estabelecimento da cultura possa repercutir de forma determinante sobre seu desenvolvimento posterior. Sabe-se que culturas com maiores dificuldades no estabelecimento inicial das plantas são normalmente mais suscetíveis a estresses hídricos, absorvem menos nutriente e são mais suscetíveis a pragas e patógenos. Neste cenário, uma melhor eficiência do estabelecimento das micorrizas poderia levar a ganhos no desenvolvimento vegetal, desde que suportado pela ocorrência de uma maior diversidade microbiana dos solos.

Em resumo, esta tese de Doutorado levanta uma nova informação de alta relevância no estudo da colonização das plantas por FMAs, incluindo a diversidade biológica dos solos como agente determinante para a eficiente colonização da planta por estes organismos. Ficou demonstrado que alterações neste compartimento do solo levam a alterações nos padrões de colonização das plantas por FMAs. Assim sendo, pode-se sugerir que solos biologicamente degradados podem apresentar uma menor colonização das plantas por FMAs, mesmo que estes fungos estejam presentes nas áreas de cultivo. A degradação biológica do solo é assunto ainda de debate e eficiente determinação.

No entanto, os dados do presente estudo podem indicar a utilização das %CM como indicador da qualidade biológica do solo. Estes resultados suportam também a indicação de

que metodologias que buscam incrementar a micorrização das plantas devem considerar também o adequado manejo da microbiota do solo, reconhecendo a importância de seus componentes para a adequada ocorrência das interações entre FMAs e as diferentes espécies vegetais.

APÊNDICES

Apêndice A

Esquema do método de diluição para este experimento.

Apêndice B

Resumo da ANOVA com relação às taxas de colonização micorrízica para os fatores estudados (concentrações de células microbianas ou gradiente de diversidade e espécies de FMAs inoculadas), durante os períodos de estudo.

Fatores	Valores de F		
	30 dias	60 dias	120 dias
Diversidade microbiana	ns	6,27 **	9,44**
FMAs	3,52*	26,88**	3,99*
Diversidade microbiana X FMAs	2,28*	ns	2,91*
CV%	22	21	23

** significativo a 1%; * significativo a 5%; ns: não significativo.

Tabelas com comparações de medias (Teste Tukey).

Gradiente de diversidade	%CM 60 dias	%CM 120 dias	
10 ⁻¹	39 a	49,6 a	
10 ⁻³	39 a	30,7 b	
10 ⁻⁶	38,3 a	28,7 b	
10 ⁻⁹	33,5 ab	31,3 b	
dms (60 dias)= 10,2; dms (120 dias)= 11,3			
FMA's	%CM 30 dias	%CM 60 dias	%CM 120 dias
<i>D. heterogama</i>	43,2 a	46,2 a	40,6 a
<i>R. clarus</i>	35,4 a	31,2 b	33,1 a
<i>Gi. rosea</i>	42,8 a	27,1 b	33,2 a
dms= 8,14; dms (60 dias)= 6,7; dms (120 dias)= 7,4			

Interação: Gradiente de diversidade x FMA's

CM%	<i>D. heterogama</i>		<i>R. clarus</i>		<i>Gi. rosea</i>	
	30 dias	120 dias	30 dias	120 dias	30 dias	120 dias
10^{-1}	30,3 a B	42,3 a A	39,0 a AB	49,3 a A	52,3 a A	57,3 a A
10^{-3}	44,6 a A	40,3 a A	44,6 a A	29,3 b AB	41,0 a A	22,6 b B
10^{-6}	46,3 a A	33,6 a A	32,0 a A	30,3 ab A	32,3 a A	22,3 b A
10^{-9}	50,3 a A	38,3 a A	30,3 a B	31,6 ab A	46,6 a AB	24,0 b A
FM	44,6 a A	48,3 a A	31,3 a A	25,0 b B	42,0 a A	39,6 a AB

Colunas: letras minúsculas, dms= 21,5; dms= 19,7; linhas: letras maiúsculas, dms= 18,2; dms= 16,7. FM= FMA inoculado em ausência de comunidade microbiana inoculada.

Resumo da ANOVA para a massa seca da parte aérea das plantas para os diferentes tratamentos nos períodos de estudo.

Fontes de variação	Valores de F		
	30 dias	60 dias	120 dias
Gradiente de diversidade	3,90 *	2,73 *	ns
FMA's	ns	7,55 **	ns
CV%	27	19	18

** significativo a 1%; * significativo a 5%; ns: não significativo.

Tabelas com comparações de medias (Teste Tukey).

Gradiente de diversidade	MSPA 30 dias	MSPA 60 dias
10^{-1}	3,52 b	7,33 a
10^{-3}	3,61 ab	6,75 a
10^{-6}	5,06 a	5,78 a
10^{-9}	3,55 ab	5,98 a

dms (30 dias)= 1,51; dms (60 dias)= 1,78

Apêndice C

Esquema do método de diluição para extinção para este experimento.

Apêndice D

Resumo da ANOVA para às taxas de colonização micorrízica dos tratamentos com associação de composições microbianas e espécie de FMA inoculada, para comunidades microbianas 'A' e 'B' inoculadas, durante os períodos de estudo.

Fonte de variação	Valores de F		
<i>Comunidade A</i>	20 dias	30 dias	40 dias
CM	8,30 *	3,58ns	2,46 ns
dms	28	31	9
CV%	19%	24%	10%
<i>Comunidade B</i>			
CM	11.67**	6,45*	2,6ns
dms	17	12	11
CV%	18%	18%	18%

CM: Colonização Micorrízica; ** significativo a 1%; * significativo a 5%.

Tabela com médias dos valores de %CM obtidos para os tratamentos.

Microbiotas	'A'				'B'			
	20 dias*	30 dias	40 dias	Média	20 dias**	30 dias*	40 dias	Média
FM+10 ⁻¹	58,67	30,50	38,00	42,4	50,67	26,33	32,67	36,5
FM+10 ⁻³	46,33	45,50	36,66	42,8	40,00	17,67	33,33	30,3
FM+10 ⁻⁶	26,00	27,00	32,00	28,3	35,00	33,33	35,00	34,4
FM	30,50	21,50	31,66	27,9	19,33	32,33	43,00	31,5
10 ⁻¹	14,67	21,67	31,67	22,7	15,67	25,00	23,33	21,3
10 ⁻³	15,57	20,67	34,33	23,5	15,20	19,67	12,67	15,8
10 ⁻⁶	20,33	23,33	25,33	22,9	19,23	17,00	19,33	18,5

** significativo a 1%; * significativo a 5%.

Apêndice E

Quantificação do número de cópias do gene 16S (cópias g⁻¹ solo, log) nos tratamentos com associação das composições bacterianas e da espécie de FMA *R. clarus* inoculada, durante condução do experimento.

Apêndice F

Regressões das taxas de colonização micorrízica (%CM) e unidades taxonômicas operacionais (OTUs) para os gradientes de diversidade das comunidades microbianas com inoculação da espécie de FMA *R. clarus* em plantas de milho.

Regressões das taxas de colonização micorrízica (%CM) e diversidade filogenética (PD) para os gradientes de diversidade das comunidades microbianas com inoculação da espécie de FMA *R. clarus* em plantas de milho.

Apêndice G

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'A' aos 20 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'B' aos 20 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'A' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 30 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'A' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 40 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'B' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 30 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Abundância relativa dos grupos de bactérias de solo que recebeu o gradiente de diversidade da comunidade microbiana 'B' e inoculação da espécie de FMA *R. clarus* aos 40 dias de cultivo do milho. As sequências que compõem a classificação apresentada foram organizadas para serem representativas do total, sendo graficamente representadas apenas aquelas com participação acima de 2% do total.

Apêndice H

Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo 'A' em diferentes composições da microbiota, baseado na utilização diferencial de 71 fontes de carbono. (A) diluições microbianas com a inoculação do FMA e (B) diluições microbianas em ausência de inoculação do FMA. Os dados que deram origem a figura foram obtidos em amostragem realizada aos 40 dias de cultivo do milho. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo.

Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo 'B' em diferentes composições da microbiota, baseado na utilização diferencial de 71 fontes de carbono. (A) diluições microbianas com a inoculação do FMA e (B) diluições microbianas em ausência de inoculação do FMA. Os dados que deram origem a figura foram obtidos em amostragem realizada aos 40 dias de cultivo do milho. Os valores dos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados representados em cada eixo.

Apêndice I

Diluições das comunidades microbianas (A e B) com inoculação de *R. clarus* (FM) e suas respectivas fontes de carbono mais consumidas (placas de BIOLOG) e valores de consumo (omnilog).

Comunidade microbiana 'A'				
20 dias	FM+10 ⁻¹	FM+10 ⁻³	FM+10 ⁻⁶	FM
Fonte	<i>α-D-Glucose</i>	<i>D-Saccharic Acid</i>	<i>L-Malic Acid</i>	<i>D-Gluconic Acid</i>
Consumo	0,89	0,74	0,87	1,23
40 dias				
Fonte	<i>α-D-Glucose</i>	<i>L-Galactonic Acid Lactone</i>	<i>D-Fructose</i>	<i>D-Gluconic Acid</i>
Consumo	0,82	0,87	1,0	0,83
Comunidade microbiana 'B'				
20 dias	FM+10 ⁻¹	FM+10 ⁻³	FM+10 ⁻⁶	FM
Fonte	<i>Gelatin</i>	<i>D-Saccharic Acid</i>	<i>D-Galacturonic Acid</i>	<i>D-Trehalose</i>
Consumo	0,55	0,98	0,79	0,89
40 dias				
Fonte	<i>D-Fructose</i>	<i>D-Maltose</i>	<i>α-D-Glucose</i>	<i>D-Galacturonic Acid</i>
Consumo	0,74	0,87	0,85	0,92

Diluições das comunidades microbianas (A e B) e suas respectivas fontes de carbono mais consumidas (placas de BIOLOG) e valores de consumo (omnilog).

Comunidade microbiana 'A'			
20 dias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-6}
Fonte	<i>α-D-Glucose</i>	<i>Tween 40</i>	<i>Quinic Acid</i>
Consumo	0,82	0,79	0,77
40 dias			
Fonte	<i>D-Mannose</i>	<i>Tween 40</i>	<i>Gentiobiose</i>
Consumo	0,80	0,88	0,73
Comunidade microbiana 'B'			
20 dias	10^{-1}	10^{-3}	10^{-6}
Fonte	<i>D-Saccharic Acid</i>	<i>D-Trehalose</i>	<i>N-Acetyl-DGlucosamine</i>
Consumo	0,81	0,77	0,68
40 dias			
Fonte	<i>D-Trehalose</i>	<i>D-Gluconic Acid</i>	<i>D-Mannose</i>
Consumo	0,81	0,84	0,86

Apêndice J

Consumo total de fontes de carbono (*community niche*) das comunidades microbianas nos tratamentos gerados pelo gradiente de diversidade, com inoculação da espécie de FMA *R. clarus* (FM+10⁻¹, FM+10⁻³, FM+10⁻⁶), inoculação apenas do FMA (FM) e diluições da comunidade microbiana em ausência de inoculação do FMA (10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁶). Os dados foram obtidos aos 40 dias de desenvolvimento de plantas de milho. Médias comparadas pelo teste Tukey a 5%.