

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares e
de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Simbióticas em
Áreas de Mineração de Bauxita com Diferentes
Idades de Revegetação**

Wardsson Lustrino Borges

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICAS EM
ÁREAS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA COM DIFERENTES IDADES
DE REVEGETAÇÃO**

WARDSSON LUSTRINO BORGES

Sob a Orientação do Professor
Gabriel de Araújo Santos

e Co-orientação de
Sergio Miana de Faria

e
Ricardo Luis Louro Berbara

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ.
Outubro de 2010

577.27
R732d
T

Borges, Wardsson Lustrino, 1981-.

Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas em áreas de mineração de bauxita com diferentes idades de revegetação / Wardsson Lustrino Borges – 2010.

118 f.: il.

Orientador: Gabriel de Araújo Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 92-101.

1. Degradação ambiental – Teses. 2. Florestas – Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Ecologia - Teses. 5. Fungos micorrízicos – Teses. I. Santos, Gabriel de Araújo, 1949-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

WARDSSON LUSTRINO BORGES

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, em Agronomia.

TESE APROVADA EM 21/10/2010.

Gabriel de Araújo Santos. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ

Marcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

Fabiano de Carvalho Balieiro. Dr. Embrapa Solos

Orivaldo José Saggin Júnior. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe
Maria Antônia
Lustrino Borges.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante os 43 meses de Iniciação Científica, os 23 meses de Mestrado e durante os 38 meses do Doutorado.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo pela oportunidade.

Aos professores Marcos Gervasio Pereira, Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho e à professora Lúcia Helena Cunha dos Anjos.

Aos funcionários e estagiárias do curso de Pós-Graduação em Agronomia Roberto, Luciene, Marcos e Isabel.

A Embrapa Agrobiologia por possibilitar a infra-estrutura necessária aos trabalhos.

Ao doutorando Cândido Barreto de Novais (UFLA) e aos pesquisadores Rafael de Paiva Salomão e Jean Luiz Simões de Araújo pela colaboração.

Aos amigos dos Laboratórios de Leguminosas Florestais, Micologia, Ecologia Microbiana, Genética e Bioquímica, Genoma, Gramíneas e Micorrizas.

Aos pesquisadores José Ivo Baldani, Heitor L. C. Coutinho, Fabiano de Carvalho Balieiro, Orivaldo José Saggin Júnior, à pesquisadora Marcia Soares Vidal e à professora Sonia Regina de Souza, por terem participado do exame de qualificação ou da banca de defesa.

Ao professor Gabriel de Araújo Santos e ao pesquisador Sergio Miana de Faria pela orientação.

A minha família, em especial, a mãe Maria Antônia Lustrino Borges e aos meus irmãos pelo cuidado dedicado a mim.

A Keila Caroline Dalle Laste pela ajuda em todos os momentos.

A Sociedade Brasileira por ter financiado os meus estudos, do primeiro dia até o presente momento.

BIOGRAFIA

Wardsson Lustrino Borges, filho de Maria Antônia Lustrino Borges e Juracy Borges do Rego, nasceu em Varzelândia, norte de Minas Gerais no dia 21 de outubro de 1981. Passou a sua infância em Varzelândia, onde cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Padre José Silveira, concluindo em 1995. De 1996 a 1998 morou em Januária, tradicional cidade do norte do estado, ribeirinha ao Rio São Francisco onde concluiu o curso de Técnico em Agropecuária, na Escola Agrotécnica Federal de Januária, atual Instituto Federal de Educação do Norte de Minas. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Antiga Escola Nacional de Agronomia) em 1999 e diplomou-se Engenheiro Agrônomo em 2004. Entre 2004 e 2006 cursou o Mestrado e entre 2007 e 2010 cursou o Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo pela mesma Universidade. Durante os trabalhos de Iniciação Científica, Mestrado e de Doutorado foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

BORGES, Wardsson Lustrino. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas em áreas de mineração de bauxita com diferentes idades de revegetação.** 2010. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Para o adequado manejo e uso dos diferentes recursos de um determinado ecossistema, o conhecimento de como ocorrem os processos ecológicos é de fundamental importância. Dentro desse contexto, a biodiversidade, a ciclagem de nutrientes e o fluxo de energia apresentam papéis regulatórios importantes. Resultados recentes mostram que há relação entre diversidade de plantas e produtividade de biomassa nos ecossistemas. Além de fertilidade do solo, temperatura, latitude, precipitação, herbivoria, interações competitivas, separação espacial e temporal da utilização de recursos, a interação entre espécies pertencentes a diferentes grupos funcionais e a diversidade de microrganismos participam na determinação da diversidade vegetal. Atualmente, ecossistemas naturais são conhecidos por possuírem componentes interligados localizados acima e abaixo do solo, sendo que efeitos regulatórios são estabelecidos entre as populações de cada componente. Neste trabalho buscou-se aprimorar protocolos de extração de DNA e avaliar a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em áreas com diferentes idades de revegetação após a exploração de bauxita, bem como, relacionar a diversidade destes microrganismos com a diversidade de plantas. Foi observado que a adição de polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona e de carvão ativado proporcionou obtenção de produtos de extração de DNA de qualidade suficiente para realização de reações de amplificação de DNA. Observou-se, também, elevada diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio nas diferentes áreas, e esta foi mais elevada em áreas revegetadas a mais tempo. *Glomus macrocarpum* foi a espécie de fungo micorrízico arbuscular predominante entre as 13 espécies encontradas. Os resultados mostram que as práticas de revegetação adotadas nestas áreas estão permitindo o estabelecimento de comunidade de fungos micorrízicos arbusculares no solo. Entretanto, o nível de riqueza e o número de esporos ainda estão baixos, principalmente nas áreas revegetadas após o ano de 2000. Não foi observada correlação para os valores do índice de Shannon entre as comunidades de plantas e de fungos micorrízicos arbusculares. Entretanto, conforme sugerido por outros autores, a relação diversidade acima e abaixo do solo mostrou ser dependente da composição da comunidade de plantas.

Palavras chave: Áreas degradadas. Floresta. Estabilidade ecológica.

ABSTRACT

BORGES, Wardsson Lustrino. **Arbuscular mycorrhizal fungi and symbiotic nitrogen-fixing bacteria diversity in the bauxite mining areas with different revegetation ages.** 2010. 101p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rio do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

To the adequate management and use of different resources of a certain ecosystem, knowledge of the ecological processes is of fundamental importance. In this context, biodiversity, nutrients cycling and energy flux are shown to have important regulatory roles. Recent data showed that there is a relationship between the plants diversity and biomass productivity and that in addition to soil fertility, temperature, latitude, precipitation and herbivory, the interaction among species from the different functional groups and the microbial diversity participates in the determination of vegetal diversity. Currently, natural ecosystems are known to have interconnected components located above and below-ground and regulatory effects are known to be established between the populations of each component. The aims of this study was to improve protocols of DNA extraction and to evaluate the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixation bacteria in areas with different ages of revegetation after bauxite mining, as well as to relate the diversity of these microorganisms with the plant diversity. It was observed that addition of the PVP, PVPP and activated charcoal improved both quality and yield of DNA extracts. Also, high rhizobial diversity was observed in the different areas, and this was highest in the degraded areas that were revegetated longer ago. *Glomus macrocarpum* was the most abundant arbuscular mycorrhizal fungi species among the 13 species found. The results showed that the revegetation strategies adopted in these areas are enabling the establishment of a community of arbuscular mycorrhizal fungi in the soil. However, the richness level and the spore numbers continue to be low, mainly in the degraded areas revegetated after the year 2000. No correlation was observed with respect to the richness values and Shannon-Wiener index between plants community and arbuscular mycorrhizal fungi. The relationship between above and below-ground diversity was dependent of plant community composition.

Keywords: Degraded area. Forest. Ecological stability.

LISTA DE ABREVIACÕES

ARDRA - Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

BSA - Albumina bovina sérica

CA - Carvão ativado

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desorribonucleotídeos trifosfatados

DTT - Ditionitrito

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

MRN- Mineração Rio do Norte

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PVP - Polivinilpirrolidona

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

RFLP – Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição

RNA - Ácido ribonucléico

rDNA – DNA ribossomal

rRNA – RNA ribossomal

T-RFLP - Polimorfismo de comprimento dos fragmentos terminais de restrição

UPGMA - Método de agrupamento da media não ponderada

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Características químicas das 40 amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas sobre estéril de mineração; das duas amostras de terra coletadas em áreas revegetadas sobre os tanques de deposição de rejeito de mineração e de uma amostra de terra coletada em área de Floresta Primária no município de Porto Trombetas-PA..... 16
- Tabela 2:** Distribuição do número de isolados nos diferentes grupos separados pela análise de restrição do gene 16S rDNA (ARDRA), para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2. 22
- Tabela 3:** Distribuição do número de isolados nos diferentes grupos separados pela técnica de BOX-PCR, para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2..... 28
- Tabela 4:** Ocorrência, em relação ao número total de amostras de terra analisadas, número total de esporos e percentagem de esporos para cada espécie e para cada gênero de FMA, em relação ao total de esporos encontrados..... 41
- Tabela 5:** Concentração e pureza dos diferentes produtos de extração de DNA de raízes de *Mucuna pruriens* obtidos a partir da extração com os diferentes protocolos comparados. 68
- Tabela 6:** Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e a comunidade de plantas para as parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2 e 1998A1..... 83
- Tabela 7:** Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a comunidade de plantas para 32 parcelas avaliadas. 84
- Tabela 8:** Valores de correlação (abaixo da diagonal) e valores de probabilidade (acima da diagonal) obtidos pelo teste de Mantel entre as três matrizes de similaridade calculadas pelo coeficiente de Bray-Curtis. 86
- Tabela 9:** Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a comunidade de plantas para os nove grupos distintos, identificados pela análise de agrupamento, com base na composição da comunidade de plantas. 88

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquerda- Demonstração do perfil bauxítico típico encontrado na área de mineração de bauxita em Porto Trombetas (1-“solo orgânico” com espessura média de 0,5 m; 2- argila amarelada que capeia a maioria dos perfis bauxíticos, constituída de caulinita (80%) e quartzo, com espessura máxima no centro do platô, decrescendo para as suas margens; uma camada bauxítica com espessura média de 10 m, subdividindo-se em três subhorizontes sendo, 3- bauxita nodular, 4- laterita ferruginosa e 5-bauxita maciça a granular; 6- argila variegada). Direita- Processo de mineração, (A) Decapeamento que é a retirada da camada estéril composta pelas camadas de solo orgânico, argila, bauxita nodular e laterita ferruginosa e (B) Beneficiamento que é a extração da bauxita com sua britagem e lavagem. Em A se produz o estéril de mineração e em B o rejeito de mineração, onde são realizados os reflorestamentos. 11
- Figura 2:** Número de isolados de nódulos de siratro obtidos para cada uma das parcelas revegetadas amostradas nas áreas de mineração de bauxita, nos diferentes anos (1981 a 2006), bem como para as parcelas revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* (Rejeito 1 e Rejeito 2) e para a parcela sob Floresta. As colunas marcadas em cinza referem-se às parcelas que tiveram os isolados selecionados para as análises moleculares. 18
- Figura 3:** Géis de agarose mostrando o produto da restrição do gene 16S rDNA com as endonucleases de restrição *HinfI* (A), *MspI* (B) e *DdeI* (C). 1- Marcador de peso molecular 1 kb plus ladder; 2- Isolado 64-2; 3- Isolado 64-3; 4- Isolado 64-4; 5- Isolado 64-5; 6- Isolado 64-6; 7- Isolado 64-7; 8- Isolado 64-8; 9- Isolado 64-9; 10- Isolado 67-1; 11- Isolado 67-2; 12- Isolado 67-3; 13- Isolado 67-4; 14- Isolado 67-5; 15- Isolado 67-6; 16- Isolado 67-7; 17- Isolado 67-8; 18- Isolado 73-1; 19- Isolado 73-2; 20- Isolado 73-3; 21- Isolado 73-4; 22- Isolado 73-5; 23- Isolado 73-6; 24- Isolado 73-7; 25- Isolado 73-8; 26- Isolado 73-9 e 27- Marcador de peso molecular 1 kb plus ladder. Os isolados 64-2; 64-3; 64-4; 64-5; 64-6; 64-7; 64-8 e 64-9 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada Rejeito 1; os isolados 67-1; 67-2; 67-3; 67-4; 67-5; 67-6; 67-7 e 67-8 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada 1993A2 e os isolados 73-1; 73-2; 73-3; 73-4; 73-5; 73-6; 73-7; 73-8 e 73-9 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada 1981A1..... 20
- Figura 4:** Dendrograma de similaridade genética construído com o índice de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados analisados pela restrição do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (ARDRA). 21
- Figura 5:** Gel de agarose mostrando os perfis de bandas obtidos, pela técnica de BOX-PCR, para três isolados testando-se as reações com os isolados de rizóbio com duas massas de DNA molde em dois termocicladores. 1- Marcador de peso molecular 1 kb; 2- isolado 03-2 25 ng termociclador 1; 3- isolado 03-2 50 ng termociclador 1; 4- isolado 03-2 25 ng termociclador 2; 5- isolado 03-2 50 ng termociclador 2; 6- isolado 03-6 25 ng termociclador 1; 7- isolado 03-6 50 ng termociclador 1; 8- isolado 03-6 25 ng termociclador 2; 9- isolado 03-6 50 ng termociclador 2; 10- isolado 107-2 25 ng termociclador 1; 11- isolado 107-2 50 ng termociclador 1; 12- isolado 107-2 25 ng termociclador 2; 13- isolado 107-2 50 ng termociclador 2; 14- controle negativo termociclador 1; 15- controle negativo termociclador 2; 16- Marcador de peso molecular

1 kb; 17- repetição do isolado 03-2 25 ng termociclador 1; 18- repetição do isolado 03-2 50 ng termociclador 1; 19- repetição do isolado 03-2 25 ng termociclador 2 e 20- repetição do isolado 03-2 50 ng termociclador 2. Os isolados 03-2; 03-6 e 107-2 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela 1981A1..... 24

Figura 6: Gel de agarose mostrando os perfis de bandas obtidos, pela técnica de BOX-PCR, para sete isolados testando-se as reações em dois termocicladores e duas misturas de reagentes. 1- Marcador de peso molecular 1 kb; 2- isolado 03-2 25 ng termociclador 1; 3- isolado 03-2 25 ng termociclador 2; 4- isolado 03-6 25 ng termociclador 1; 5- isolado 03-6 25 ng termociclador 2; 6- isolado 107-2 25 ng termociclador 1; 8- isolado 107-2 25 ng termociclador 2; 9- isolado 03-2 25 ng termociclador 1 mistura 1; 10- isolado 03-6 25 ng termociclador 1 mistura 1; 11- isolado 23-4 25 ng termociclador 1 mistura 1; 12- isolado 121-8 25 ng termociclador 1 mistura 1; 13- isolado 128-8 25 ng termociclador 1 mistura 1; 14- isolado 48-1 25 ng termociclador 1 mistura 1; 15- isolado 03-2 25 ng termociclador 1 mistura 2; 16- isolado 03-6 25 ng termociclador 1 mistura 2; 17- isolado 23-4 25 ng termociclador 1 mistura 2; 18- isolado 121-8 25 ng termociclador 1 mistura 2; 19- isolado 128-8 25 ng termociclador 1 mistura 2; 20- isolado 48-1 25 ng termociclador 1 mistura 2; 21- controle negativo termociclador 1; 22- controle negativo termociclador 2; 23- controle negativo termociclador 1 mistura 1; 24- controle negativo termociclador 1 mistura 2 e 25- Marcador de peso molecular 1 kb. Os isolados 03-2; 03-6 e 107-2 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela 1981A1; os isolados 23-4; 48-1 e 128-8 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela Rejeito 2 e o isolado 121-8 foi isolado a partir da amostra de terra coletada na parcela Floresta-1. 25

Figura 7: Dendrograma de similaridade genética construído com o índice de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados analisados pela técnica de BOX-PCR..... 27

Figura 8: Riqueza de grupos genotípicos, valores dos índices de dominância de Simpson, de diversidade de Shannon-Wiener e de equitabilidade de Pielou observados para o grupo de isolados de rizóbio analisados pela restrição do gene 16S rDNA (ARDRA) e pela técnica de BOX-PCR para as amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 2 e Rejeito 2..... 29

Figura 9: Variações dos valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener em função do número de isolados obtidos para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2. Estes dados foram obtidos pela análise de rarefação a partir da distribuição dos isolados nos grupos pela técnica de BOX-PCR. 31

Figura 10: Esporos de fungos micorrízicos arbusculares identificadas nas parcelas avaliadas. (A) *Scutellospora scutata*; (B) *Gigaspora margarita*; (C) *Acaulospora mellea*; (D) *Glomus* sp1 (esporocarpo); (E) *Acaulospora* sp.; (F) *Glomus clarum*; (G) *Glomus macrocarpum*; (H) *Acaulospora foveata*; (I) *Acaulospora tuberculata*; (J) *Glomus* sp2; (K) *Acaulospora scrobiculata*; (L) *Glomus etunicatum* e (M) *Glomus fasciculatum*. 42

Figura 11: Distribuição percentual do número de esporos para as 13 espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas, em relação ao número total de esporos de cada parcela amostrada, para as 40 amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas sobre estéril de mineração, para as duas amostras de terra coletas em parcelas revegetadas sobre rejeito de mineração e para uma amostra de terra coletada em área de Floresta primária em Porto Trombetas..... 45

- Figura 12:** Riqueza de espécies observada para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA. 47
- Figura 13:** Valores do índice de dominância de Simpson observados para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA. 48
- Figura 14:** Valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA. 49
- Figura 15:** Valores do índices de equitabilidade de Pielou para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA. 50
- Figura 16:** Número de bandas visualizadas nos géis com gradiente de desnaturante (DGGE) para a espécie Embaúba para as amostras de raízes coletadas nas parcelas revegetadas para as quais se obteve amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1. 52
- Figura 17:** Número de bandas visualizadas nos géis com gradiente de desnaturante (DGGE) para a espécie Lacre vermelho para as amostras de raízes coletadas nas parcelas revegetadas para as quais se obteve amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1..... 53
- Figura 18:** Dendrogramas de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construídos com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Embaúba avaliadas pela análise de restrição (A) ARDRA e pela eletroforese em gel com gradiente desnaturante (B) DGGE do gene 18S rDNA. 54
- Figura 19:** Dendrograma de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construído com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Lacre Vermelho avaliadas pela análise de restrição (ARDRA) do gene 18S rDNA..... 55
- Figura 20:** Dendrograma de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construído com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Lacre Vermelho avaliadas pela eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 18S rDNA..... 56
- Figura 21:** Géis de agarose mostrando o produto de extração de DNA de raiz de *Mucuna pruriens* obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) repetição 1 (B) repetição 2. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen. 70

Figura 22: Géis de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) iniciadores 968f-GC-1401 (B) iniciadores NS1-NS4. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen; 30- controle negativo..... 71

Figura 23: Géis de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) iniciadores NS31-AM1 (B) iniciadores NS31GC-AM1. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen; 30- controle negativo. 72

Figura 24: Dendrogramas de similaridade construídos com o coeficiente de Bray-Curtis e método de agrupamento UPGMA, baseados (A) na composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs); (B) nos valores para os diferentes parâmetros avaliados pela análise químicas de solo e (C) na composição da comunidade de espécies de plantas. 87

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICAS EM ÁREAS COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 - INTRODUÇÃO	8
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1 – Área de Estudo e Coleta.....	10
2.2 - Avaliação da Diversidade de Rizóbio.....	12
2.3 - Tratamento Estatístico dos Dados	14
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 - Análise Química das Amostras de Terra	16
3.2 - Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas em Leguminosas...	17
4 - CONCLUSÕES	32
CAPÍTULO II DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT	35
1 - INTRODUÇÃO	36
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 - Área de Estudo e Coleta.....	38
2.2 - Avaliação da Diversidade de FMAs por Meio de Características Morfológicas dos Esporos	38
2.3 - Avaliação da Diversidade de FMAs por Meio de ARDRA e DGGE.....	38
2.4 - Tratamento Estatístico dos Dados	39
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 - Avaliação da Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares Pela Ocorrência de Esporos	40
3.2 - Avaliação da Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares por ARDRA e DGGE a Partir de Amostras de Raízes de Embaúba e Lacre Vermelho	51
4 - CONCLUSÕES	58

CAPÍTULO III COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE RAÍZES COLETADAS NO CAMPO	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT	61
1 - INTRODUÇÃO	62
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 - Coleta e Preparo da Amostra de Raiz	64
2.2 - Procedimento de Extração do DNA	64
2.3 - Avaliação da Qualidade do Extrato de DNA Obtido	66
2.4 - Tratamento Estatístico dos Dados	66
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4 - CONCLUSÕES	74
CAPÍTULO IV RELAÇÃO ENTRE DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICAS, FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E PLANTAS EM ÁREAS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO	75
RESUMO.....	76
ABSTRACT	77
1 - INTRODUÇÃO	78
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	80
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4 – CONCLUSÕES.....	89
CONCLUSÕES GERAIS	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

INTRODUÇÃO GERAL

Constitui grande interesse dos ecólogos compreender como os ecossistemas naturais funcionam e quais são os fatores responsáveis por estabelecer e controlar o equilíbrio destes. A funcionalidade e a estabilidade dos ecossistemas terrestres têm sido entendidas como resultado da interação entre a biodiversidade de organismos vivos (plantas, animais e microrganismos); pela composição e estrutura das comunidades destes organismos; pelo importante processo de ciclagem de nutrientes desempenhado por essas comunidades e pelo fluxo de energia entre os diferentes níveis tróficos.

Ecossistemas terrestres consistem de componentes localizados acima e abaixo do solo que interagem para influenciar processos e propriedades em nível de comunidades e ecossistemas, muito embora, a maioria dos trabalhos desenvolvidos considera estes componentes como sendo partes isoladas um do outro (Wardle et al., 2004).

De certa forma, a diversidade, bem como o padrão de distribuição de espécies vegetais tem sido o foco da maioria dos trabalhos desenvolvidos na esfera de ecossistemas, onde a diversidade de plantas é considerada importante para a manutenção da funcionalidade deste. Como resultado, volume significativo de informações foram gerados, possibilitando entender as diferentes estratégias de vida das plantas, os mecanismos de dispersão de sementes, bem como, determinar as principais variáveis determinantes da biogeografia de plantas. Em escala continental sabe-se que temperatura, latitude e precipitação são bons preditores da diversidade de plantas (Fierer e Jackson, 2006). Por outro lado, os mecanismos determinantes da composição e diversidade de espécies vegetais em menores escalas geográficas (van der Heijden et al., 1998), o relacionamento entre diversidade de plantas e produtividade do ecossistema (Tilman et al., 2001), bem como o relacionamento entre diversidade de plantas, comunidade microbiana e funções do ecossistema (Zak et al., 2003), ainda não são claros.

A habilidade de muitas espécies de plantas co-existirem determinando a diversidade vegetal tem sido explicada pelas interações competitivas, separação espacial e temporal da utilização de recursos, pela criação de novos nichos por distúrbios nos nichos existentes e, pela interação de diferentes espécies vegetais pertencentes a diferentes grupos funcionais. Fertilidade do solo e herbívora também influenciam a riqueza de espécies de plantas (van der Heijden et al., 2006a).

Microrganismos apresentam enorme diversidade e conseguem habitar os mais diversos nichos ecológicos em função da capacidade de utilização de diferentes compostos como fonte de energia e nutrientes. Em associações com espécies vegetais os microrganismos podem habitar diferentes compartimentos como, superfícies de folhas (filoplano), viverem endofiticamente (dentro dos tecidos vegetais), colonizarem a rizosfera (zona de influência das raízes) ou o solo não rizosférico. Alta diversidade de bactérias tem sido relatada em filoplano e solo (Curtis et al. 2002; Lambais et al. 2006).

Além disso, microrganismos desempenham papéis importantes nos ecossistemas como aquisição de nutrientes, participando significativamente nos ciclos biogeoquímicos, principalmente nos ciclos do carbono e nitrogênio e em processo de formação do solo. Enquanto é reconhecida a importância dos microrganismos para a funcionalidade dos ecossistemas, o impacto destes sobre a diversidade e produtividade de plantas é pobremente entendido (Zak et al., 2003; van der Heijden et al., 2008).

Embora pouca atenção tenha sido dada à participação dos microrganismos, resultados recentes vêm corroborando a idéia de que os microrganismos, especialmente os que estabelecem relações mais íntimas com as plantas, como as simbiontes radiculares, participam na determinação tanto da diversidade quanto da produtividade de ecossistemas vegetais (van

der Heijden et al., 1998, 2006a;b, 2008; O'Connor et al., 2002; Wardle et al., 2004; Santos, 2008).

Para que um grupo de microrganismos simbioses de plantas, sejam os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) ou as bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas (rizóbios), possa influenciar a comunidade de plantas em um ecossistema, faz-se necessário que ocorra variabilidade da resposta entre diferentes pares simbioses. Isto é, na comunidade de plantas as espécies devem diferentemente influenciar e serem responderem diferentemente as espécies de microrganismos, podendo ocorrer também variações intra-específicas. Como para a associação entre plantas e FMAs tem sido postulado que a especificidade hospedeira é baixa ou inexistente, esse comportamento diferenciado pode ser entendido como “especificidade funcional” (Pouyu-Rojas et al., 2006). Estes autores observaram rendimentos diferenciados quando realizaram a inoculação de diferentes isolados de FMAs em uma mesma espécie de planta.

Urcelay e Díaz (2003) propuseram um modelo empírico para avaliar os efeitos dos FMAs sobre a diversidade de plantas, que considera a dependência da associação micorrízica das espécies presentes na comunidade e da posição de cada espécie na hierarquia de dominância. O modelo proposto prediz que a presença de FMAs diminuirá a declividade da curva de dominância da planta, propiciando a diversidade de plantas apenas em sistemas onde a maioria das espécies de plantas subordinadas são micotróficas. Em outros sistemas o efeito de FMAs é considerado nulo ou negativo sobre a diversidade de plantas.

Neste modelo, em condição onde a maioria das espécies de plantas em uma comunidade apresenta pouca ou nenhuma dependência à micorrização, os efeitos dos FMAs sobre a composição da comunidade não são esperados, pelo menos em curto prazo. Em outra condição onde as plantas dominantes são altamente dependentes e as subordinadas não são, a presença de FMAs deve incrementar a declividade da curva de dominância das espécies e diminuir a diversidade de plantas. O principal mecanismo de ação esperado será a maior capacidade competitiva das espécies dominantes quando micorrizadas. Caso contrário, se as espécies subordinadas são altamente micotróficas e as dominantes não, então a presença de FMAs pode reduzir a declividade da curva de dominância incrementando a diversidade de plantas na comunidade. Por fim, se ambos os tipos de espécies, subordinadas e dominantes, são dependentes da micorrização, a presença de FMAs também deve reduzir a declividade da curva de dominância incrementando a diversidade de plantas. Neste último caso, Urcelay e Díaz (2003) apontam que um possível mecanismo de ação dos FMAs poderia ser a redistribuição de fotoassimilados a partir das espécies dominantes para as subordinadas, através de uma rede de micorriza comum, embora ressaltem que esse mecanismo necessita de evidências mais conclusivas sobre sua relevância ecológica à campo.

Urcelay e Díaz (2003) discutem que em situações onde os FMAs são componentes do sistema, o conhecimento da dependência da micorriza das espécies subordinadas é mais informativo do que o conhecimento da dependência das espécies dominantes para prever os efeitos dos FMAs sobre a diversidade de plantas na comunidade. Se as espécies subordinadas são altamente dependentes, a diversidade de plantas deve aumentar na presença de FMAs independentemente da dependência micorrízica das dominantes. Por outro lado, se o grau de dependência à micorriza das subordinadas não é conhecido, não é possível prever se a diversidade de plantas pode incrementar ou decrescer na presença de FMAs.

O nível de fertilidade do sítio analisado também influencia as relações competitivas entre espécies vegetais e participa da determinação do grau de riqueza de plantas. Flores-Aylas et al. (2003) estudaram os efeitos da inoculação com um isolado de *Glomus etunicatum* e a aplicação de fósforo sobre comunidades de plantas em condição estéril em casa de vegetação. Neste trabalho os autores implantaram comunidades com seis espécies de plantas que receberam ou não a inoculação de FMA em três níveis distintos de disponibilidade de

fósforo no solo. Foi possível observar alterações nas relações competitivas entre as espécies vegetais estudadas como resultado da inoculação com o isolado de *Glomus etunicatum*. Sendo que a inoculação teve dois papéis contrários, dependendo da disponibilidade de fósforo, onde a inoculação tanto diminuiu quanto aumentou a competição das espécies. Na condição de não inoculação ou baixa disponibilidade de fósforo houve dominância das espécies, fedegoso (*Senna macranthera*) e cássia-verrugosa (*Senna multijuga*), enquanto que em condição de suprimento adequado ou alto nível de fósforo no solo a dominância foi da espécie gravitinga (*Solanum granuloso-leprosum*).

Outro grupo de microrganismos que tem sido associado à determinação da diversidade de plantas em ecossistemas naturais é o grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio (van der Heijden et al., 2008), com ênfase nas bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em espécies da família das leguminosas (van der Heijden et al., 2006a). Objetivando avaliar o efeito da inoculação de rizóbio sobre a composição da comunidade de plantas van der Heijden et al. (2006a) implantaram um experimento com 16 parcelas, em que oito foram inoculadas com nove isolados obtidos de nódulos radiculares de três espécies de leguminosas diferentes, e as demais foram utilizadas como controle não inoculado. Em cada parcela, uma comunidade com 83 indivíduos de 11 espécies de plantas foi implantada. Nesta comunidade as três espécies de leguminosas estavam presentes e o experimento foi coletado 14 semanas após plantio. Observou-se que a biomassa de parte aérea, o acúmulo de nitrogênio e o índice de equitabilidade da comunidade de plantas foram 34,6%, 85,0% e 34,3% superiores, respectivamente, quando a inoculação com rizóbio foi realizada. Dessa forma, os autores demonstraram que bactérias fixadoras de nitrogênio promovem a equitabilidade, a produtividade e a captura de nitrogênio em sistemas ricos com espécies leguminosas.

Com base no parágrafo 2º do artigo 225 da Constituição Federal, no Brasil “Aquele que explorar recursos minerais fica obrigado a recuperar o ambiente degradado, de acordo com solução técnica exigida pelo órgão público competente, na forma da lei”, com o objetivo de zelar pelo direito de todos ao meio ambiente ecologicamente equilibrado. Dessa forma, o entendimento da capacidade de FMAs e rizóbios de influenciarem a diversidade de plantas de um dado sítio pode ter implicações práticas de significativa importância para o manejo de áreas degradadas, uma vez que o incremento da diversidade destes é associado ao aumento da capacidade de estabelecimento e de competição de espécies subordinadas.

Alguns autores têm procurado entender a diversidade e a dinâmica de sucessão de espécies de plantas e de microrganismos a partir de ensaios em condições controladas adotando tratamentos previamente estabelecidos. Alternativamente, alguns autores têm utilizado “experimentos naturais” para acessar a diversidade e entender o padrão de sucessão de espécies. Para isso, locais onde se possa observar o efeito do tempo, da fertilidade do solo ou da disponibilidade de nitrogênio que possam interferir sobre a composição das comunidades são identificados e analisados. Nessa linha alguns trabalhos foram realizados no sítio onde hoje se encontra o “Cedar Creek Natural History Area”, uma área que fica a aproximadamente 50 km ao norte de Minnesota (EUA) que dispõe de campos que foram cultivados e abandonados em diferentes épocas, estando, portanto em diferentes estágios sucessionais (Johnson et al., 1991).

No presente trabalho, buscou-se avaliar a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas e de fungos micorrízicos arbusculares em áreas que foram submetidas à atividade de revegetação em diferentes épocas após a atividade de mineração de bauxita no estado do Pará. Atualmente essas áreas apresentam diferentes composições de comunidades vegetais. Os resultados deste trabalho são aqui apresentados na forma de capítulos.

No primeiro capítulo são apresentados os resultados da análise de diversidade de bactérias isoladas de nódulos radiculares, realizada por meio da análise de restrição do gene do DNA ribossomal (16S rDNA) e da amplificação com o iniciador BOXA1R, com o

objetivo de verificar diferenças nos níveis de diversidade de áreas revegetadas em diferentes épocas.

No segundo capítulo estão os resultados relativos à análise de diversidade de fungos micorrízicos arbusculares, realizada através da avaliação da ocorrência de esporos nas amostras de terra e da separação de fragmentos do gene do DNA ribossomal (18S rDNA), em amostras de raízes, amplificados por reação de polimerase em cadeia (PCR) em gel com gradiente desnaturante (eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE) ou em gel de agarose após a restrição com endonucleases de restrição (análise de restrição do gene ribossomal amplificado - ARDRA).

Para os dois primeiros capítulos a hipótese avaliada foi de que há diferença no nível de diversidade tanto de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas quanto de fungos micorrízicos arbusculares entre áreas com diferentes idades de revegetação após atividade de mineração de bauxita.

No terceiro capítulo são apresentados os resultados relativos à otimização de protocolo de extração de DNA a partir de amostras de raízes, visando obter produtos com pureza e quantidade de DNA suficientes para serem utilizados em reações de PCR sem a necessidade de adoção de etapas de purificação. Nesta hipótese avaliada foi de que há diferença no grau de pureza do extrato bruto de DNA obtido por diferentes protocolos de extração de DNA.

Por fim, no último capítulo buscou-se correlacionar os dados de diversidade de microrganismos com a diversidade de plantas das áreas estudadas. Onde as hipóteses avaliadas foram: primeira, de que há relação entre a comunidade de microrganismos e espécies de plantas em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita e, segunda, de que a composição da comunidade de plantas influencia a natureza da relação entre diversidade de microrganismos e espécies de plantas em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICAS EM ÁREAS COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA

RESUMO

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas, comumente denominadas de rizóbios, promovem a produtividade de diferentes espécies agrícolas e são de significativa importância para ecossistemas naturais, uma vez que incrementam o teor de nitrogênio no solo, principalmente em comunidades ricas em leguminosas. A cada dia novas espécies de rizóbios são descritas, e até a década passada, todas eram classificadas como sendo pertencentes à subdivisão alfa do filo proteobacteria. Nos últimos anos, isolados capazes de induzir a formação de nódulos foram classificados como sendo membros da subdivisão beta de proteobacteria e, mais recentemente alguns autores têm encontrado similaridade entre isolados de nódulos e membros da subdivisão gama de proteobacteria, evidenciando que a capacidade de induzir a formação de nódulos em leguminosas é amplamente distribuída. Avaliou-se por meio da restrição do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (ARDRA) e da técnica de BOX-PCR a diversidade de isolados de nódulos em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita, obtidos por meio de cultivo armadilha em vasos tipo “Leonard”. As duas ferramentas utilizadas mostraram resultados similares e foi possível observar elevada diversidade quando foram levados em conta todos os isolados. Os resultados mostram que a diversidade deste grupo chave de microrganismo tem aumentado com o tempo de revegetação, sendo que a área revegetada em 1981 apresentou o nível mais alto de diversidade e a área revegetada em 2006, apresentou menor número de isolados e menor nível de diversidade.

Palavras chave: Rizóbio. Rep-PCR. Análise de agrupamento. Nódulos.

ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria commonly known as rhizobia are able to improve the productivity of different crop species and are important to natural ecosystems since they enhance the nitrogen content of the soil, mainly in communities rich in leguminous plants. Until the past decade, all root-nodule bacteria were classified as belonging to the alpha subdivision of the Proteobacteria phylum. In recent years, root nodules bacteria able to induce the nodules formation were classified as members of the beta subdivision of the Proteobacteria phylum and, more recently, some authors have found similarity between root nodule bacteria and members of the gamma subdivision of the Proteobacteria phylum, showing that the ability to induce the nodule formation in legumes is widely distributed. In this study the diversity of root nodule inhabiting bacteria that were obtained by trap culture in areas with different ages of revegetation after bauxite mining, was evaluated using both the PCR-RFLP and BOX-PCR techniques. Both tools used showed similar results and high diversity was observed when all isolates were taken into account. The results showed that diversity of this key group of microorganisms increased with the revegetation time since the degraded area that was revegetated in 1981 showed the highest diversity level and the degraded area revegetated in 2006 showed both the lowest isolated numbers and diversity level.

Keywords: Rhizobia. Rep-PCR. Cluster analysis. Nodules.

1 - INTRODUÇÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂) compõem um grupo de microrganismos de extrema importância para os diferentes ecossistemas, uma vez que propiciam a entrada de nitrogênio no solo. A capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico está amplamente distribuída entre microrganismos com diferentes níveis de relacionamento filogenético, onde são encontrados representantes de Archaea e de diferentes grupos de Eubacteria, entretanto, a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e induzir a formação de nódulos em leguminosas está restrita a membros do filo proteobacteria.

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, comumente denominadas de rizóbio, assim com os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos presentes e, geralmente, abundantes em solos de muitos ecossistemas (Moreira et al., 1998). Os rizóbios apresentam elevada diversidade e ampla variabilidade quanto à eficiência simbiótica (Soares et al., 2006a; b; Teixeira et al., 2010).

A importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN) simbiótica em sistemas agrícolas é bastante documentada, onde várias espécies de plantas, como soja, feijão e amendoim se beneficiam (Soares et al., 2006b; Santos et al., 2007; Borges et al., 2007). Por outro lado, o papel deste grupo de microrganismos em ecossistemas naturais é pobremente entendido (van der Heijden et al., 2006a). Pouco é conhecido sobre a contribuição do incremento de diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio para a produtividade e diversidade de plantas vivendo em comunidades. Melloni et al. (2006) relataram que maior diversidade de bactérias no solo significa maior resiliência do sistema e que maior diversidade de bactérias nodulíferas de leguminosas pode favorecer a simbiose com várias espécies leguminosas e maximizar a fixação biológica de nitrogênio em áreas degradadas.

Assim como observado para a relação plantas-FMAs, comunidades de plantas apresentam espécies com respostas diferenciadas às bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas e, a ocorrência desta “diversidade funcional” torna esse grupo de bactérias hipoteticamente capaz de influenciar a composição da comunidade de plantas.

A participação dos rizóbios na determinação da diversidade vegetal em um dado sítio pode se dar pelo suprimento de nitrogênio estimulando o crescimento e aumentando a competitividade das leguminosas nodulíferas e pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio no solo estimulando o crescimento de outras espécies de plantas quando ocorre transferência do nitrogênio fixado (Asner et al., 2008). Assim, podem alterar a distribuição tanto das leguminosas quanto das não leguminosas ou podem também, em situações onde ocorre limitação por nitrogênio e pouca limitação por outros fatores, influenciar somente as leguminosas nodulíferas onde as outras espécies não são afetadas, caracterizando um cenário de complementaridade e separação de uso de recurso (van der Heijden et al., 2006a).

van der Heijden et al. (2006a) demonstraram que bactérias fixadoras de nitrogênio promovem a equitabilidade, a produtividade e a captura de nitrogênio em sistemas ricos com espécies leguminosas. Como houve diferença significativa somente nas leguminosas quanto a biomassa e a quantidade de nitrogênio entre os tratamentos, os autores atribuíram o efeito positivo do rizóbio à influência provocada especificamente sobre o crescimento das leguminosas. Baseando-se nesses resultados e sobre o papel dos rizóbios em comunidades ricas em leguminosas, para a determinação da produtividade e captura de nitrogênio, estes autores sugerem que a presença de um diverso grupo de bactérias nodulíferas é requerida para que diferentes espécies de plantas leguminosas e não leguminosas co-existam.

A utilização de ferramentas moleculares nos estudos de caracterização de isolados de rizóbio tem aumentado o conhecimento sobre a diversidade e distribuição das diferentes

espécies (Lima et al., 2009). Isso tem contribuído para a descrição de novas espécies (Chen et al., 2006, 2007, 2008), revisão taxônômica (Willems et al., 2006) e para a identificação de isolados pertencentes a grupos filogeneticamente distantes como capazes de induzir a formação de nódulos (Moulin et al., 2001; Shiraishi et al., 2010).

Alguns estudos têm sido realizados para acessar a diversidade de bactérias diazotróficas por meio de ferramentas moleculares, utilizando iniciadores para amplificação de genes envolvidos no processo de fixação, sem a necessidade de cultivo (Hsu e Buckley, 2009). Entretanto, estudos nessa linha ainda são escassos para avaliar a diversidade de bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas, o que pode ser em parte explicado pela falta de iniciadores com resolução adequada para esses estudos, uma vez que esse grupo é polifilético. Além disso, Lima et al. (2009) argumentaram que a funcionalidade da comunidade não pode ser facilmente acessada por ferramentas moleculares o que ainda torna a utilização de cultivos armadilhas com hospedeiros promíscuos, a alternativa mais viável para acessar a diversidade de bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas.

Neste trabalho objetivou-se obter e avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita, obtidos por meio de cultivo armadilha utilizando as espécies *Macrottilium atropurpureum* e *Mimosa acutistipula*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Área de Estudo e Coleta

As amostras de terra e raízes utilizadas no presente estudo foram coletadas em áreas revegetadas após a atividade de mineração de bauxita da Mineração Rio do Norte (MRN). As amostras foram coletadas em talhões de reflorestamento que foram revegetados em diferentes anos, tendo atualmente diferentes “idades” de revegetação, compondo assim uma cronossequência de revegetação. Esta cronossequência foi implantada ao longo de 25 anos, entre os anos de 1981 e 2006. A área amostrada denominada de Flona Saracá-Taquiera é subordinada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e está inserida na Microrregião do médio Amazonas paraense, no distrito de Porto Trombetas, município de Oriximiná, Pará (1° 21' S - 56° 22' W, altitude média de 180 m, 100 km a oeste da confluência do rio Trombetas com o rio Amazonas) (Salomão et al., 2007).

As operações da MRN em Porto Trombetas consistem na extração do minério, beneficiamento, transporte ferroviário, secagem e embarque de navios. A capacidade inicial de produção da MRN foi de 3,35 milhões de toneladas de bauxita anuais. O aumento da demanda de mercado e a grande aceitação do minério produzido pela empresa nas refinarias de todo o mundo favoreceram o aumento gradativo desta capacidade. Atualmente, a capacidade de produção instalada da empresa é de 18,1 milhões de toneladas anuais (Mineração Rio do Norte, 2010).

A Mineração Rio do Norte opera nas minas Saracá, Almeidas e Avisos. Nestas, o minério encontra-se a uma profundidade média de 8 m, coberto por uma vegetação densa e uma camada denominada de estéril composta de solo orgânico, argila, bauxita nodular e laterita ferruginosa. Para ser lavrada, faz-se necessário o decapeamento da bauxita, que consiste na retirada da camada estéril. Esta operação se faz de forma seqüencial, em faixas regulares, onde o estéril de cobertura escavado é depositado na faixa adjacente, na qual o minério fora anteriormente lavrado. Nestas áreas são realizadas as revegetações sobre o estéril de mineração.

Após o decapeamento, a bauxita passa pelo processo de lavra, e o minério escavado é transportado em caminhões fora-de-estrada até as instalações de britagem. Nesta etapa o minério é então reduzido a uma granulometria de no máximo 76,2 mm. O minério é então transportado por correias para as instalações de lavagem, ciclonagem e filtragem. Ao fim deste processo de beneficiamento aproximadamente 27% de massa sólida resulta como rejeito de bauxita, que é depositada nos reservatórios construídos em áreas já mineradas, no platô Saracá (Mineração Rio do Norte, 2010). Com o preenchimento destes tanques faz-se a revegetação sobre o rejeito de mineração.

Na Figura 1 apresenta-se esquema ilustrando como o processo de extração da bauxita é realizado com as diferentes etapas que levam a produção dos substratos estéril e rejeito.

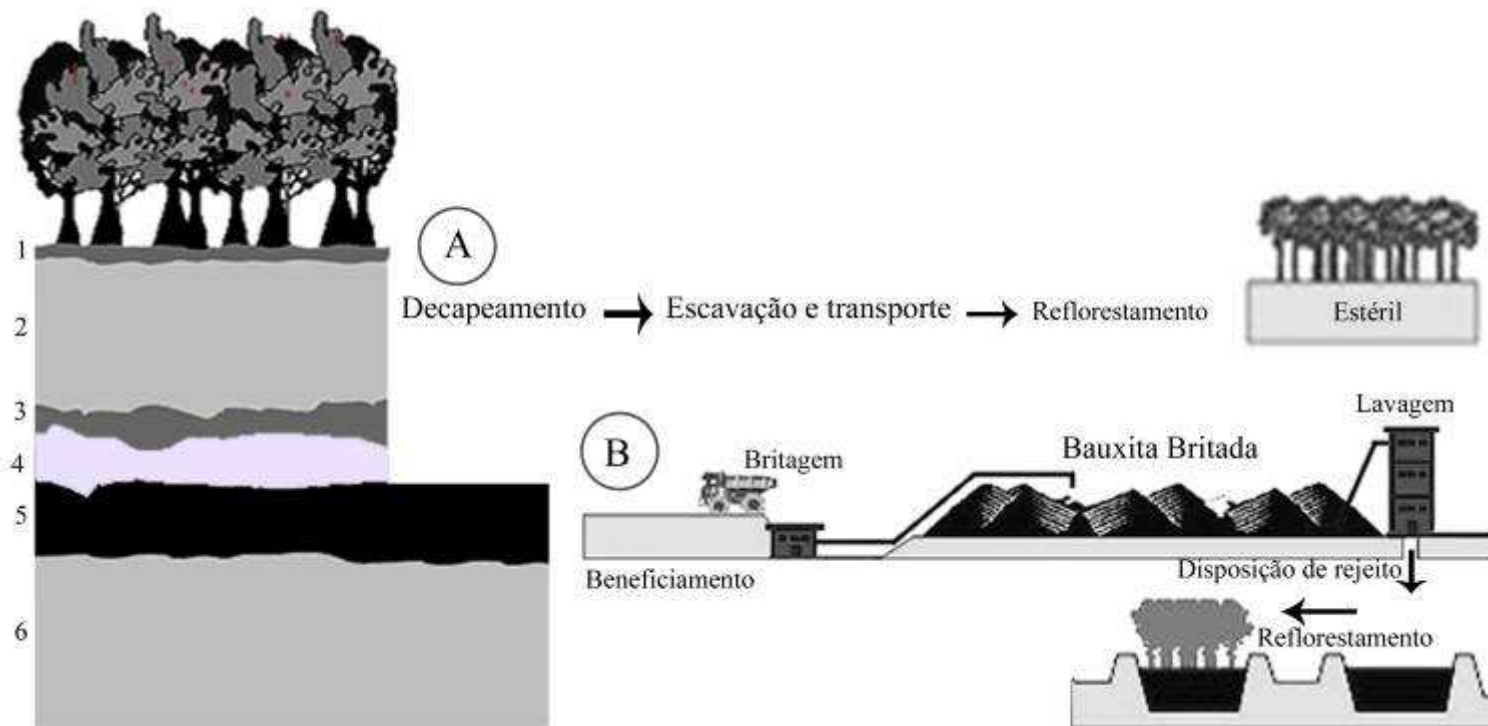


Figura 1: Esquerda - Demonstração do perfil bauxítico típico encontrado na área de mineração de bauxita em Porto Trombetas (1-“solo orgânico” com espessura média de 0,5 m; 2- argila amarelada que capeia a maioria dos perfis bauxíticos, constituída de caulinita (80%) e quartzo, com espessura máxima no centro do platô, decrescendo para as suas margens; uma camada bauxítica com espessura média de 10 m, subdividindo-se em três subhorizontes sendo, 3- bauxita nodular, 4- laterita ferruginosa e 5-bauxita maciça a granular; 6- argila variegada). Direita - Processo de mineração, (A) Decapeamento que é a retirada da camada estéril composta pelas camadas de solo orgânico, argila, bauxita nodular e laterita ferruginosa e (B) Beneficiamento que é a extração da bauxita com sua britagem e lavagem. Em A se produz o estéril de mineração e em B o rejeito de mineração, onde são realizados os reflorestamentos. Adaptado de http://www.mrn.com.br/index_1024.htm.

A revegetação das parcelas implantadas sobre o substrato denominado de “estéril” foi realizada para a maior parte dos anos pela mineradora utilizando-se de sementes disponíveis nas áreas de Floresta próximas às áreas de mineração e as técnicas silviculturais sofreram alterações na medida em que se observaram os resultados dos reflorestamentos implantados nos anos anteriores. Dessa forma, tanto a identidade das espécies utilizadas a cada ano quanto à densidade de plantio variaram ao longo destes 25 anos.

Denomina-se de “top soil” ou de “solo orgânico” a camada do solo entre 0 e 50 cm que é retirada após a supressão da vegetação e atualmente devolvida, na forma de aplicação superficial, sobre o estéril de mineração antes da revegetação. Nos primeiros anos de revegetação, entre 1981 e 1985, não se realizou a prática de deposição do “top soil” sobre as áreas revegetadas. Entre 1986 e o início dos anos 1990 essa camada de solo era retirada e retornava aos talhões de revegetação de forma incorporada, entretanto havia uma diluição muito grande deste material, uma vez que essa camada era incorporada até a profundidade de 4 m. Como os resultados, com essa prática, não foram satisfatórios a partir de 1992 essa camada de solo denominada de “top soil” passou a ser distribuída superficialmente sobre o substrato de revegetação, sem a incorporação. Dessa forma, as parcelas avaliadas aqui apresentam históricos de revegetação distintos.

Em função do tamanho da área explorada pela mineradora um número diferenciado de talhões de reflorestamento com aproximadamente 60 ha são implantados anualmente. Dentro de cada talhão foram implantadas parcelas permanentes para o monitoramento dos reflorestamentos com relação à composição florística. Geralmente o número de parcelas permanentes implantadas anualmente é igual a dois, mas em alguns anos esse número foi diferente. Para identificação destas parcelas ao longo dos anos utilizou-se o ano em que se realizou o reflorestamento e os sufixos 1; 2; A1; A2; A3 ou FP, como por exemplo, 1981A1. Nos últimos anos a mineradora tem padronizado a revegetação de dois talhões, com a implantação de duas parcelas permanente e adotada, para a identificação das parcelas permanentes, o ano de revegetação acompanhado dos sufixos A1 e A2.

As parcelas permanentes de onde foram coletadas as amostras de terra apresentam dimensões de 25 x 10 m. Para a coleta de amostras de terra, as parcelas foram percorridas em zig-zag e, em cada parcela amostrada, 20 amostras simples foram coletadas para compor uma amostra composta. A profundidade de amostragem foi de 0 a 20 cm. No Laboratório de Leguminosas Florestais do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Embrapa Agrobiologia), as amostras foram secadas a temperatura ambiente e peneiradas para posterior procedimento de análise química conforme o Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (1997).

Nesse trabalho, um número máximo de três parcelas para cada ano foi amostrado. A coleta foi realizada em 2007, de onde se obteve um total de 43 amostras de terra a partir de parcelas revegetadas em 22 anos diferentes. A mineradora não realizou revegetação nesta área de extração de bauxita nos anos de 1988, 1989, 1990, 1991. Dentre as 43 amostras, 40 foram coletadas em parcelas implantadas em talhões revegetados sobre substrato denominado de “estéril”, duas amostras foram coletadas em parcelas implantadas sobre substrato denominado de “rejeito de mineração” e uma amostra foi coletada em área de Floresta Primária (Floresta-1).

Para ambas as parcelas, implantadas sobre tanques de deposição de rejeito o plantio foi realizado com a espécie *Acacia mangium* no ano de 1993. Para essas parcelas não se utilizou a camada de “top soil”, sendo que em uma foi realizado o plantio sem a inoculação de rizóbios (Rejeito 1) e, em outra, com inoculação de uma mistura de diferentes rizóbios (Rejeito 2), no momento do plantio.

Tanto as parcelas revegetadas sobre os tanques de deposição de rejeito quanto à área de Floresta Primária foram incluídas com a finalidade de realizar comparações.

2.2 - Avaliação da Diversidade de Rizóbio

Para avaliar a presença e a diversidade de isolados de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio nas áreas revegetadas com diferentes idades de revegetação foi implantado experimento em condições de casa de vegetação utilizando suspensão da amostra de terra coletada como inóculo. O experimento foi conduzido utilizando vasos esterilizados tipo “Leonard”, contendo areia e vermiculita na proporção de 1:1 v/v, em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições. Os tratamentos consistiram de inoculação de suspensão da amostra de terra de cada parcela em plantas iscas. Como plantas iscas foram utilizadas o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e a mimosa da canga (*Mimosa acutistipula*).

As sementes foram tratadas com ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado por 10 min para quebra de dormência e com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% por 3 min para desinfestação superficial, e estas foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro e algodão umedecidos. Três plântulas de cada espécie foram transplantadas por vaso e cada planta foi inoculada com 1 mL da suspensão da amostra de terra em solução salina. A suspensão foi preparada utilizando 10 g de terra em 90 mL de solução de NaCl (0,145 M) sob agitação orbital por 30 min. O experimento foi conduzido por 90 dias, onde as plantas receberam aplicação de água e solução nutritiva (Norris e T’Mannetje, 1964) de forma intercalada a cada 15 dias. Após esse período as plantas foram coletadas e foi realizado o isolamento das bactérias presente nos nódulos. Para isso, os nódulos foram lavados em etanol (70%, v/v - 1 min), para quebrar a tensão superficial, externamente desinfestados com peróxido de hidrogênio (30% - 3 min) e lavados cinco vezes com água destilada estéril. Os nódulos desinfestados foram esmagados em placas de Petri contendo meio extrato de levedura, manitol, ágar (YMA – Vincent, 1970) com vermelho congo como indicador. As placas de Petri foram incubadas a 28°C durante 7 dias, sendo realizadas observações diárias. Colônias com características típicas de rizóbios, sem ou com pouca absorção do indicador, foram transferidas para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador. Procedeu-se a purificação dos isolados e armazenamento em meio (YMA) sólido coberto com óleo mineral.

Os isolados foram caracterizados com base na análise de restrição do gene que codifica o RNA ribossomal amplificado (16S rDNA -ARDRA) (Laguerre et al., 1994) e pela amplificação de regiões genômicas flanqueadas por seqüências repetitivas no DNA (BOX-PCR) (Versalovic et al., 1994).

Para estas análises o DNA foi extraído de cada isolado utilizando o método CTAB. Inicialmente os isolados foram crescidos em meio líquido sob agitação orbital; após o crescimento, observado pela turbidez do meio, 1 mL foi coletado e centrifugado por 15 min a 8000 g; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de solução salina (NaCl 0,145 M) com agitação vigorosa em agitador tipo vortex por 1 min; novamente centrifugado por 15 min a 8000 g, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 500 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH8, sem adição de mercaptoetanol ou proteinase K). Após a incubação a 65°C por 60 min, 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados e o material centrifugado por 10 min a 16100 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados e o material centrifugado por 10 min a 16100 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 mL de isopropanol foi adicionado. Após incubação a -20°C durante uma noite o material foi centrifugado por 30 min a 16100 g. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado lavado com etanol. Para isso, adicionou-se 200 µL etanol 70% v/v, centrifugou-se por 5 min a 16100 g e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 200 µL etanol absoluto, centrifugou-se por 5 min a

16100 g e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi secado a temperatura ambiente e ressuspensionado em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores universais Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3') (Young et al., 1991). Nesta reação, com volume final de 50 µL, as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 200 µM de cada; MgCl₂ 3,0 mM; 0,25 µM de cada iniciador; 1,25 µL de Tween 2% e 1 U de DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase - Promega). Foram utilizados 50 ng DNA como molde. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff® seguindo os passos: 95°C por 2 min para desnaturação inicial; 30 ciclos de 93°C por 45 s para desnaturação; 62°C por 45 s para anelamento; 72°C por 2 min para extensão e 72°C por 5 min para extensão final.

Os produtos obtidos foram submetidos à clivagem com endonucleases *Hinf*I, *Msp*I e *Dde*I. Cada reação foi realizada separadamente, sendo que as reações de restrição foram preparadas utilizando um volume final de 15 µL. Utilizou-se 8 µL do produto de PCR; 1,5 µL do tampão (10X) específico de cada enzima, 4 U da enzima e o volume foi completado com água ultrapura. A mistura foi incubada durante 240 min a 37°C e durante 15 min a 65°C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (3%, p/v) por 150 min a 85V.

Como a reação de BOX-PCR é realizada utilizando apenas um iniciador, onde este funciona como senso e antisenso faz-se necessário uma padronização das condições de reação para que se obtenha resultados que apresentem nível satisfatório de reprodutibilidade. Para isso, foram realizados alguns testes com a finalidade de compreender o comportamento da reação nas condições da Embrapa Agrobiologia. Estes testes objetivaram avaliar possíveis variações nos perfis de bandas quando há alteração nas quantidades de DNA molde, preparação de misturas para reações em momentos diferentes e quando se utilizam termocicladores diferentes. Foram testadas duas quantidades de DNA (25 e 50 ng) e dois termocicladores modelo MJ MiniTM 48 Well Gradient Thermal Cycler da marca BIO RAD, sendo que para cada termociclador foi preparada uma nova mistura de reagentes e um segundo teste para avaliar possíveis alterações nos perfis de bandas quando as misturas de reagentes foram preparadas em momentos diferentes, utilizando dessa vez um número maior de isolados.

Após os testes as reações de BOX-PCR, para comparação dos isolados, foram realizadas segundo descrito em (Kaschuk et al., 2006) empregando 50 ng de DNA molde e o iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994). Nesta reação, com volume final de 25 µL, as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 300 µM de cada; MgCl₂ 3,0 mM; 2,0 µM do iniciador; 0,625 µL de tween 20% e 1 U de DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase - Promega). A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff® seguindo os passos: 94°C por 7 min para desnaturação inicial; 34 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação; 53°C por 1 min para anelamento; 65°C por 8 min para extensão e 65°C por 15 min para extensão final. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (1,5%, p/v) por 360 min a 65V.

2.3 - Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores obtidos nas análises químicas de terra são expressos como média e desvio padrão. Os perfis de bandas obtidos com os isolados de rizóbios para as análises de ARDRA e BOX-PCR foram analisados pelo programa GelComparII (Applied Maths). Para isso, as imagens dos géis foram importadas, os géis normalizados, as bandas assinaladas e, posteriormente, dendrogramas de similaridade foram construídos utilizando o índice de

similaridade de Jaccard para a construção da matriz de similaridade e o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para o agrupamento das amostras.

De posse dos dendrogramas de similaridade assinalou-se, baseado na monofilia dos agrupamentos, diferentes grupos de isolados. Estes grupos foram utilizados como unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para o cálculo da riqueza de UTOs, dos valores dos índices de diversidade de Shannon-Wiener, de equitabilidade de Pielou e de dominância de Simpson, bem como, para análise de rarefação para cada amostra de terra coletada.

O índice de Shannon-Wiener mede o grau de incerteza em prever a qual espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon-Wiener, menor o grau de incerteza e, portanto, menor é a diversidade da amostra. O índice de equitabilidade de Pielou é um índice de uniformidade, que se refere ao padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies. O índice de Simpson é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

A análise de rarefação, realizada no programa Estimates, versão 8.0 (Colwell, 2010), conforme Magurran (1987) permitiu a construção de curvas com a variação do índice de Shannon em função do número de isolados de cada área analisada. Neste caso, o programa seleciona os isolados ao acaso compondo amostras que possuem desde 1 até o número máximo de isolados da área, então para cada amostra é calculado um valor de Shannon-Wiener.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Análise Química das Amostras de Terra

De maneira geral, foi observada grande variação nos resultados das análises de solo entre as diferentes amostras de terra (Tabela 1) e pôde-se observar que as áreas amostradas apresentam solo de baixa fertilidade química, algumas com elevados valores de alumínio. De certo modo estes resultados já eram esperados uma vez que essas áreas estão passando por processo de revegetação, iniciado recentemente, com objetivo de alcançar a recuperação.

Tabela 1: Características químicas das 40 amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas sobre estéril de mineração; das duas amostras de terra coletadas em áreas revegetadas sobre os tanques de deposição de rejeito de mineração e de uma amostra de terra coletada em área de Floresta Primária no município de Porto Trombetas-PA.

Parcela	pH em água	Al	Ca+MG			P	K	C	MO
			molc dm ⁻³						
1981A1	5,2	1,3	0,7	0,4	0,3	4,7	60	2,85	4,91
1982A1	4,7	1,4	0,2	0,1	0,1	5,8	40	2,1	3,62
1982A2	4,8	1,1	0,4	0,2	0,2	2,1	39	0,66	1,14
1983A1	5,1	1,3	0,3	0,1	0,1	2,7	38	2,55	4,4
1983A2	5,2	0,4	1,7	1,3	0,4	2	58	1,92	3,31
1984A1	4,9	1	1,2	0,7	0,5	8,1	30	2,16	3,72
1984A2	4,9	1	1,5	1,1	0,4	1,8	45	2,43	4,19
1985A1	5,1	1	2,3	1,8	0,5	2,8	53	2,76	4,76
1985A2	4,7	1,5	0,5	0,3	0,3	6	51	2,43	4,19
1986A1	4,5	1,2	1,3	1	0,3	1,7	44	2,61	4,5
1986A2	4,7	1,1	1,6	0,9	0,7	5,2	36	2,82	4,86
1987A2	4,5	1,7	1,1	0,6	0,4	5	37	3,09	5,33
1992A1	4,9	0,6	2,3	1,7	0,7	5	42	2,04	3,52
1992A2	4,4	1,4	0,8	0,4	0,3	3,9	25	2,31	3,98
1993A1	4,5	1,3	1,1	0,7	0,4	3	44	2,25	3,88
1993A2	4,6	1,7	0,3	0,1	0,1	2,8	39	2,19	3,78
1994A1	4,4	1,6	0,5	0,3	0,3	3,8	35	2,31	3,98
1995A1	5,1	1,4	0,2	0,1	0,1	2,8	21	1,77	3,05
1995A2	4,5	1,6	0,3	0,2	0,2	4,6	38	2,31	3,98
1996A3	4,6	1,2	0,1	0	0	2,8	15	0,48	0,83
1996A13	4,7	1,4	0,1	0	0,1	3,1	19	1,65	2,84
1997A1	4,6	1,4	0,2	0,1	0,1	3,7	21	1,62	2,79
1997A2	4,4	1,3	0,1	0	0,1	4	16	1,32	2,28
1998A1	4,5	0,9	0,2	0,1	0,1	3,3	11	0,99	1,71
1998A2	4,5	1,1	0,2	0,1	0,1	2,8	9	1,02	1,76

continuação:

Parcela	pH em água	Al	Ca+MG			P	K	C	MO
			Ca	Mg					
			$\mu\text{molc dm}^{-3}$	mg dm^{-3}			%		
1999A1	4,7	0,9	0,2	0,1	0,1	4,4	12	1,05	1,81
1999A2	4,6	0,9	0,1	0	0,1	3,7	12	1,05	1,81
2000A1	4,5	0,9	0	0	0	2,8	1	0,3	0,52
2000A2	4,7	0,7	0,1	0,1	0	3,1	4	0,69	1,19
2001-1	4,4	1,4	0,2	0,1	0,1	5,5	24	2,19	3,78
2001A1	4,5	1	0,4	0,3	0,1	4,2	9	1,44	2,48
2001A2	4,5	1,1	0,3	0,1	0,2	4,6	14	1,38	2,38
2002A1	4,6	1	0,4	0,3	0,1	3,4	8	0,9	1,55
2002A2	4,8	0,7	0	0	0	3,1	3	0,72	1,24
2002-1	4,5	1,2	0,1	0,1	0	3,8	7	1,2	2,07
2003-2	4,6	1	0,1	0,1	0	3,4	4	0,99	1,71
2003-FP	4,7	0,9	0,5	0,4	0,1	3,7	8	1,5	2,59
2004-FP	4,9	0,6	1,8	1,4	0,4	4,2	18	2,1	3,62
2005-1	4,8	0,9	0,9	0,7	0,2	4,2	13	1,29	2,22
2006-1	4,6	1,2	0,2	0,2	0	8,3	9	1,32	2,28
Rejeito 1	5,2	0,1	0	0	0	3,1	1	0,12	0,21
Rejeito 2	5,7	0	0,3	0,2	0,1	3,9	1	0,09	0,16
Floresta-1	4	1,8	0,4	0,2	0,2	7,1	28	2,22	3,83

3.2 - Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas em Leguminosas

A partir do experimento implantado em condições de casa de vegetação, 695 isolados foram obtidos (Figura 2), sendo que o número de isolados para as diferentes parcelas variou entre zero (1993A1) e 26 (2003 FP), com uma média de aproximadamente 16 isolados por parcela amostrada.

Todos estes isolados foram obtidos de nódulos radiculares de siratro, uma vez que, no momento da coleta (90 dias após plantio) não foi observado nodulação na espécie de mimosa utilizada. Alguns trabalhos têm demonstrado que espécies pertencentes ao gênero *Mimosa* apresentam especificidade por isolados de rizóbio pertencentes à subdivisão beta de proteobacteria, notadamente isolados do gênero *Burkholderia* (Chen et al., 2005; Reis Júnior et al., 2010) e necessitam também da associação com fungos micorrízicos arbusculares para que ocorra a nodulação. A ausência ou a baixa densidade de células de beta-rizóbio nas áreas amostradas, bem como a ausência de fungos micorrízicos arbusculares nos vasos tipo “Leonard” utilizados nesse experimento, podem ser possíveis explicações para a ausência de nodulação em mimosa da canga. Por outro lado, a maior parte das plantas de siratro apresentou nodulação, demonstrando que a densidade de células de rizóbio presente no inóculo utilizado foi suficiente para induzir a nodulação em plantas de siratro. De fato, essa espécie tem sido utilizada em vários estudos que objetivam acessar a diversidade de isolados de nódulos em diferentes ecossistemas (Jesus et al., 2005a; Lima et al., 2009).

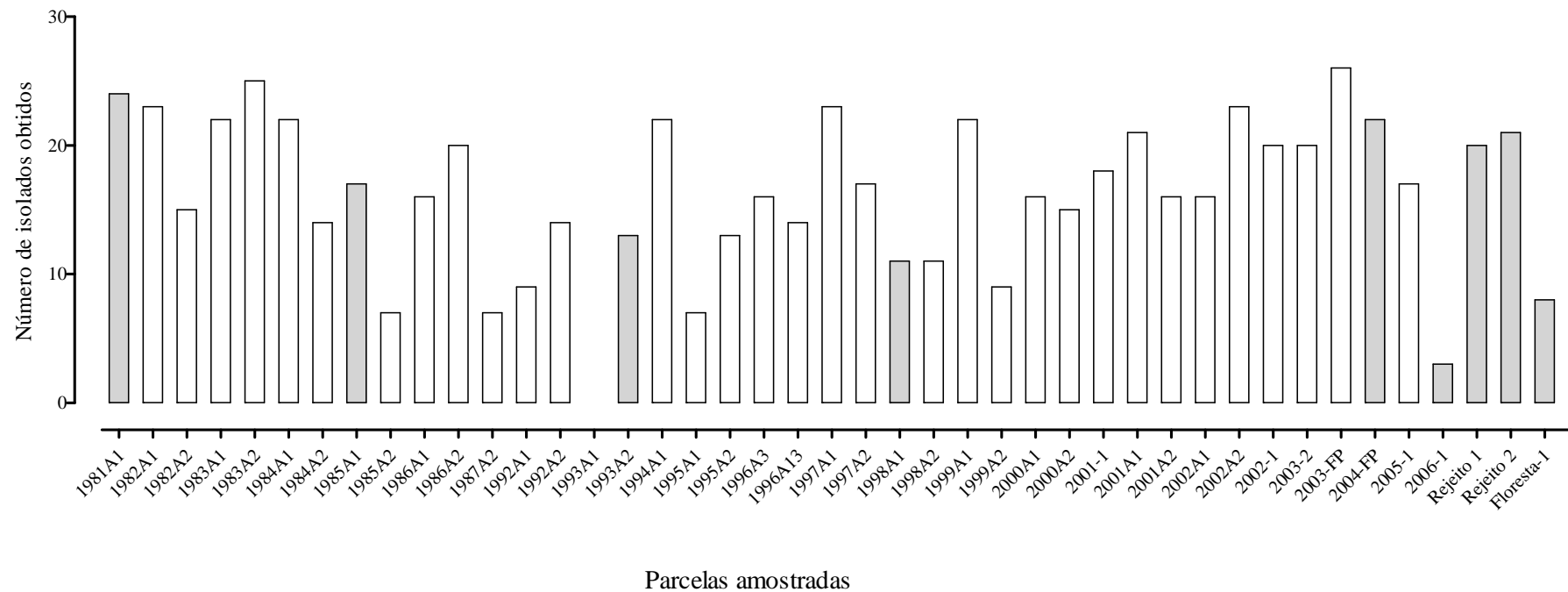


Figura 2: Número de isolados de nódulos de siratro obtidos para cada uma das parcelas revegetadas amostradas nas áreas de mineração de bauxita, nos diferentes anos (1981 a 2006), bem como para as parcelas revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* (Rejeito 1 e Rejeito 2) e para a parcela sob Floresta. As colunas marcadas em cinza referem-se às parcelas que tiveram os isolados selecionados para as análises moleculares.

Dentre os isolados capturados, 139 obtidos das parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1988A1, 2004-FP, 2006-1, Rejeito 1 e Rejeito 2 e Floresta foram selecionados para a análise da diversidade por genética. Como o número de isolados obtido foi elevado, priorizou-se os isolados de amostras de terra coletadas em áreas que foram revegetadas em anos que representam o início, meio e final da cronosequência e os obtidos das amostras de terra coletadas nas áreas de plantio de *Acacia mangium* nos tanques de deposição de rejeito (Rejeito 1 e Rejeito 2) e Floresta. Estes últimos foram utilizados com a finalidade de realizar comparações com as parcelas revegetadas em diferentes anos.

Dos 139 isolados inicialmente selecionados, dois não cresceram em meio de cultivo após o período de armazenamento em meio sólido coberto com óleo mineral e foram excluídos das análises (1 de 2004-FP e 1 de P).

Nos géis preparados para verificação do produto de amplificação por PCR do gene 16S rDNA pôde-se observar um único fragmento de aproximadamente 1500 pb, correspondente ao gene 16S rDNA. Para dois isolados da parcela N não foi obtido produto de PCR de qualidade suficiente para realizar a restrição do gene 16S rDNA, mesmo após purificação do produto de extração, e esses também foram excluídos da análise de restrição. Assim, o produto de PCR foi obtido para os 135 isolados, o qual foi então digerido com as endonucleases de restrição *Hinf* I, *Msp* I e *Dde* I, que foram selecionadas em trabalhos prévios como adequadas para separar os isolados de rizóbio (Teixeira et al., 2010). Na Figura 3 apresenta-se os perfis de restrição obtidos, com as três enzimas utilizadas no estudo, para 25 dos 139 isolados analisados. Com base nos perfis de restrição os isolados foram agrupados em um dendrograma de similaridade (Figura 4).

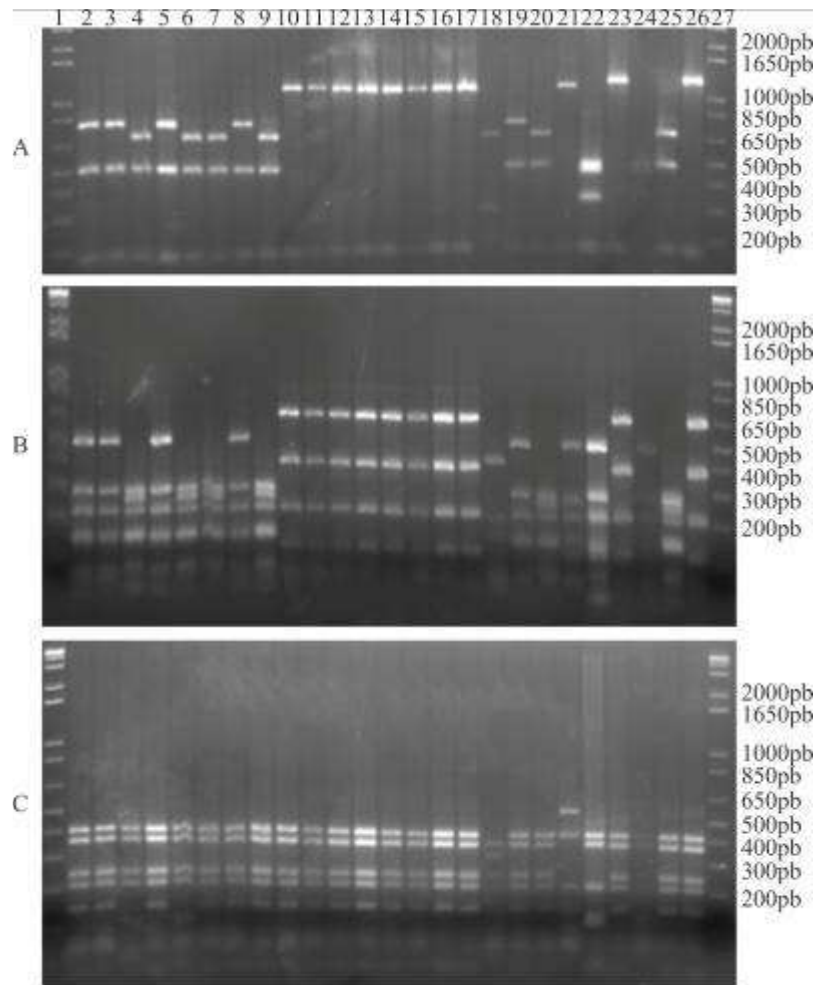


Figura 3: Géis de agarose mostrando o produto da restrição do gene 16S rDNA com as endonucleases de restrição *HinfI* (A), *MspI* (B) e *DdeI* (C). 1- Marcador de peso molecular 1 kb plus ladder; 2- Isolado 64-2; 3- Isolado 64-3; 4- Isolado 64-4; 5- Isolado 64-5; 6- Isolado 64-6; 7- Isolado 64-7; 8- Isolado 64-8; 9- Isolado 64-9; 10- Isolado 67-1; 11- Isolado 67-2; 12- Isolado 67-3; 13- Isolado 67-4; 14- Isolado 67-5; 15- Isolado 67-6; 16- Isolado 67-7; 17- Isolado 67-8; 18- Isolado 73-1; 19- Isolado 73-2; 20- Isolado 73-3; 21- Isolado 73-4; 22- Isolado 73-5; 23- Isolado 73-6; 24- Isolado 73-7; 25- Isolado 73-8; 26- Isolado 73-9 e 27- Marcador de peso molecular 1 kb plus ladder. Os isolados 64-2; 64-3; 64-4; 64-5; 64-6; 64-7; 64-8 e 64-9 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada Rejeito 1; os isolados 67-1; 67-2; 67-3; 67-4; 67-5; 67-6; 67-7 e 67-8 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada 1993A2 e os isolados 73-1; 73-2; 73-3; 73-4; 73-5; 73-6; 73-7; 73-8 e 73-9 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela revegetada 1981A1.

Com base nos agrupamentos visualizados no dendrograma os isolados foram distribuídos em 25 diferentes grupos genotípicos (linhas mais espessas na Figura 4, Tabela 2). Para a definição dos grupos, foi considerada a característica de monofilia dos diferentes ramos. A abundância de isolados de cada parcela em cada grupo genotípico foi utilizada para determinação da riqueza de grupos e para o cálculo de índices de diversidade, dominância e equitabilidade, possibilitando comparações entre as parcelas.

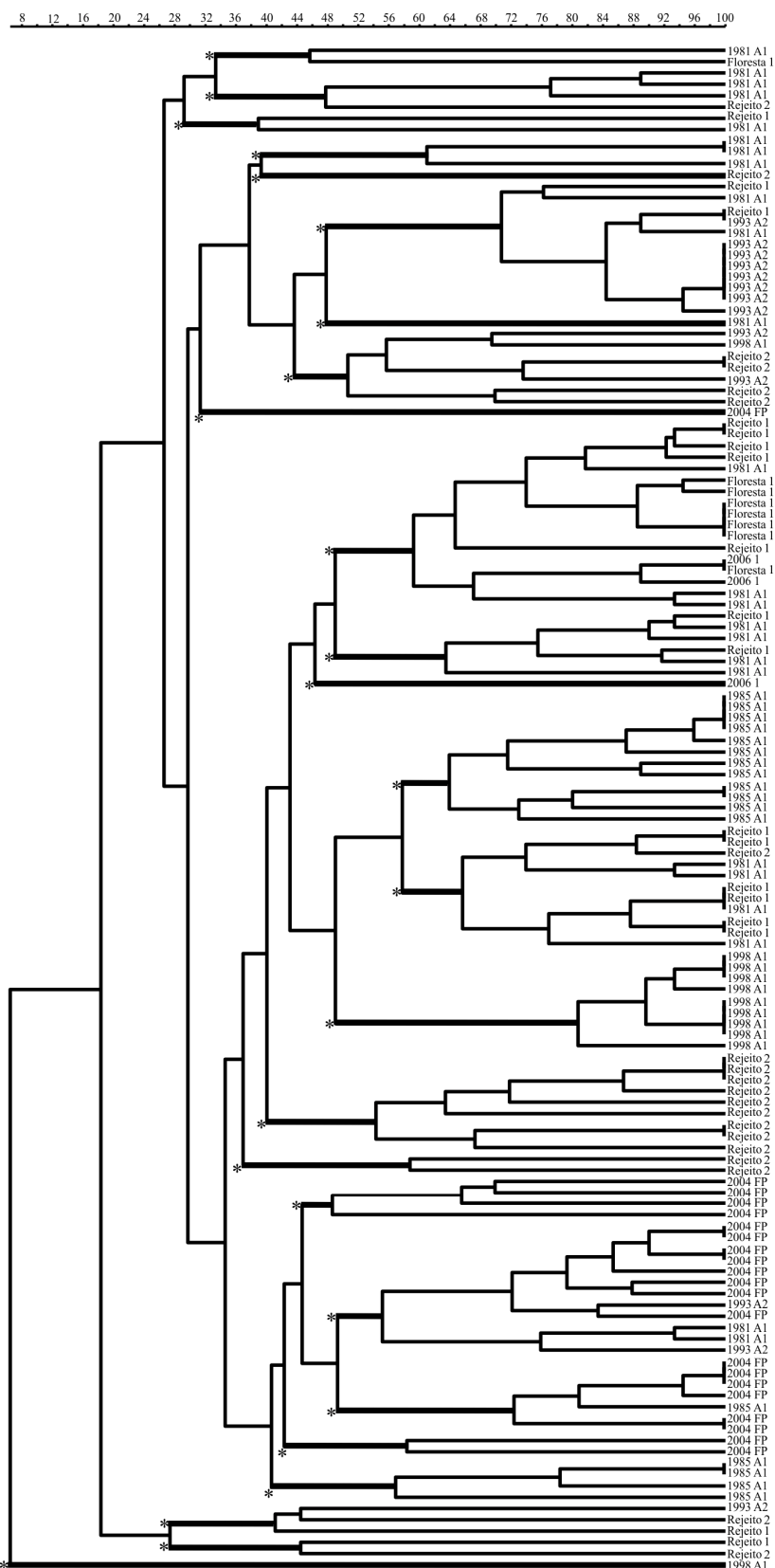


Figura 4: Dendrograma de similaridade genética construído com o índice de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados analisados pela restrição do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (ARDRA).

Tabela 2: Distribuição do número de isolados nos diferentes grupos separados pela análise de restrição do gene 16S rDNA (ARDRA), para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2.

Parcela\Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Riqueza*	
1981A1	1	3	1	3		2	1			3	4			4					2								10
1985A1													12								1		4				3
1993A2						8		2											2				1				4
1998A1								1							9										1		3
2004FP									1										4	8	6	2					5
2006-1										2		1															2
Floresta-1	1										7																2
Rejeito 1			1			2				5	2			6									1	1			7
Rejeito 2		1			1			4						1		9	2						1	1			8

* Número de grupos (Unidades taxonômicas Operacionais - UTOs) ocupados pelos isolados de cada parcela.

A ARDRA foi inicialmente proposta como sendo ferramenta útil para rápida identificação do posicionamento taxonômico de isolados de rizóbio, por ser baseada na restrição de um gene que codifica para um RNA ribossomal, permitindo a separação em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie, sendo utilizada com essa finalidade principalmente em situações onde o sequenciamento do gene 16S não pode ser realizado (Laguerre et al., 1994; Zilli et al., 2004; Germano et al., 2006; Teixeira et al., 2010). Como os isolados aqui avaliados se distribuíram em 25 grupos, que apresentaram similaridade relativamente baixa (entre 30 e 60%), pode se inferir que diferentes espécies de bactérias capazes de induzir a formação de nódulos estejam presentes nestas áreas.

A diversidade de isolados também foi avaliada por meio da amplificação com o iniciador BOXAIR. Esta ferramenta molecular permite a avaliação de várias regiões genômicas simultaneamente, identificando variabilidade intra-específica.

Na Figura 5 é apresentado o resultado do primeiro teste da reação de BOX. Pôde-se observar, além de perfis de bandas bastante complexos, boa reprodutibilidade destes para os isolados analisados. Quando se comparam os perfis obtidos para cada isolado nas duas quantidades de DNA testadas não se observou alterações, e não foi observada diferença para as diferentes reações com o isolado 03-2. Isso mostra que houve boa reprodutibilidade nas condições de trabalho no laboratório, entretanto, quando se compara os perfis de bandas obtidos para os mesmos isolados oriundos de reações processadas em termocicladores diferentes foi possível observar alterações significativas.

Analisando a Figura 6 pode-se observar, através das primeiras seis amostras, a variação nos perfis de bandas quando se realiza a reação em termocicladores distintos. Nota-se comparando os perfis de bandas das demais amostras, onde muda a mistura, que houve uma boa reprodutibilidade dos perfis. Neste teste, observou-se uma variação apenas para o isolado 107-2 que produziu menos bandas na reação com a mistura 2 (canaleta 17) quando comparado com o perfil da mistura 1 (canaleta 10). Provavelmente, esse foi um problema pontual, que ocorreu com a reação da segunda mistura (canaleta 17), pois o perfil observado para a amostra na 107-2 (canaleta 10) foi similar ao observado nas reações anteriores (canaleta 6). Estes resultados mostram que para obter o máximo de reprodutibilidade neste tipo de ensaio deve-se, sempre que possível, preparar uma única mistura de reagentes para a PCR para todos os isolados e, que principalmente, deve-se utilizar o mesmo termociclador para realização das análises.

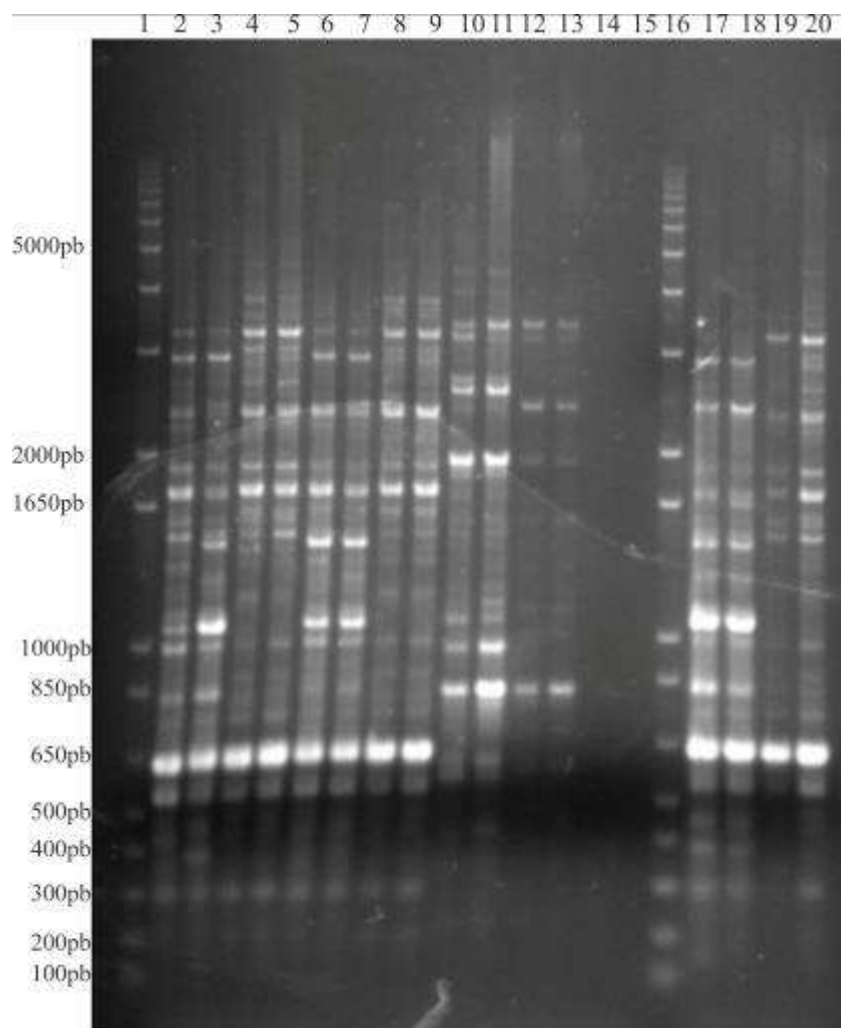


Figura 5: Gel de agarose mostrando os perfis de bandas obtidos, pela técnica de BOX-PCR, para três isolados testando-se as reações com os isolados de rizóbio com duas massas de DNA molde em dois termocicladores. 1- Marcador de peso molecular 1 kb; 2- isolado 03-2 25 η g termociclador 1; 3- isolado 03-2 50 η g termociclador 1; 4- isolado 03-2 25 η g termociclador 2; 5- isolado 03-2 50 η g termociclador 2; 6- isolado 03-6 25 η g termociclador 1; 7- isolado 03-6 50 η g termociclador 1; 8- isolado 03-6 25 η g termociclador 2; 9- isolado 03-6 50 η g termociclador 2; 10- isolado 107-2 25 η g termociclador 1; 11- isolado 107-2 50 η g termociclador 1; 12- isolado 107-2 25 η g termociclador 2; 13- isolado 107-2 50 η g termociclador 2; 14- controle negativo termociclador 1; 15- controle negativo termociclador 2; 16- Marcador de peso molecular 1 kb; 17- repetição do isolado 03-2 25 η g termociclador 1; 18- repetição do isolado 03-2 50 η g termociclador 1; 19- repetição do isolado 03-2 25 η g termociclador 2 e 20- repetição do isolado 03-2 50 η g termociclador 2. Os isolados 03-2; 03-6 e 107-2 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela 1981A1.

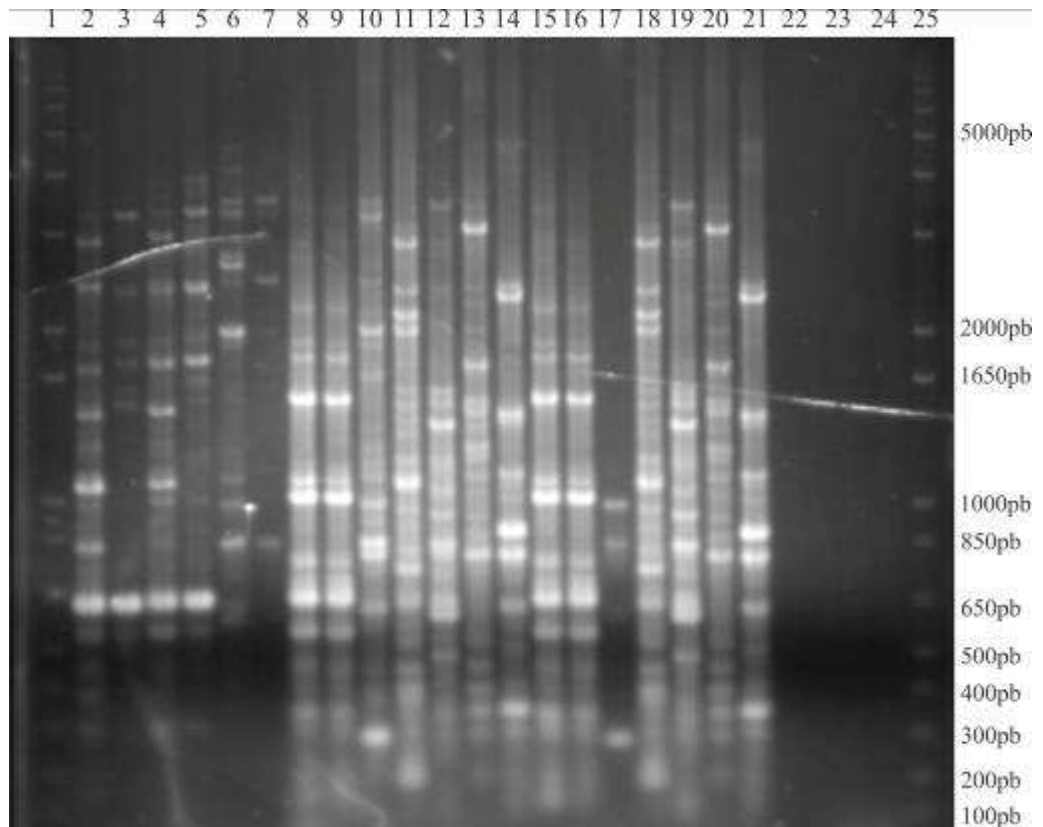


Figura 6: Gel de agarose mostrando os perfis de bandas obtidos, pela técnica de BOX-PCR, para sete isolados testando-se as reações em dois termocicladores e duas misturas de reagentes. 1- Marcador de peso molecular 1 kb; 2- isolado 03-2 25 η g termociclador 1; 3- isolado 03-2 25 η g termociclador 2; 4- isolado 03-6 25 η g termociclador 1; 5- isolado 03-6 25 η g termociclador 2; 6- isolado 107-2 25 η g termociclador 1; 8- isolado 107-2 25 η g termociclador 2; 9- isolado 03-2 25 η g termociclador 1 mistura 1; 10- isolado 03-6 25 η g termociclador 1 mistura 1; 11- isolado 23-4 25 η g termociclador 1 mistura 1; 12- isolado 121-8 25 η g termociclador 1 mistura 1; 13- isolado 128-8 25 η g termociclador 1 mistura 1; 14- isolado 48-1 25 η g termociclador 1 mistura 1; 15- isolado 03-2 25 η g termociclador 1 mistura 2; 16- isolado 03-6 25 η g termociclador 1 mistura 2; 17- isolado 23-4 25 η g termociclador 1 mistura 2; 18- isolado 121-8 25 η g termociclador 1 mistura 2; 19- isolado 128-8 25 η g termociclador 1 mistura 2; 20- isolado 48-1 25 η g termociclador 1 mistura 2; 21- controle negativo termociclador 1; 22- controle negativo termociclador 2; 23- controle negativo termociclador 1 mistura 1; 24- controle negativo termociclador 1 mistura 2 e 25- Marcador de peso molecular 1 kb. Os isolados 03-2; 03-6 e 107-2 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela 1981A1; os isolados 23-4; 48-1 e 128-8 foram isolados a partir da amostra de terra coletada na parcela Rejeito 2 e o isolado 121-8 foi isolado a partir da amostra de terra coletada na parcela Floresta-1.

Os perfis de bandas obtidos para os diferentes isolados pela técnica de BOX-PCR foram analisados e o dendrograma de similaridade foi elaborado. De forma similar à ARDRA, os isolados foram distribuídos em grupos genotípicos, com base na origem monofletica dos grupos, e estes foram utilizados para o cálculo da riqueza de grupos (linhas mais espessas na Figura 7, Tabela 3) e dos índices de diversidade referente a cada parcela revegetada aqui analisada.

Os isolados foram distribuídos em 25 grupos pela ARDRA e em 40 grupos pela análise de BOX-PCR. Por ARDRA mesmo quando se combinou os dados das três enzimas de restrição, 56 isolados posicionados em diferentes grupos genéticos ainda apresentaram 100% de similaridade, por outro lado, esse número foi de apenas 12 para a técnica de BOX-PCR. Isso se deve ao fato do gene 16S rDNA ser pequeno e apresentar regiões bastante conservadas, enquanto que a técnica de BOX avalia diferentes regiões que apresentam maior variabilidade no genoma simultaneamente. Estes dados mostram que a técnica de BOX foi mais discriminativa entre os isolados, evidenciando a aplicabilidade desta ferramenta para separar isolados que são taxonomicamente próximos, corroborando o observado por outros autores (Grange e Hungria, 2004; Alberton et al., 2006; Vargas et al., 2007; Stocco et al., 2008).

Por ser uma técnica com elevado poder de discriminação, a mesma é mais útil em estudos onde o objetivo é a comparação do nível de diversidade entre diferentes sítios. No presente estudo foram calculados os índices de diversidade com os dados de ARDRA e BOX. Observou-se que os resultados foram similares (Figura 8), contudo, a análise de rarefação (Figura 9) foi realizada somente com os dados da técnica de BOX, justamente por ter discriminado um número mais elevado de isolados.

Entre as áreas revegetadas, o nível de diversidade avaliado pela riqueza de UTOs, pelo índice de Shannon-Wiener e pela equitabilidade de Pielou foi mais elevado na área revegetada a mais tempo (1981A1) e diminuiu com o tempo, sendo menor na área revegetada a menos tempo (2006-1). A área revegetada 2006-1 apresentou o valor mais elevado para o índice de Simpson e o menor para o índice de Pielou o que revela dominância de poucas espécies na comunidade de isolados (Figura 8). As demais áreas apresentaram valores intermediários, sendo que a área revegetada em 2004 apresentou valor de riqueza por ARDRA e valores para os índices de Shannon-Wiener e Pielou mais elevados que o observado para as áreas revegetadas em 1993 e 1998 e valores próximos aos observados para a área de 1985.

Um coeficiente de correlação de -0,88 foi obtido quando se relacionou o tempo de revegetação a riqueza estimada pelo BOX-PCR, para as áreas revegetadas (1981, 1985, 1993, 1998, 2004 e 2006). Essa correlação evidencia o observado na Figura 8 que mostra o decréscimo de diversidade a partir das áreas revegetadas a mais tempo para as áreas revegetadas mais recentemente, revelando uma relação entre diversidade de isolados de nódulos e o tempo de revegetação das áreas antropizadas. Foi possível, concluir que as estratégias de revegetação utilizadas nessas áreas têm proporcionado o estabelecimento de comunidade de plantas capaz de sustentar o incremento de diversidade de isolados de nódulos com o passar do tempo.

Melloni et al. (2006) mencionam que estudos de diversidade de grupos-chave de microrganismos em áreas recuperadas são importantes, pois além de fornecerem indicativo do efeito de diferentes métodos de reabilitação sobre a diversidade desses microrganismos podem ainda prover o isolamento de estirpes eficientes com potenciais diversos.

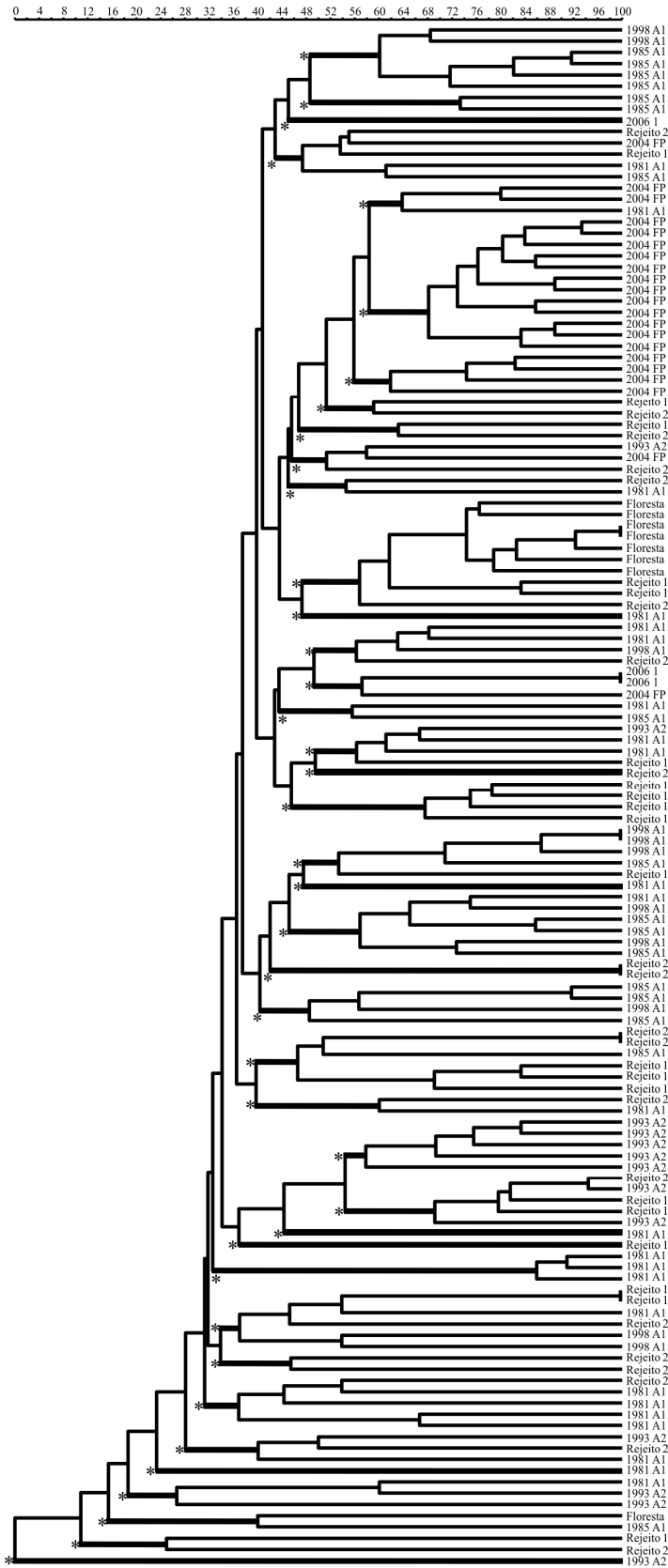


Figura 7: Dendrograma de similaridade genética construído com o índice de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados analisados pela técnica de BOX-PCR.

Tabela 3: Distribuição do número de isolados nos diferentes grupos separados pela técnica de BOX-PCR, para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2.

Parcela\Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1981A1				1	1						1		1	2		1	2				1	1
1985A1	4	2		1												1				1		3
1993A2										1								1				
1998A1	2													1						3		2
2004FP				1	2	12	4			1						1						
2006-1			1													2						
Floresta-1												7										
Rejeito 1				1				1	1			2					1		4	1		
Rejeito 2				1				1	1	1	1	1		1				1				

continuação:

Parcela\Grupo	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	Riqueza*
1981A1				1			1	3	1	4	1	1	1						17
1985A1		3	1													1			9
1993A2					5	2						1	2				1		7
1998A1		1							2										6
2004FP																			6
2006-1																			2
Floresta-1																1			2
Rejeito 1			3			2	1	2									1		12
Rejeito 2	2		2	1		1			1	2	1	1					1		17

* Número de grupos (Unidades taxonômicas Operacionais -UTOs) ocupados pelos isolados de cada parcela.

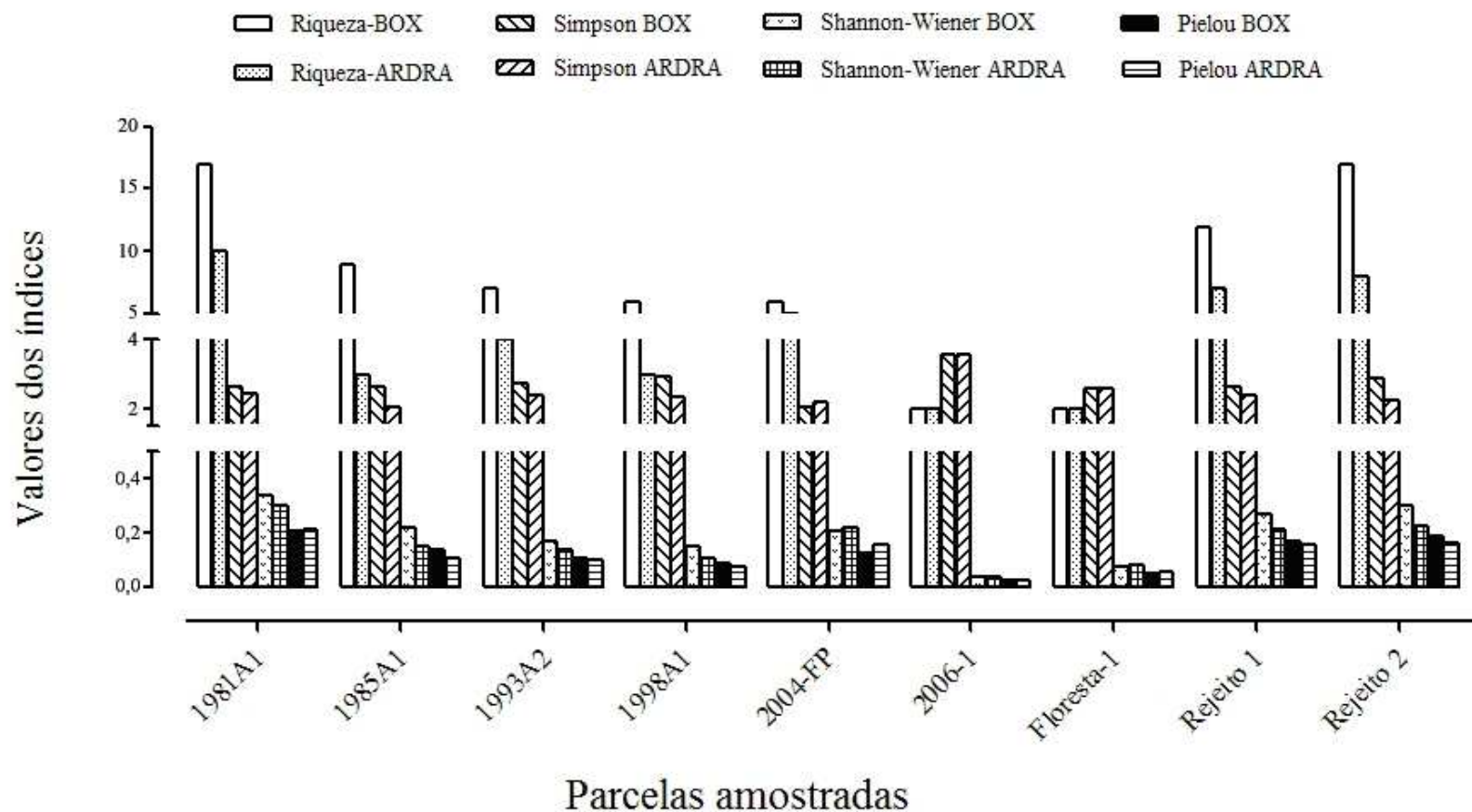


Figura 8: Riqueza de grupos genotípicos, valores dos índices de dominância de Simpson, de diversidade de Shannon-Wiener e de equitabilidade de Pielou observados para o grupo de isolados de rizóbio analisados pela restrição do gene 16S rDNA (ARDRA) e pela técnica de BOX-PCR para as amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 2 e Rejeito 2.

Comparando as áreas revegetadas com a área sob Floresta (Floresta-1) e com as duas áreas que foram revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* (Rejeito 1 e Rejeito 2) pôde-se observar que a área sob Floresta apresentou nível de diversidade menor que as áreas revegetadas, exceto para a área revegetada em 2006 e que as duas áreas sob plantio de *Acacia mangium* apresentaram nível de diversidade similar ao observado para a área revegetada em 1981.

As áreas revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* foram recuperadas a 17 anos (1993), nesse tempo as alterações ocasionadas pela cobertura da área com uma espécie da família das leguminosas possivelmente proporcionou a deposição de material vegetal sobre o solo que propiciou condições para o estabelecimento de comunidade diversa de isolados de nódulos, conforme encontrado nesse estudo. Maior diversidade de bactérias nodulíferas de leguminosas e fixadoras de nitrogênio (BNLFN) foi também encontrada em áreas revegetadas com as leguminosas bracinga e feijão-guandu após atividade de mineração (Melloni et al., 2006).

A capacidade de espécies de leguminosas colonizarem ambientes degradados é relatada na literatura (Franco e de Faria, 1997) e, tem sido relacionada não somente ao fato destas formarem associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio incorporando-o ao solo, mas também ao fato destas se associarem a fungos micorrízicos arbusculares. Isso favorece a nutrição de plantas e possibilita a captura mais eficiente de nutrientes. Como resultado do incremento de nitrogênio na biomassa e absorção de nutrientes importantes, como o fósforo, o plantio de leguminosas favorece a sucessão vegetal.

Baseado na análise de rarefação pôde-se observar, exceto para a área revegetada em 2006, estabilização dos valores do índice de Shannon-Wiener indicando que foi possível fazer estimativa acurada da diversidade de isolados de nódulos com o número de isolados obtidos. Para a área revegetada em 2006 o número de isolados obtidos foi baixo, o que comprometeu a estimativa da diversidade, que poderia ser mais elevada caso o número de isolados fosse maior, pois não foi possível perceber estabilização dos valores do índice de Shannon-Wiener (Figura 9).

Menor nível de diversidade de isolados de nódulos em áreas sob Floresta quando comparado com áreas sob cultivo ou capoeira também foram encontrados por outros autores (Jesus et al., 2005a; Lima et al., 2009; Melloni et al., 2006). No presente estudo o menor nível de diversidade na área sob Floresta foi confirmado pela análise de rarefação (Figura 9).

Jesus et al. (2005a) avaliando o efeito do tipo de uso da terra sobre a diversidade de isolados de nódulos capturados por siratro, observaram que a área sob cultivo de mandioca apresentou maior riqueza e diversidade que as áreas sob Floresta e cultivo de pupunha, que não diferiram entre si. Lima et al. (2009) também avaliando a comunidade de isolados de nódulos de siratro em áreas com diferentes tipos de uso na Floresta Amazônica observaram que a riqueza de isolados de nódulos na área sob floresta primária (PF) foi igual a 12, sendo o valor mais baixo entre as áreas analisadas. Os valores para as demais áreas foram 46 para área sob cultivo agrícola (AG), 48 em Agrofloresta (AF), 24 para área identificada como floresta secundária velha (OSF), 28 em floresta secundária nova (YSF) e 29 em área de pasto (PA).

Os dados apresentados nesse trabalho corroboram os resultados obtidos por Melloni et al. (2006) que observaram menor nível de diversidade de isolados de nódulos em áreas recém revegetadas, maior em áreas recuperadas com o cultivo de leguminosas e que a revegetação incrementa a diversidade deste grupo chave de microrganismos.

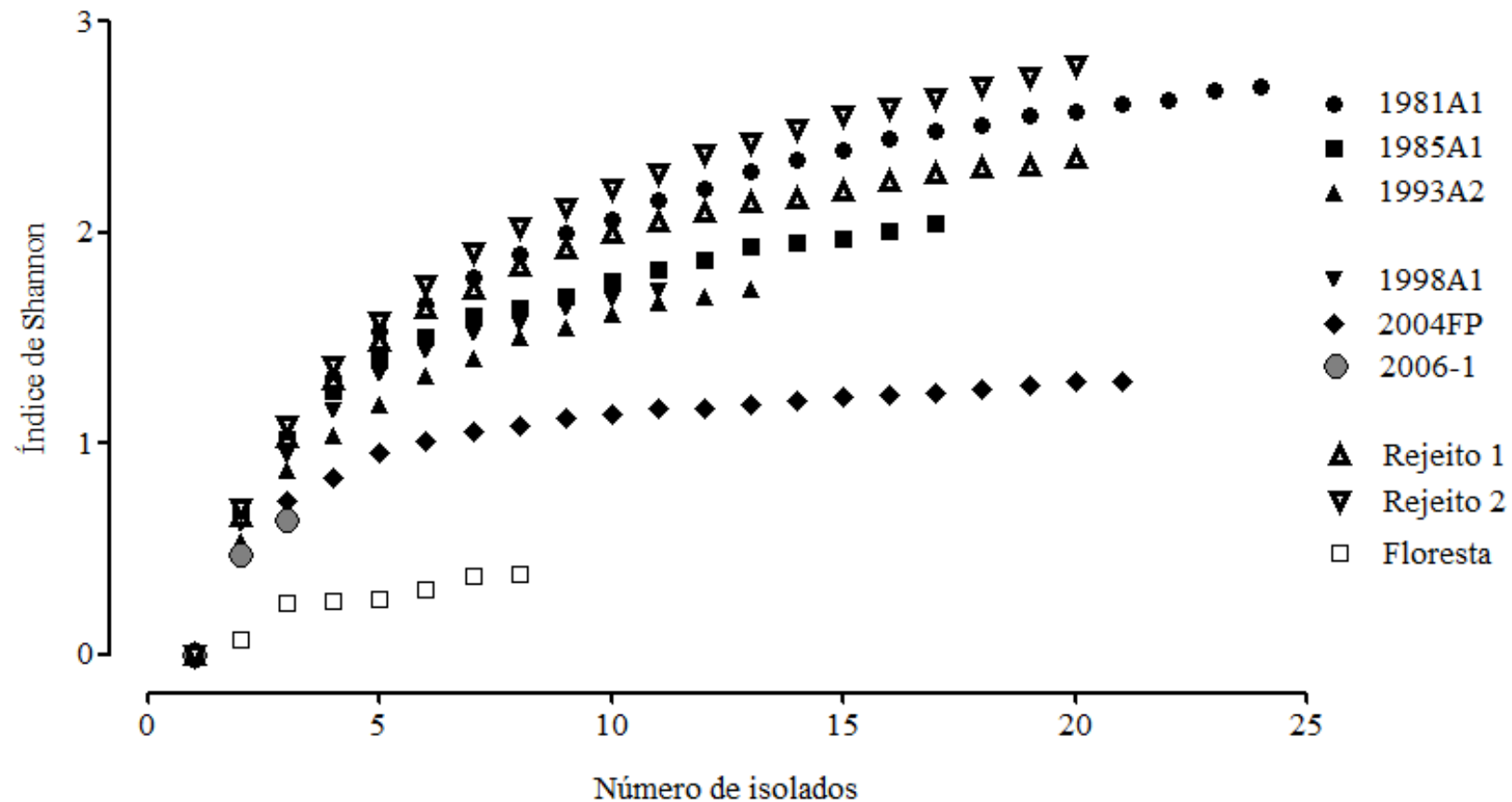


Figura 9: Variações dos valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener em função do número de isolados obtidos para as amostras de terra coletadas nas parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2, 1998A1, 2004FP, 2006-1, Floresta-1, Rejeito 1 e Rejeito 2. Estes dados foram obtidos pela análise de rarefação a partir da distribuição dos isolados nos grupos pela técnica de BOX-PCR.

4 - CONCLUSÕES

Obteve-se isolados de nódulos de siratro de todas as parcelas avaliadas, exceto da parcela A1 revegetada em 1993, a qual não promoveu a nodulação da planta iscca.

Nenhuma amostra de terra tomada nas áreas promoveu a nodulação de *Mimosa acutistipula*.

O aumento do tempo de revegetação proporciona incremento na diversidade de isolados de nódulos de siratro.

Áreas revegetadas a mais tempo mostram maiores índices ecológicos de riqueza, diversidade e equitabilidade de unidades taxonômicas operacionais.

A área sob Floresta apresenta menor nível de riqueza e diversidade que as áreas revegetadas, exceto quando comparada com a área revegetada a menos tempo (2006-1).

As áreas revegetadas a leguminosa *Acacia mangium* em 1993 apresentam riqueza e diversidade, similares à área revegetada em 1981.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são biotróficos obrigatórios que estabelecem relação simbiótica de natureza mutualística com a maioria das espécies de planta terrestres. Nesta simbiose o fungo fornece principalmente água e nutrientes às plantas e recebe fotoassimilados. A diversidade de FMAs afeta a competição e composição florística de uma área. Flutuação nas populações destes microrganismos pode acarretar flutuações nas populações de plantas. Neste cenário, a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares apresenta significativa importância para a manutenção da funcionalidade de ecossistemas naturais. Neste trabalho, avaliou-se por meio da identificação morfológica de esporos e por meio de ARDRA e DGGE o perfil da comunidade de FMAs em áreas com diferentes idades de revegetação. Neste levantamento 13 espécies de FMAs foram encontradas, sendo observado predomínio da espécie *Glomus macrocarpum*, tanto em relação à ocorrência quanto em relação ao número de esporos. Não foi observado relação entre a diversidade de FMAs e o tempo de revegetação das áreas, muito embora tenha sido observada redução da diversidade de FMAs nas áreas revegetadas após o ano de 2000. Foi possível detectar FMAs nas raízes através da PCR e, por meio de ARDRA e DGGE, observou-se perfis de bandas complexos. Os agrupamentos obtidos não apresentaram efeito do ano de revegetação. Como o nível de riqueza observado em cada parcela foi baixo e ocorreu predomínio de uma espécie de FMA pôde-se concluir que estas áreas ainda apresentam elevado grau de perturbação da comunidade de FMAs.

Palavras chave: PCR-RFLP. Simbiose. Sucessão. Levantamento.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligatory biotrophs that establish symbiotic relationship of evolutionary nature with approximately 80% of all terrestrial plant species. In this symbiosis the fungus mainly supplies water and nutrients to plants and receives photoassimilates. The AMF diversity affects both competition and floristic composition of an area. Fluctuations in the population of this group of microorganisms may cause fluctuations in plant populations above-ground. In this context, AMF diversity has significant importance for maintaining the functionality in natural ecosystems. In this work AMF community profile in areas with different ages of revegetation was evaluated by morphological identification of spores and both ARDRA and DGGE techniques. In this work, 13 AMF species were found and dominance of *Glomus macrocarpum* species was observed both as determined by occurrence measurements and by spore number counting. No relationship between arbuscular mycorrhizal fungi diversity and the revegetation time was observed in these areas, although a decrease in arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the degraded areas revegetated after the year 2000 was observed. It was possible to detect arbuscular mycorrhizal fungi in roots by PCR and a complex band profile was obtained by ARDRA and DGGE analyses. The clusters obtained showed no effect of revegetation time. As the richness level observed in each plot was low and there was predominance of one species of AMF, it might be concluded that these areas still present a high degree of disturbance.

Keywords: PCR-RFLP. Symbiosis. Succession. Survey.

1 - INTRODUÇÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são fungos do filo Glomeromycota, abundantes e diversos em solos e ocorrem na maioria dos ecossistemas vegetais terrestres (Stürmer e Siqueira, 2008; de Souza et al., 2008). Estes fungos são biotróficos obrigatórios e estabelecem relações simbióticas mutualísticas de natureza evolutiva com a maioria das espécies vegetais, agindo como uma extensão do sistema radicular das plantas. Como consequência das hifas funcionarem como prolongamento do sistema radicular, a associação micorrízica influencia a nutrição de plantas por meio de dois mecanismos básicos de ação, sendo a promoção do incremento de superfície de absorção e o aumento do volume de solo explorado pelo sistema radicular. Isto resulta em um incremento na absorção de nutrientes, especialmente daqueles que apresentam menor taxa de mobilidade no solo, como o fósforo, ou no incremento da absorção de água sob condições de estresse hídrico (Moreira e Siqueira, 2006). FMAs apresentam também efeito sinérgico sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em algumas interações triplas (fungo-planta-bactéria), incrementando a fixação pelo fato das leguminosas estarem mais bem nutridas quando em associação com FMAs ou quando estes influenciam no processo de infecção radicular (Jesus et al., 2005b).

Os efeitos benéficos dos FMAs para diferentes espécies vegetais são relatados na literatura tanto para culturas agrícolas como a mandioca (de Souza et al., 1999) como para espécies florestais como trema, fedegoso, aroeirinha e pau ferro (Siqueira e Saggin-Júnior, 2001; Santos, 2008). Mais recentemente o papel dos FMAs em ecossistemas complexos tem sido estudado. Siqueira et al. (1998), Zangaro et al. (2003; 2005; 2007; 2008) e Pouyu-Rojas et al. (2006) mostraram que existem diferenças no comportamento simbiótico, efeitos diferenciados de FMAs sobre plantas pertencentes a diferentes grupos sucessionais e a existência de especificidade funcional entre diferentes pares simbiotes, o que torna esse grupo de fungos de extrema importância para o manejo e conservação de ecossistemas complexos.

van der Heijden et al. (1998) e Santos (2008) conduziram experimentos onde avaliaram o efeito do incremento de riqueza de FMAs sobre diferentes comunidades de plantas. Os autores observaram que a diversidade e a produtividade do ecossistema aumentam com incremento no número de táxons de fungos micorrízicos, permitindo os autores concluir que a presença de fungos micorrízicos é requerida para manutenção de nível básico de diversidade de plantas e que baixa diversidade do fungo pode ocasionar flutuações na composição e estrutura das comunidades de plantas.

Com base nestes resultados está sendo atribuída importância adicional aos FMAs com relação à capacidade de estabelecimento de diferentes espécies vegetais em crescimento conjunto, principalmente em ambientes degradados. Evidenciando, dessa forma, que os FMAs apresentam papel importante para o estabelecimento e manutenção de comunidades vegetais complexas.

A diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em dado ecossistema pode ser acessada, principalmente, de duas formas. A primeira e, até o momento, a mais difundida, é por meio da identificação dos esporos produzidos por esses fungos com base em seus caracteres morfológicos. Compilando os trabalhos publicados até aquele momento, de Souza et al. (2008) citaram que os gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Scutellospora* são os que apresentam os maiores números de espécies descritas, com 107, 33 e 33, respectivamente, de um total de 205.

Stürmer e Siqueira (2008) resumiram os estudos realizados no Brasil avaliando a diversidade de FMAs por meio da identificação morfológica de esporos e listaram espécies de

FMA das famílias *Acaulosporaceae*, *Glomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Archeosporaceae* e *Paraglomeraceae*, como já tendo sido identificadas no Brasil.

Estes trabalhos revelam o esforço realizado para conhecer a diversidade de FMAs em ecossistemas brasileiros, entretanto, em função da diversidade de ecossistemas vegetais e de plantas potencialmente hospedeiras aos FMAs presentes no território pode-se afirmar que pouco se conhece da diversidade de espécies deste grupo de microrganismos em solos brasileiros.

Alternativamente, essa diversidade pode ser acessada por meio da utilização de ferramentas de biologia molecular. O emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de ecologia tem revolucionado as pesquisas nesta área. O isolamento e a caracterização de ácidos nucléicos permitem a identificação, sem necessidade de cultivo, de microrganismos diretamente do ambiente. Com isso é possível caracterizar a diversidade genética e a estrutura de comunidades de microrganismos que ocorre no solo ou associada às plantas. Neste caso, através da extração do DNA de amostra ambiental, que no caso de FMAs usa-se principalmente raízes colonizadas, com posterior amplificação deste DNA utilizando iniciadores desenvolvidos para amplificar o DNA desses fungos, pode se ter idéia da diversidade deste grupo.

Alguns autores propuseram a utilização de ferramentas de biologia molecular para acessar a diversidade de FMAs por meio da identificação dos ácidos nucléicos, sob a justificativa de que a população de esporos presentes no solo possa ter pouca relação com a população de FMAs colonizando as raízes. Neste caso, melhorias nestas técnicas podem proporcionar identificação direta da população de FMAs na planta (Husband et al., 2002a;b).

Para isso os fragmentos de DNA obtidos da comunidade de fungos colonizando as raízes, são analisados por meio de técnicas como ARDRA (Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – eletroforese em gel com gradiente desnaturante), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis – eletroforese em gel com gradiente de temperatura), ou T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo de comprimento dos fragmentos terminais de restrição). Essas ferramentas podem fornecer uma comparação do nível de diversidade entre amostras distintas e/ou, alternativamente, os fragmentos podem ser individualizados através do processo de clonagem. Após a clonagem, duas estratégias podem ser utilizadas. Primeiro, os fragmentos amplificados podem ser distribuídos em classes pelo padrão de restrição dos fragmentos individualizados (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição) e posteriormente, o sequenciamento fornecerá um discernimento da identidade dos clones. Admitindo que as classes sejam amplificadas e clonadas proporcionalmente, os números referentes à abundância de clones em cada classe podem então ser utilizados como uma estimativa da proporção destes nas raízes.

Por outro lado, os clones podem ser diretamente seqüenciados fornecendo estimativa da diversidade de FMAs nas amostras. O número de clones seqüenciados pode ser estabelecido pelos autores ou, de forma mais correta, estabelecido com base em curvas de saturação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), plotando número de clones seqüenciados contra o número de UTOs observadas.

Neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade de FMAs, utilizando a caracterização morfológica dos esporos obtidos a partir das amostras de terra, bem como, avaliar o perfil da comunidade de FMAs colonizando raízes das espécies *Visnia latifolia* (Lacre Vermelho) e *Cecropia hololeuca* (Embaúba) por meio das análises de ARDRA e DGGE, em áreas com diferentes idades de revegetação após a mineração de bauxita.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Área de Estudo e Coleta

A área de estudo e as amostras de terra coletadas para a extração de esporos foram as mesmas do estudo de diversidade de isolados de nódulos, descrito no Capítulo I (Itens 2.1 e 2.2). As amostras de terra, coletadas na profundidade de 0-20 cm, foram transportadas para o Laboratório de Leguminosas Florestais do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Embrapa Agrobiologia), secadas à temperatura ambiente e então usadas para a extração de esporos. Para coleta de raízes, destinadas às análises moleculares, plantas das espécies *Visnia latifolia* (Lacre Vermelho) e *Cecropia hololeuca* (Embaúba) foram amostradas em cada parcela. As amostras de raízes foram cuidadosamente coletadas a fim de evitar contaminação com raízes de outras espécies vegetais. O solo aderido às raízes foi eliminado e estas foram armazenadas em sacos plásticos fechados contendo sílica gel para desidratação. No laboratório de Leguminosas Florestais as raízes foram transferidas para tubos plástico tipo “Falcon” contendo etanol 80% (v/v) e estes armazenados a 4°C até a realização das análises.

2.2 - Avaliação da Diversidade de FMAs por Meio de Características Morfológicas dos Esporos

Os esporos foram extraídos de amostras de 50 mL de terra, por meio de peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose 45% (Jenkins, 1964). Os esporos foram contados e agrupados conforme características de tamanho e cor. Posteriormente, representantes de cada grupo de esporos foram montados em lâminas para microscopia onde se utilizou álcool polivinil em lactoglicerol (PVLG) e PVLG mais reagente de Melzer (1:1) como montantes.

A identificação das espécies de FMAs foi feita comparando a morfologia dos esporos com as descrições existentes em Schenck e Perez (1990) e no site da International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (<http://invam.caf.wvu.edu>).

2.3 - Avaliação da Diversidade de FMAs por Meio de ARDRA e DGGE

Para a extração do DNA, as raízes foram retiradas do álcool 80%, secadas em estufa a 65°C e maceradas em nitrogênio líquido. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial DNeasy Mini Plant Kit (marca Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. De posse do produto de extração, sequências específicas do gene 18S do RNA ribossomal (18S rDNA) dos FMAs foram amplificadas, em três reações de PCR, e analisadas meio de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e de eletroforese em gel de agarose após a restrição com endonucleases (ARDRA).

Na primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores AML1 (5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3') e AML2 (5'-GAACCAAACACTTTGGTTTCC-3') (Lee et al., 2008). O volume final da reação foi de 15 µL, e as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 200 µM de cada; MgCl₂ 1,625 mM; 0,2 µM de cada iniciador; 0,14 µg µL⁻¹ de BSA (albumina bovina sérica); 0,78% v/v de formamida e 1 U de DNA polimerase (GoTAq® Flexi DNA Polymerase - Promega). Foi utilizado como DNA molde 2 µL da diluição 1:20 do produto de extração. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff® seguindo os passos: 94°C por 3 min para desnaturação inicial; 30 ciclos de 94°C por 45 s para desnaturação; 58,5°C por 1 min para anelamento; 72°C por 55 s para extensão e 72°C por 5 min para extensão final.

O produto de PCR foi verificado em gel de agarose 1% (p/v). Para as amostras que sentaram bandas visíveis foi feita diluição de 1:1000 e para as outras diluição 1:500.

Posteriormente, foi realizada uma segunda reação com os iniciadores NS31 (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3', Simon et al., 1992) contendo o grampo de GC NS31GC (5'-CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3', Kowalchuk et al., 2002) e AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3', Helgason et al., 1998). Nesta reação, com volume final de 35 μL , as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 200 μM de cada; MgCl_2 2,5 mM; 0,2 μM de cada iniciador; 0,135 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA e 1 U de DNA polimerase (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase - Promega). Foi utilizado como DNA molde 2 μL da diluição do produto da primeira PCR. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff[®] seguindo os passos: 94°C por 3 min para desnaturação inicial; 34 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação; 60°C por 1 min para anelamento; 72°C por 1 min para extensão e extensão final a 72°C por 5 min.

Com o produto da segunda PCR procedeu-se a análise do perfil da comunidade de FMAs presentes nas amostras de raízes por meio da técnica de DGGE. Os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida 6% p/v (37,5:1 acrilamida:bis-acrilamida) com gradiente químico desnaturante, composto por formamida e uréia, variando de 30 a 45% (100% de desnaturante corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida), em TAE 0,5X a 60°C sob voltagem constante de 75 V durante 15 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV.

O DNA das amostras de raízes foi analisado pela restrição do gene 18S rDNA em gel de agarose (ARDRA). As amostras com amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1, usados para o DGGE, foram amplificadas com os iniciadores NS31 e AML3¹.

Para a terceira reação de amplificação com os iniciadores NS31-AML3, com volume final de 35 μL , as condições foram: Tampão 1X; dNTPs 200 μM de cada; MgCl_2 2,2 mM; 0,2 μM de cada iniciador; 0,135 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA e 0,75 U de DNA polimerase (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase - Promega). Utilizou-se como DNA molde, 2 μL da diluição do produto da primeira PCR com os iniciadores AML1-AML2. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff[®] seguindo os passos: 94°C e 3 min para desnaturação inicial; 2 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação; 60°C por 1 min para anelamento; 72°C por 1 min para extensão; 28 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação; 58°C por 1 min para anelamento; 72°C e 1 min para extensão e extensão final a 72°C por 5 min. Posteriormente, o produto desta PCR foi digerido com as endonucleases *HinfI*, *TaqI* e *Hsp29II*, conforme recomendações do fabricante e o produto da restrição separado em gel de agarose 3% (p/v) por 180 min a 60V.

2.4 - Tratamento Estatístico dos Dados

A frequência de ocorrência dos esporos de cada espécie de FMA foi usada para o cálculo da riqueza de espécies, os valores dos índices de dominância de Simpson, de diversidade de Shannon-Wiener e de equitabilidade de Pielou para cada amostra de terra.

Os perfis da comunidade de FMAs obtidos com os géis de DGGE e ARDRA foram utilizados para a construção de dendrogramas de similaridade entre as amostras. Para isso, as imagens dos géis foram utilizadas para normalização das eletroforeses, as bandas assinaladas e os dendrogramas de similaridade genética foram construídos utilizando o índice de similaridade de Jaccard para a construção da matriz de similaridade e o método UPGMA para o agrupamento. Para essas análises utilizou-se o programa GelCompar II (Applied Maths).

¹ A sequência do iniciador AML3 foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa coordenado pelo pesquisador JPW Young da Universidade de York e ainda não foi publicada.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Avaliação da Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares Pela Ocorrência de Esporos

Foi possível recuperar esporos e identificar as espécies de FMAs presentes em 41 das 43 amostras de terra analisadas. Para as amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas com *Acacia mangium* (Rejeito 1 e Rejeito 2) dentro dos tanques de rejeito, não foi observada a ocorrência de esporos.

Caproni et al. (2005) avaliaram a ocorrência e diversidade de esporos de FMAs em áreas de estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita em Porto Trombetas. Neste trabalho os autores identificaram um total de 18 espécies de FMAs pertencentes aos gêneros *Glomus* (7 espécies), *Acaulospora* (6 espécies), *Scutellospora* (2 espécies), *Archeospora*, *Entrophospora* e *Gigaspora* (1 espécie cada). Segundo estes autores a ocorrência das espécies de FMAs na forma de esporos pode ser influenciada pela composição de espécies de plantas, por fatores ambientais e edáficos, bem como, pela natureza da amostragem utilizada.

A ausência de esporos nas parcelas implantadas dentro dos tanques de deposição de rejeito revelam elevado grau de degradação, superior ao observado nas parcelas implantadas sob o substrato denominado estéril estudado por Caproni et al. (2005). Como um nível mínimo de diversidade de FMAs tem sido considerado de significativa importância para a manutenção de diversidade de plantas em uma área (van der Heijden et al., 1998) estratégias que aumentem a riqueza e o número de propágulos de FMAs nestas áreas devem ser estudadas.

Treze espécies distintas de FMAs foram encontradas, sendo que seis pertencem ao gênero *Glomus*, cinco ao gênero *Acaulospora*, uma ao gênero *Scutellospora* e uma ao gênero *Gigaspora* (Tabela 4 e Figura 10).

Caproni et al. (2003) realizaram coletas nos períodos seco e chuvoso em áreas revegetadas em diferentes épocas após a atividade de mineração de bauxita em Porto Trombetas e encontraram 57 espécies de FMAs, pertencentes a seis gêneros. O maior número de espécies identificadas em todas as áreas amostradas pertenceu ao gênero *Glomus*, seguido pelos gêneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e *Archeospora*, representando respectivamente 49%, 19%, 12%, 11%, 7% e 2% do total das espécies encontradas.

Tabela 4: Ocorrência, em relação ao número total de amostras de terra analisadas, número total de esporos e percentagem de esporos para cada espécie e para cada gênero de FMA, em relação ao total de esporos encontrados.

Espécies	Número de parcelas que houve ocorrência	Número total de esporos	Percentagem de esporos
<i>Glomus macrocarpum</i>	41	18605	96,65
<i>Glomus</i> sp1	7	66	0,34
<i>Glomus fasciculatum</i>	5	103	0,53
<i>Glomus etunicatum</i>	3	12	0,06
<i>Glomus clarum</i>	1	5	0,03
<i>Glomus</i> sp2	1	5	0,03
Gênero <i>Glomus</i>	41	18796	97,64
<i>Acaulospora mellea</i>	12	110	0,57
<i>Acaulospora tuberculata</i>	7	92	0,48
<i>Acaulospora</i> sp	4	26	0,14
<i>Acaulospora foveata</i>	2	13	0,07
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	1	4	0,02
Gênero <i>Acaulospora</i>	20	245	1,28
<i>Scutellospora scutata</i>	12	184	0,96
Gênero <i>Scutellospora</i>	12	184	0,96
<i>Gigaspora margarita</i>	11	24	0,12
Gênero <i>Gigaspora</i>	11	24	0,12
Total Geral		19249	100

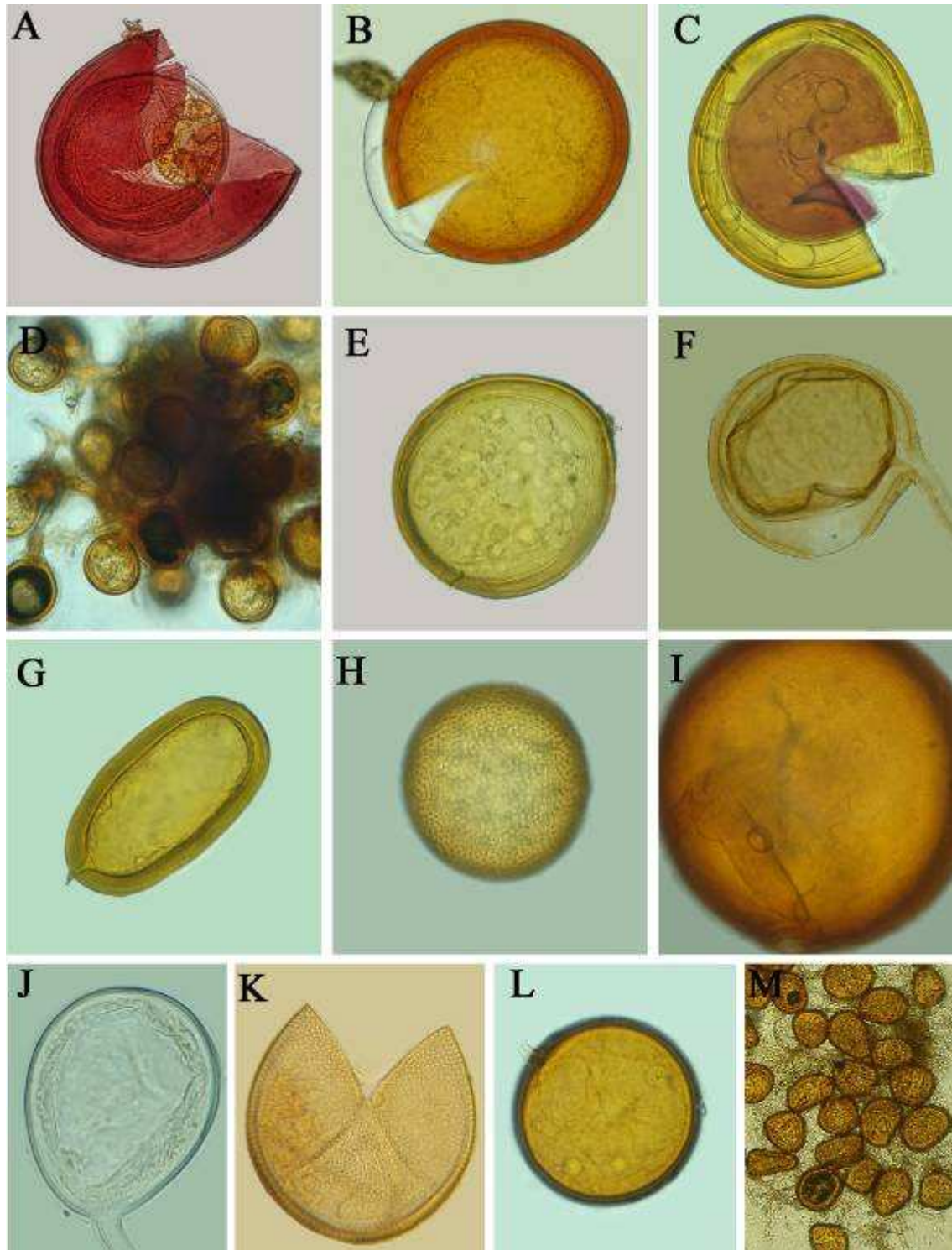


Figura 10: Esporos de fungos micorrízicos arbusculares identificadas nas parcelas avaliadas. (A) *Scutellospora scutata*; (B) *Gigaspora margarita*; (C) *Acaulospora mellea*; (D) *Glomus* sp1 (esporocarpo); (E) *Acaulospora* sp.; (F) *Glomus clarum*; (G) *Glomus macrocarpum*; (H) *Acaulospora foveata*; (I) *Acaulospora tuberculata*; (J) *Glomus* sp2; (K) *Acaulospora scrobiculata*; (L) *Glomus etunicatum* e (M) *Glomus fasciculatum*.

Objetivando avaliar o efeito da conversão de florestas tropicais em áreas de pastagens sobre a comunidade de FMAs Picone (2000)² avaliou por meio da morfologia de esporos a diversidade de FMAs em sítios da Nicarágua e Costa Rica. Neste trabalho considerando todas as amostras, 28 morfo-espécies distintas foram identificadas. Destas, 12 foram classificadas como pertencentes à família *Acaulosporaceae*, 11 à família *Glomaceae* e cinco à família *Gigasporaceae*. Considerando todas as espécies recuperadas neste estudo, foi observada maior abundância da espécie designada como *Glomus* “small brown” tanto nas áreas de floresta quanto nas áreas de pasto.

Guadarrama e Alvarez-Sánchez (1999) avaliaram a abundância de esporos e o número de espécies de FMAs em floresta tropical no México. Neste estudo os autores encontraram 16 morfo-espécies, sendo que 8 foram classificadas como *Glomus*, 3 como *Sclerocystis*, 3 como *Acaulospora* e 2 como *Gigaspora*. Lovelock et al. (2003) avaliando a comunidade de FMAs em áreas de floresta tropical na Costa Rica, sob vários aspectos, encontraram 13 “grupos taxonômicos” de FMAs. Destes, sete foram classificados como pertencentes ao gênero *Acaulospora*, com 96,8% dos esporos, dois ao gênero *Scutellospora*, três ao gênero *Glomus* e um ao gênero *Gigaspora*.

Leal et al. (2009) estudaram o efeito do sistema de uso da terra sobre a ocorrência e diversidade de FMAs em amostras de solo de áreas da região Amazônica brasileira. Neste trabalho os autores utilizaram da estratégia de cultivo armadilha para a obtenção dos esporos, com o objetivo de obter esporos de melhor qualidade para a identificação dos caracteres morfológicos. Foram montados vasos de cultivo utilizando ou as plantas *Sorghum sudanense* (também denominado de sorgo Sudão, capim Sudão e sorgo sudan) e *Vigna unguiculata* ou as plantas *Brachiaria decumbens* e *Neonotonia wightii* (*Neonotonia wightii* é uma leguminosa de origem Africana, utilizada em pastagens consorciadas conhecida como soja perene) e os autores conseguiram recuperar 24 espécies de FMAs. Considerando os dois pares de plantas armadilhas, foi observado que o número de espécies decrescia na seguinte ordem de gênero *Acaulospora*, *Glomus*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Archeospora*, *Scutellospora* e *Paraglomus*. As espécies *Acaulospora delicata*, *Acaulospora foveata*, *Entrophospora colombiana* e duas espécies de *Glomus* não descritas foram as mais abundantes e freqüentemente recuperadas nas culturas armadilhas.

O predomínio de espécies de FMAs pertencentes aos gêneros *Acaulospora* e *Glomus* observado nesse trabalho está de acordo com o observado em outros trabalhos realizados em diferentes ecossistemas. Entre as 205 espécies de FMAs descritas até o presente momento, 107 pertencem ao gênero *Glomus*, 33 ao gênero *Acaulospora* e 33 pertencem ao gênero *Scutellospora*, o que pode explicar em parte essa maior abundância das espécies destes gêneros nos estudos de avaliação da diversidade (de Souza et al., 2008). Este fato também pode estar relacionado com as características inerentes à estratégia de vida destas espécies. Espécies destes gêneros produzem esporos pequenos, de forma mais abundante e colonizam abundantemente as raízes, enquanto espécies de *Gigasporaceae*, por exemplo, produzem esporos maiores em menor quantidade, com colonização menos intensa (de Souza et al., 2005). Do ponto de vista evolutivo, isso não explica completamente a maior diversidade de um gênero quando comparado com outro, mas uma maior facilidade de acessar os esporos no

² Neste trabalho foi mantida a classificação taxonômica dos FMAs apresentada nos artigos citados, mantendo o nome científico da espécie e designação utilizada para a unidade taxonômica operacional, seja “espécie”, “morfo-espécie”, “morfo-tipo”, “grupos taxonômicos” ou “tipos fúngicos”. Ver de Souza et al. (2008), Oehl et al. (2008) e Morton e Msiska (2010) para uma atualizada classificação taxonômica dos FMAs.

solo pode ter influência sobre os resultados dos levantamentos de diversidade e sobre a descrição de espécies.

Dentre as 13 espécies identificadas neste trabalho observou-se predomínio bastante elevado de *Glomus macrocarpum* tanto, avaliando a frequência de ocorrência desta espécie nas diferentes amostras de terra, quanto em relação ao número total de esporos obtidos. *Glomus macrocarpum* somente não foi encontrado apenas nas duas amostras de terra em que não se obteve esporos e o número de esporos dessa espécie representou 96,65% dos esporos encontrados (Tabela 4 e Figura 11). *Scutellospora scutata*, *Acaulospora mellea* e *Gigaspora margarita* foram encontradas em aproximadamente 28% das amostras de terra, enquanto que *Glomus clarum*, *Glomus* sp2 e *Acaulospora scrobiculata* foram as espécies mais raramente encontradas, estando presente apenas em uma amostra cada.

Glomus macrocarpum foi a única espécie de FMA encontrada em oito das 43 amostras de terra avaliadas e proporcionalmente o número de esporos desta espécie representou, pelo menos 20% do total de esporos de cada amostra (Figura 11). Nos casos onde o percentual de esporos de *Glomus macrocarpum* foi menor, observou-se que nas parcelas 2004FP e 2006-1 o número de esporos da espécie *Acaulospora tuberculata* correspondeu a 39 e 34%, respectivamente, na parcela 2005-1 o número de esporos de *Scutellospora scutata* correspondeu a 80% e nas parcelas 2002-1 e 2002A1 o número de esporos da espécie *Acaulospora mellea* correspondeu a 22 e 21%, respectivamente.

Carrenho et al. (2001) avaliando o efeito do monocultivo de milho por três anos consecutivos sobre a composição da comunidade de FMAs observou que *Glomus macrocarpum* foi observada em 100, 90 e 60% das amostras, no primeiro, segundo e terceiro ano, respectivamente. No estudo desenvolvido por Caproni et al. (2003) o predomínio de *Glomus macrocarpum* também foi observado nas amostras avaliadas. Neste caso a frequência desta espécie foi de 93% tanto no período seco quanto no período chuvoso. Segundo os autores as elevadas frequência e densidade relativa observada para a espécie *Glomus macrocarpum*, indicam ampla faixa de adaptação, ressaltando que é importante conhecer mais detalhadamente a ecologia desta espécie, por apresentar potencial para o uso em programas de recuperação de áreas degradadas nos trópicos.

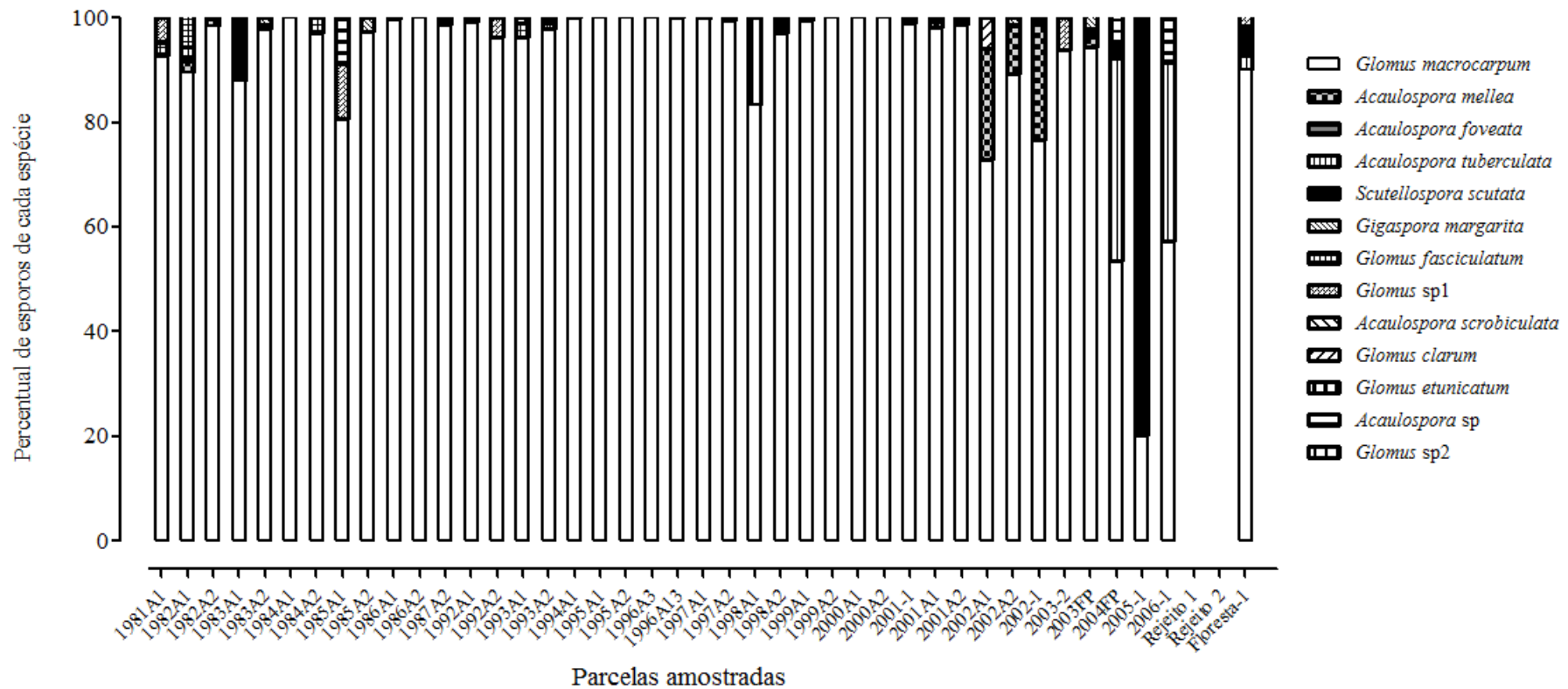


Figura 11: Distribuição percentual do número de esporos para as 13 espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas, em relação ao número total de esporos de cada parcela amostrada, para as 40 amostras de terra coletadas nas parcelas revegetadas sobre estéril de mineração, para as duas amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas sobre rejeito de mineração e para uma amostra de terra coletada em área de Floresta primária em Porto Trombetas.

Os resultados não permitem estabelecer seqüência ordenada com relação à dinâmica de ocorrência de diferentes espécies de FMA em função do tempo de revegetação, que poderia ser utilizada para elucidar o padrão de sucessão de espécies na comunidade de FMAs. Entretanto, embora a dominância de esporos da espécie *Glomus macrocarpum* tenha sido relativamente baixa nas parcelas 1983A1, 1985A1, 1998A1, observou-se que a redução de abundância desta espécie foi acentuada nas amostras de terra coletadas nas áreas revegetadas a menos tempo (Figura 11), especialmente para as amostras dos anos 2002, 2004, 2005 e 2006.

O número de esporos de cada espécie de FMA em cada ano foi utilizado para calcular os índices de diversidade (Figuras 12, 13, 14 e 15). Foi observado que a riqueza de espécies variou entre 0 e 6, sendo mais elevada na área de Floresta, na parcela 1982A2 (5 espécies em cada) e 1998A2 (6 espécies). Observou-se que a maior parte das parcelas (36 das 43) avaliadas apresentou baixo nível de riqueza de FMAs, onde no máximo três espécies distintas foram observadas. Em apenas sete parcelas o número de espécies de FMA foi igual ou maior que quatro. Não foi observada correlação entre o índice de Simpson e a riqueza de espécies de FMAs. Não foi possível observar variação relacionada ao tempo de revegetação pelos valores de riqueza e do índice de Simpson.

Por outro lado os índices de Shannon-Wiener e Pielou revelaram diferenças entre as amostras (Figura 14 e 15), provavelmente isso se deu pelo fato destes considerarem além da riqueza a frequência de cada espécie de FMA. Embora não tenha sido verificado elevado valor de correlação entre os valores dos índices de Shannon-Wiener e Pielou e o tempo de revegetação das parcelas, pôde-se observar redução dos valores destes índices para as áreas revegetadas mais recentemente.

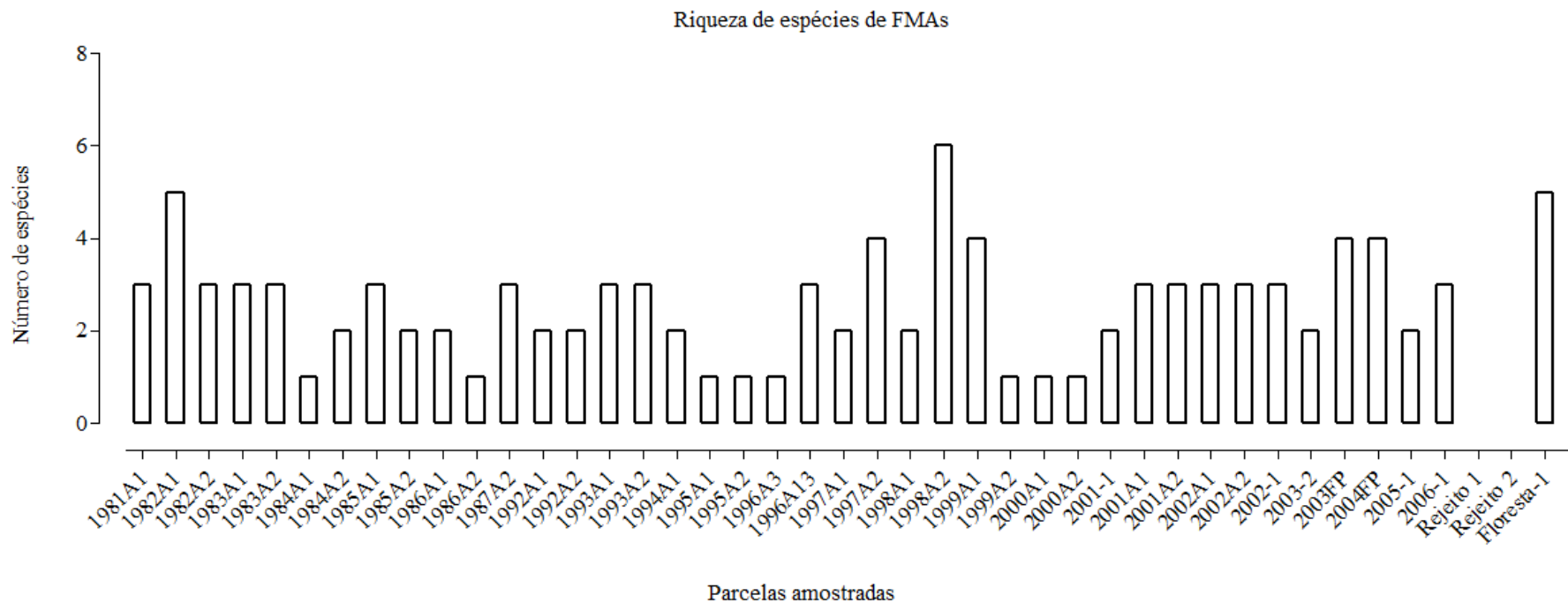


Figura 12: Riqueza de espécies observada para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA.

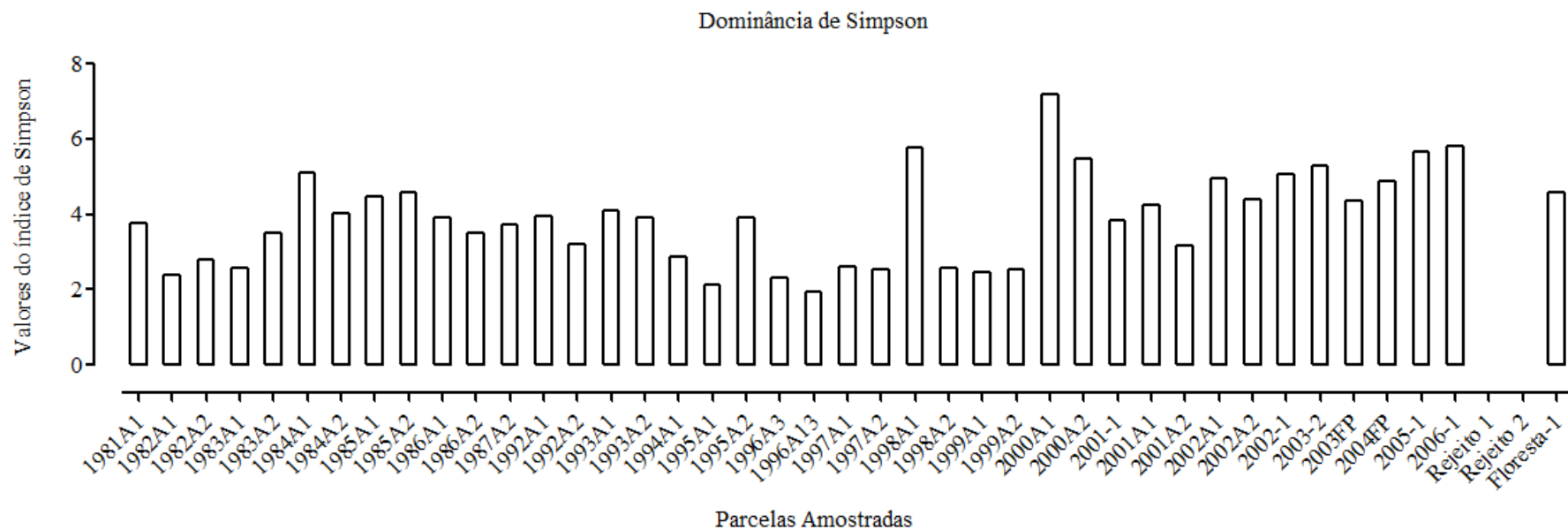


Figura 13: Valores do índice de dominância de Simpson observados para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA.

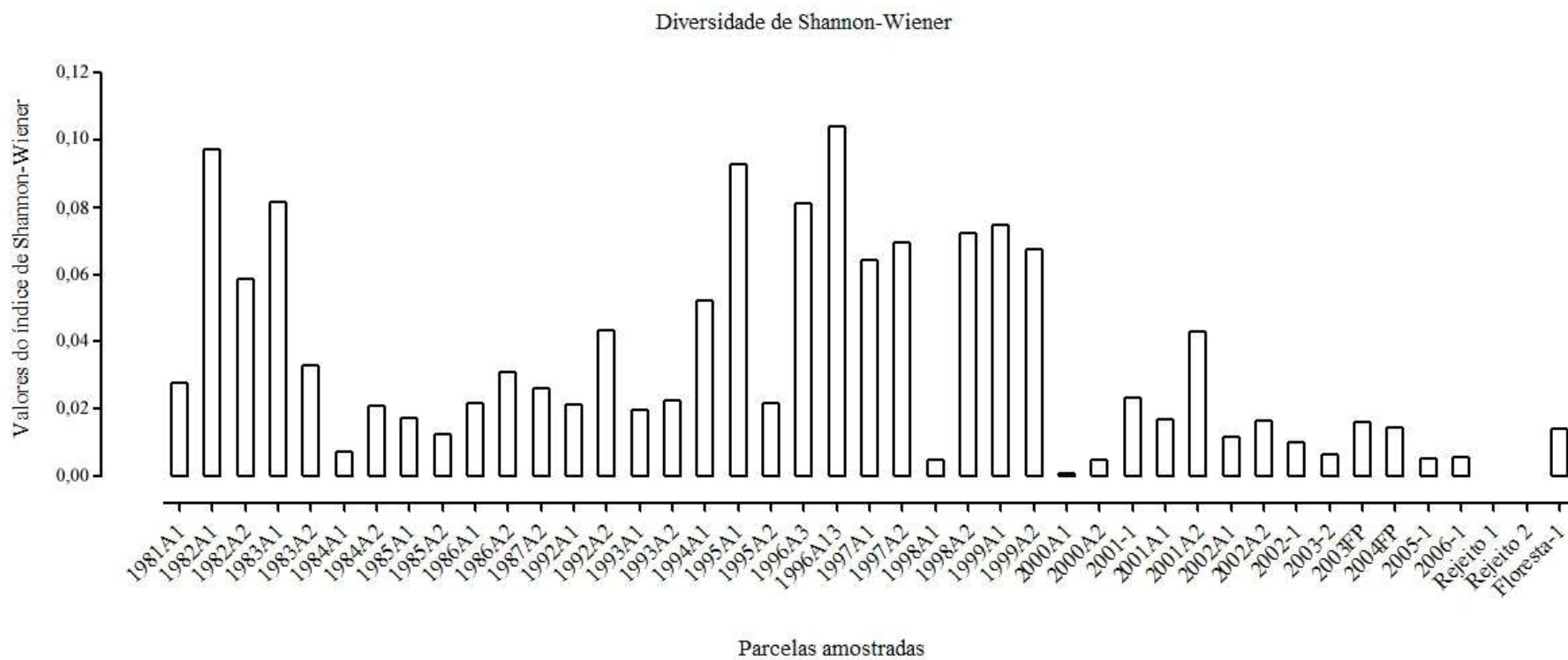


Figura 14: Valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA.

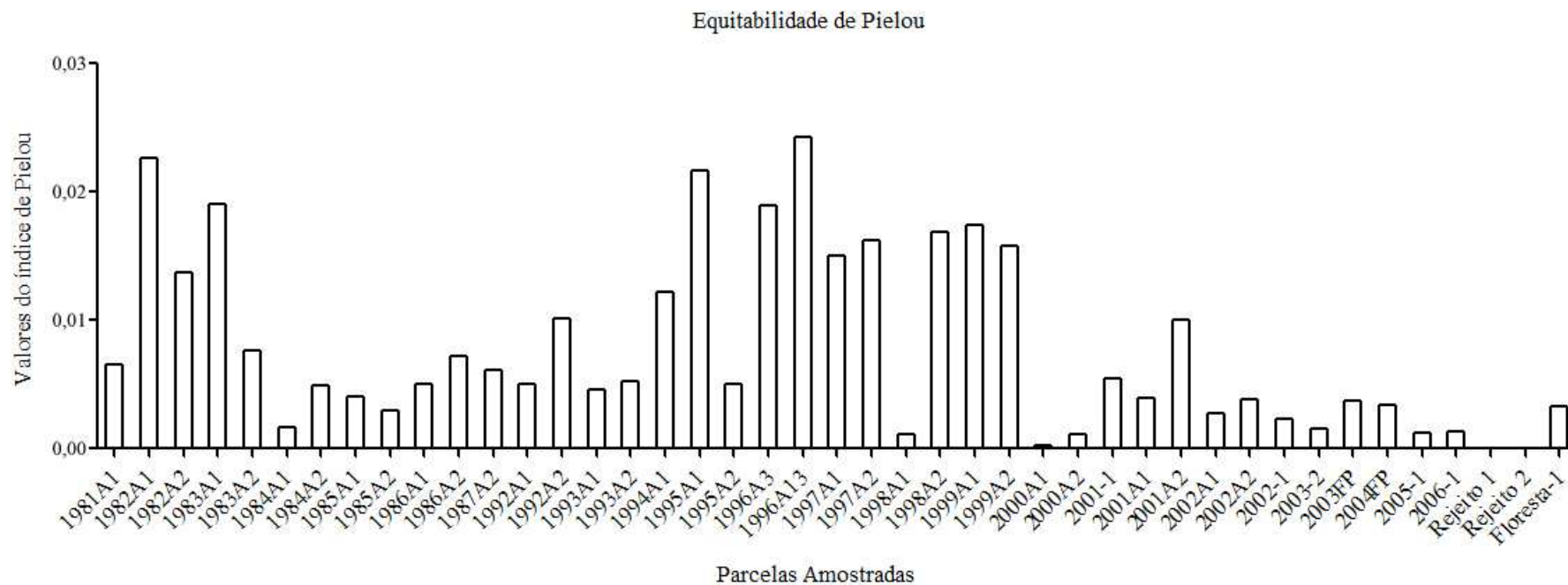


Figura 15: Valores do índice de equitabilidade de Pielou para a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 43 amostras de terra coletadas em parcelas revegetadas, após a atividade de mineração de bauxita, sobre estéril de mineração, rejeito de mineração e em área de Floresta primária em Porto Trombetas-PA.

Entre as 19 áreas que apresentaram os valores mais baixos para o índice de Shannon-Wiener (abaixo de 0,02) estão a área de Floresta e apenas as áreas 1984A1, 1985A1, 1985A2, 1993A1 e 1998A1 que foram revegetadas antes de 2000. Nestas áreas o número de esporos foi mais baixo que nas demais. Já entre as 14 que apresentaram os valores mais elevados (acima de 0,04) apenas a 2001A2 foi revegetada após o ano de 2000.

Quando práticas de revegetação são implantadas em áreas degradadas espera-se que ocorra processo de colonização do solo de forma que promova o estabelecimento de ecossistema que seja funcional e que se aproxime o máximo possível do ecossistema original. Dessa forma ao monitorar o sucesso destas práticas, comparações são feitas com os resultados obtidos em ecossistema não degradado. Com relação aos FMAs observa-se que áreas de Floresta sem degradação apresentam elevados níveis de riqueza e equitabilidade entre as espécies presentes, bem como, baixo potencial de inóculo (Zangaro et al., 2000; Caproni et al., 2003).

De maneira geral, estes resultados mostram que as práticas de revegetação adotadas nestas áreas estão proporcionando o estabelecimento de comunidade de FMAs no solo, o que é observado pela riqueza de espécies e número de esporos. Entretanto, estes dados mostram que as áreas estudadas ainda apresentam elevado grau de perturbação, pois o nível de riqueza de FMAs e o número de esporos encontrados foram baixos, principalmente nas áreas revegetadas recentemente, que pode ser reflexo de baixa cobertura vegetal, além disso, observou-se predomínio considerável da espécie *Glomus macrocarpum* nas áreas com maior potencial de inóculo.

3.2 - Avaliação da Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares por ARDRA e DGGE a Partir de Amostras de Raízes de Embaúba e Lacre Vermelho

Obteve-se produto de PCR para 17 e 32 amostras de raízes das espécies Embaúba e Lacre vermelho, respectivamente. Pelo DGGE observou-se que o número de bandas variou entre 2 e 5 para Embaúba e entre 0 e 7 para o Lacre vermelho (Figuras 16 e 17). Embora haja limitações em se utilizar o número de bandas no gel de DGGE como estimativa da riqueza de FMAs, uma vez que existe variabilidade entre as diferentes cópias do gene 18S rDNA de um mesmo fungo e que sequências distintas podem apresentar o mesmo padrão de desnaturação migrando a mesma distância no gel, alguns autores ainda adotam esse procedimento para estimativa da riqueza (Zhang et al., 2009). Considerando que cada banda no gel representa um táxon de FMA pôde-se perceber maior variabilidade na riqueza entre as amostras da espécie Lacre vermelho quando comparado com as amostras da espécie Embaúba (Figuras 16 e 17).

A variação no nível de riqueza, avaliado pelo número de bandas, não foi relacionada ao tempo de revegetação para nenhuma das espécies arbóreas. Com base nos perfis de bandas da comunidade de FMAs, observados nos géis de ARDRA e DGGE realizou-se análises de agrupamento. Nas Figuras 18, 19 e 20 são apresentados os dendrogramas de similaridade, onde os agrupamentos de amostras podem ser observados para as amostras de raízes de Embaúba e Lacre Vermelho, analisadas por ARDRA e DGGE, respectivamente.

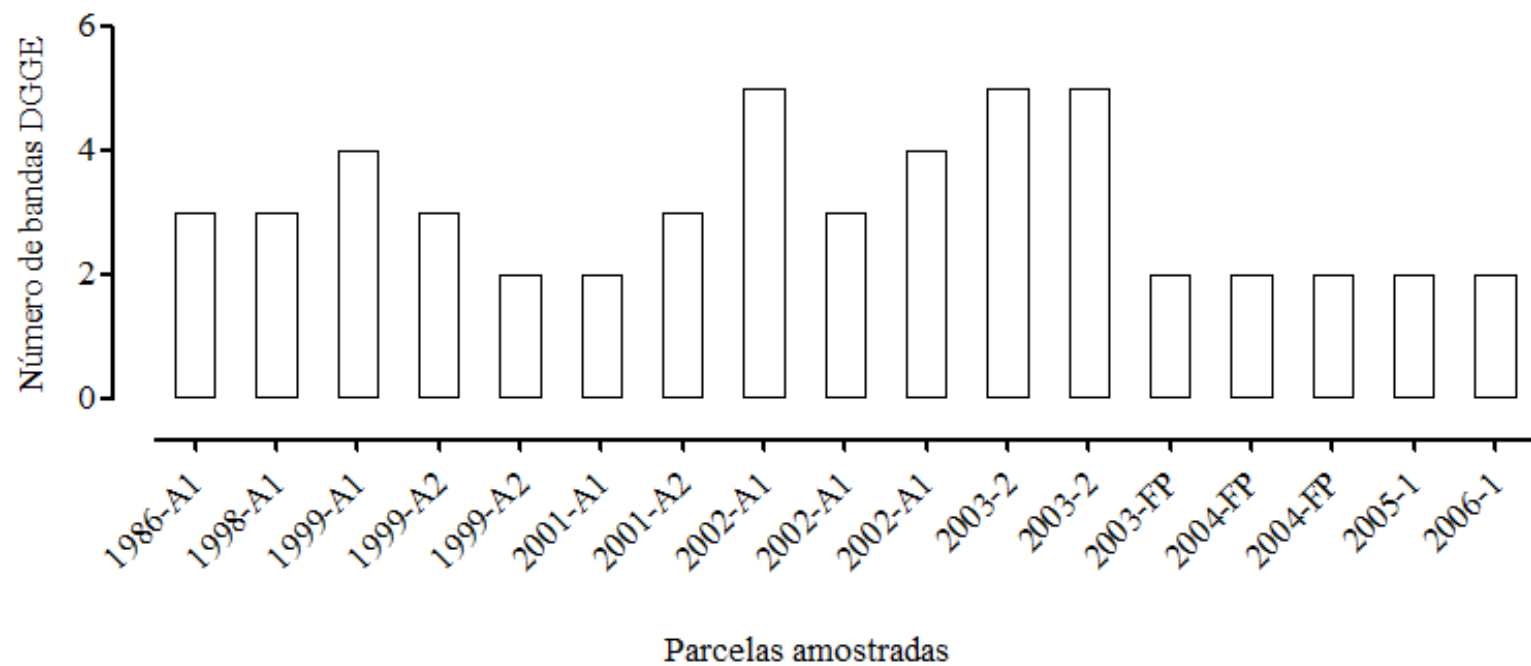


Figura 16: Número de bandas visualizadas nos géis com gradiente de desnaturante (DGGE) para a espécie Embaúba para as amostras de raízes coletadas nas parcelas revegetadas para as quais se obteve amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1.

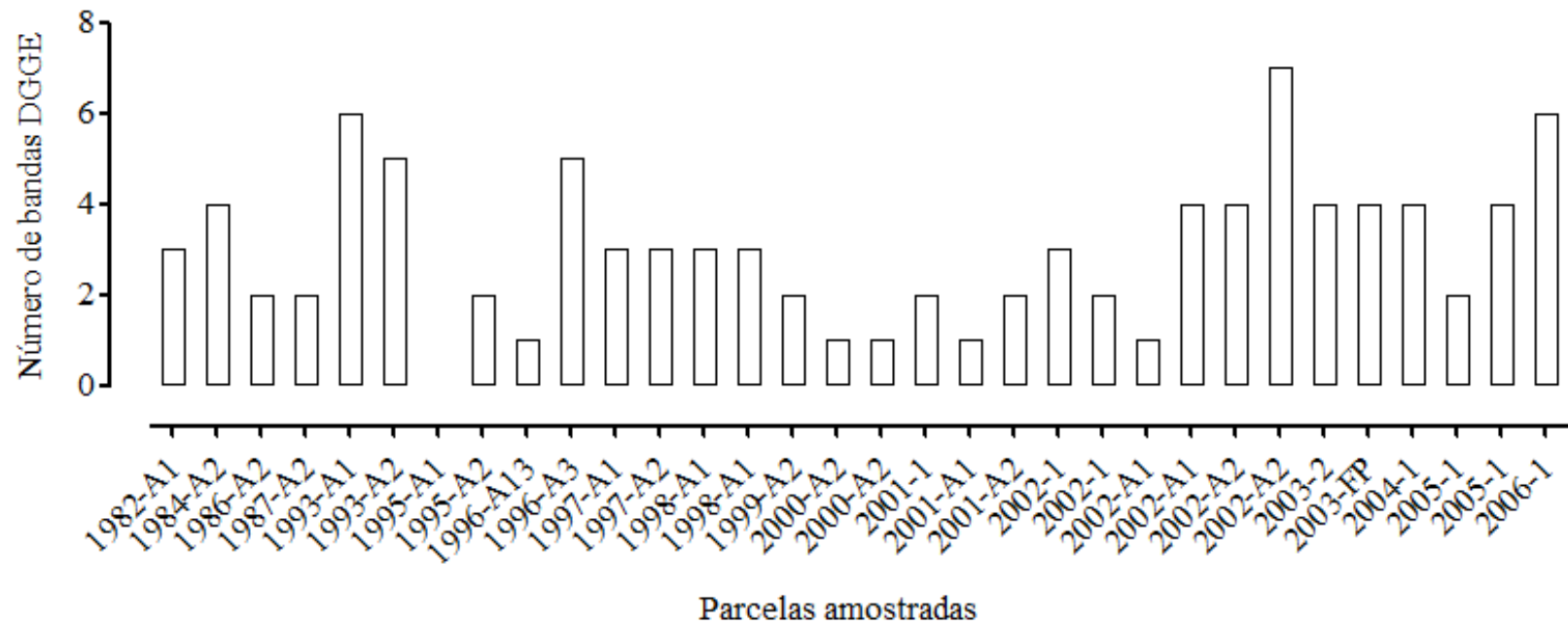


Figura 17: Número de bandas visualizadas nos géis com gradiente de desnaturante (DGGE) para a espécie *Laccaria stipitata* para as amostras de raízes coletadas nas parcelas revegetadas para as quais se obteve amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1.

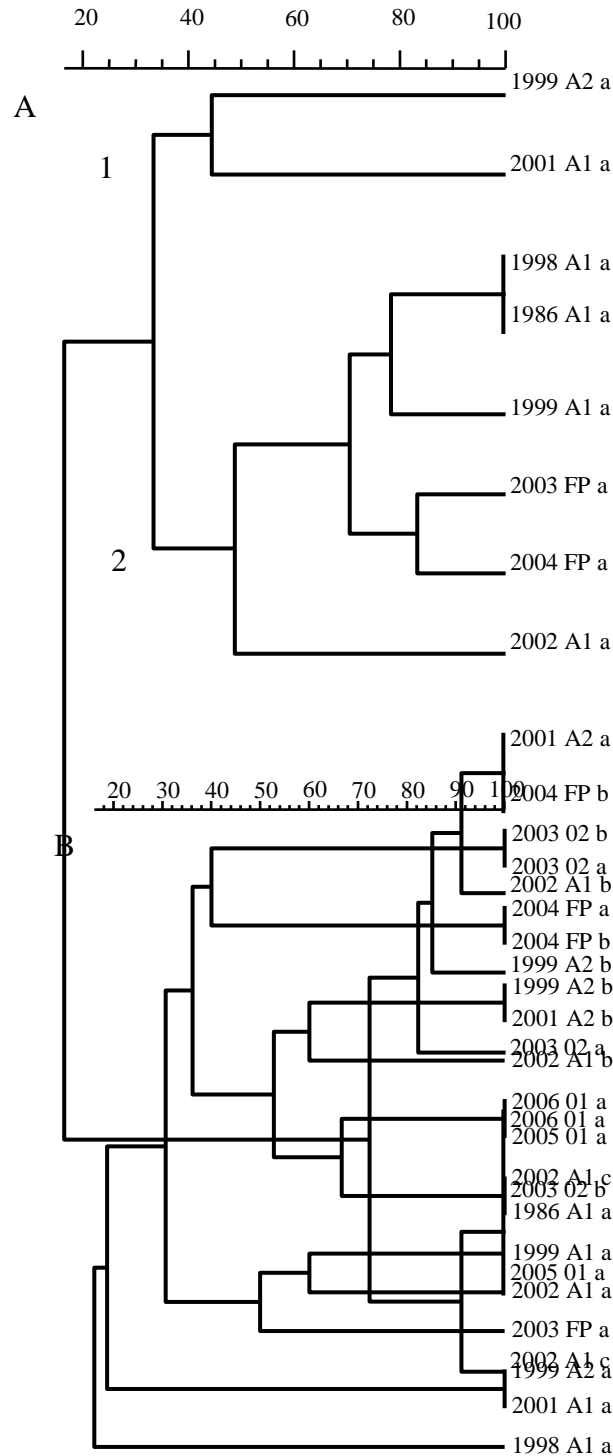


Figura 18: Dendrogramas de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construídos com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Embaúba avaliadas pela análise de restrição (A) ARDRA e pela eletroforese em gel com gradiente desnaturante (B) DGGE do gene 18S rDNA.

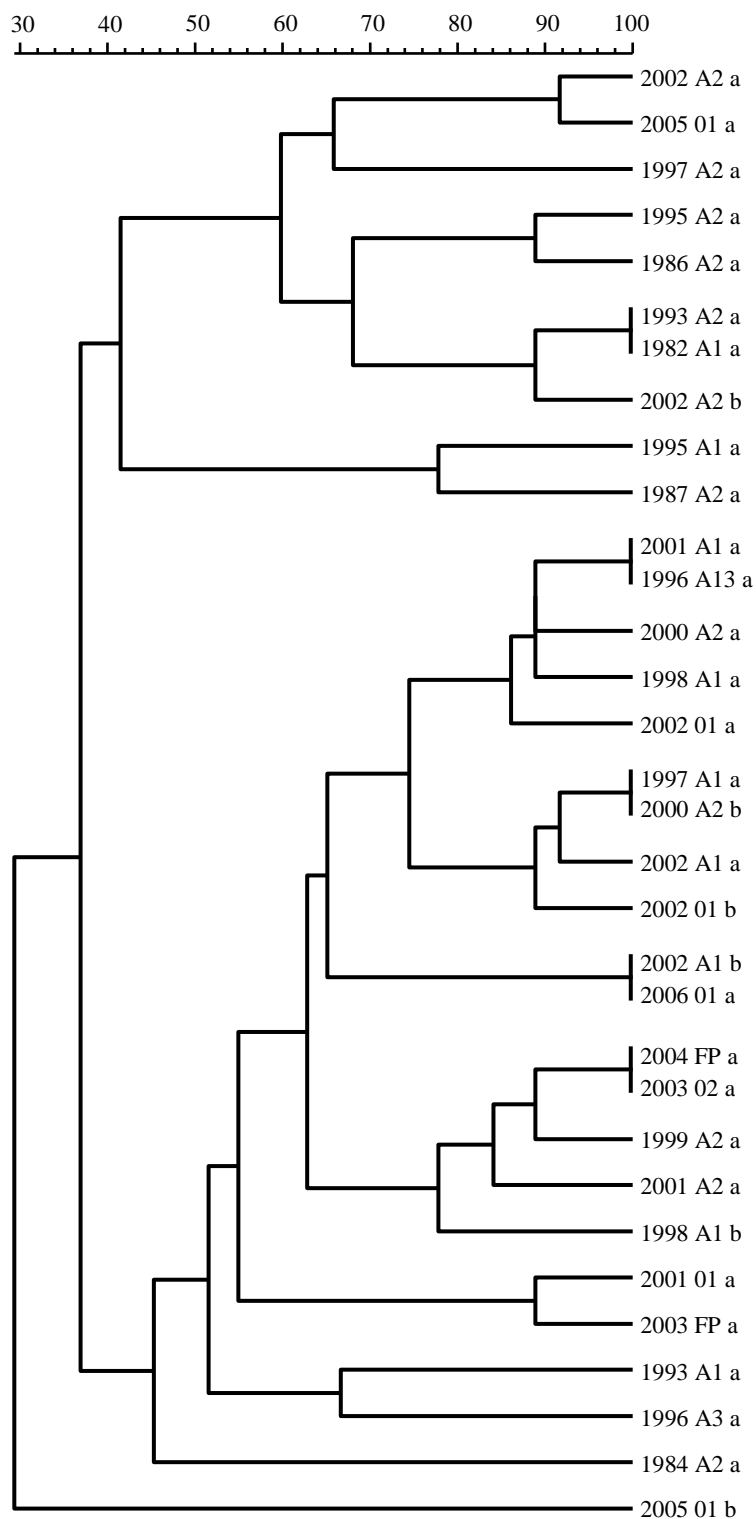


Figura 19: Dendrograma de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construído com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Lacre Vermelho avaliadas pela análise de restrição (ARDRA) do gene 18S rDNA.

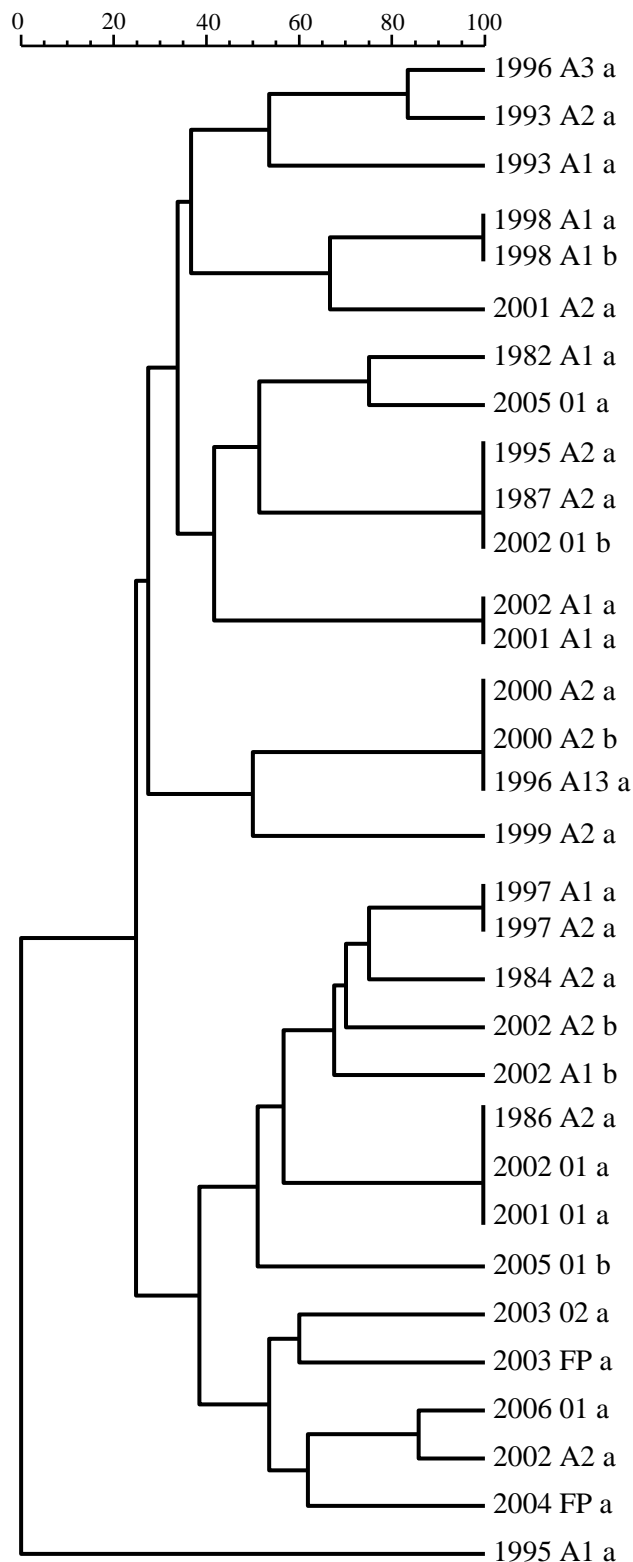


Figura 20: Dendrograma de similaridade genética da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) construído com o índice de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre as diferentes amostras de raízes de Lacre Vermelho avaliadas pela eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 18S rDNA.

Observou-se que as ferramentas utilizadas foram capazes de discriminar as amostras e estas produziram agrupamentos distintos. Pela análise de ARDRA um baixo número de bandas foi observado para cada enzima, mas a combinação dos resultados de três enzimas possibilitou a distinção da maior parte das amostras (Figuras 18A e 19).

Para a espécie *Embaúba* observou-se a formação de dois grupos (Figura 18A), sendo que o grupo 2 foi composto quase que exclusivamente por amostras coletadas nas áreas revegetadas após o ano de 2000, a exceção para a amostra 1999A2b. Pelo DGGE (Figura 18B), observou-se que as duas amostras de 2003-02; as duas amostras 2004-FP; 1999A2 e 2001A2; 2002A1 e 1986A1 e 1999A2 e 2001A1 apresentaram 100% de similaridade. Este elevado nível de similaridade pode significar efeito da espécie vegetal em selecionar seu simbiote.

Grupos consistentes foram observados para as amostras de Lacre vermelho (Figuras 19 e 20); entretanto, não foi observada relação com o ano de revegetação, nem para os dados de ARDRA nem para os dados de DGGE.

Esses resultados mostram, assim como observado para a análise baseada na ocorrência de esporos, que a comunidade de FMAs pode estar sendo determinada por fatores distintos em cada área analisada, dessa forma uma alteração progressiva de espécies ao longo dos anos, que caracterizaria uma sucessão na comunidade de FMAs, não pôde ser observada.

Para esse conjunto de dados os efeitos de variabilidade espacial da comunidade de FMAs, bem como, o efeito de seletividade das plantas exercem influência sobre os agrupamentos. Uma vez que essas parcelas estão delimitadas dentro de talhões maiores de reflorestamento é possível que a fonte de inóculos de FMAs em cada uma delas seja diferente.

4 - CONCLUSÕES

Em todas as parcelas analisadas foram encontradas 13 espécies de fungos micorrízicos arbusculares com base na caracterização morfológica dos esporos.

A dominância de *Glomus macrocarpum* entre as espécies encontradas foi muito grande, sendo que 96,65% dos esporos encontrados pertenceram a essa espécie.

Houve baixa riqueza de espécies na maioria das parcelas analisadas, sendo que em 36 das 43 parcelas a riqueza de espécies foi igual ou inferior a três.

A diversidade de FMAs, avaliada pelo índice de Shannon foi menor nas áreas revegetadas a menos tempo, em especial nas revegetadas após o ano de 2000.

Não houve relação entre os agrupamentos observados pelas técnicas de ARDRA e DGGE mesmo observando-se o DNA extraído da mesma espécie de planta.

CAPÍTULO III

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE RAÍZES COLETADAS NO CAMPO

RESUMO

A obtenção de um extrato de boa qualidade em procedimentos de extração de DNA é de fundamental importância para o desenvolvimento de qualquer estudo baseado na aplicação de ferramentas de biologia molecular. Significativos avanços estão sendo obtidos neste sentido, entretanto a possibilidade da utilização de um protocolo de extração como padrão para diferentes análises se torna cada vez mais difícil. Como amostras ambientais apresentam elevadas concentrações de inibidores da reação de polimerase em cadeia (PCR), faz-se necessário a adoção de protocolos que consigam eliminar polifenóis, ácidos húmicos, polissacarídeos e proteínas do extrato. Avaliou-se a aplicabilidade da adição de polivinilpirrolidona (PVP), polivinilpolipirrolidona (PVPP), Ditioneitol (DTT) e carvão ativado (CA) ao tampão de extração em procedimento de extração de DNA a partir de amostras de raiz para amplificação de seqüências de fungos micorrízicos arbusculares. Os melhores resultados foram obtidos com a adição de carvão ativado à amostra, embora a adição de PVP, PVPP e uma etapa de purificação com acetato de potássio também tenha se mostrado viável. Entre os 26 protocolos avaliados pôde se observar que cinco produziram extratos com pureza entre 1,8 e 2,0 e dois produziram extratos para os quais foi possível obter amplificação em todas as PCRs realizadas.

Palavras chave: Isolamento de DNA. Inibidores de PCR. Polivinilpirrolidona. Polivinilpolipirrolidona.

ABSTRACT

Obtaining an extract of high quality in procedures of DNA isolation is fundamental for the development of any study based on the application of molecular biology tools. Significant advances are being made in this direction; however a standard isolation protocol for different analyses becomes increasingly difficult. As environmental samples show high levels of PCR inhibitors, it is necessary to use protocols that are able to eliminate polyphenols, humic acids, polysaccharides and proteins in the extract. In this study, the effect of the addition of PVP, PVPP, DTT and activated charcoal to the extraction buffer was evaluated on the procedure of DNA isolation from root samples for the amplification of DNA sequences from arbuscular mycorrhizal fungi. The best results were obtained with activated charcoal although the addition of PVP, PVPP and a purification step with potassium acetate also showed improvement. Among the 28 evaluated protocols, five had the ability to produce extracts with purity level between 1.8 and 2.0 and with two protocols it was possible to obtain amplification in all PCRs performed.

Keywords: DNA isolation. PCR inhibitors. Polyvinylpyrrolidone. Polyvinylpolypyrrolidone.

1 - INTRODUÇÃO

Diferentes ferramentas de biologia molecular baseadas em reação de polimerase em cadeia (PCR) têm sido utilizadas para se acessar a diversidade de microrganismos diretamente de amostras ambientais em estudos de ecologia microbiana. O acúmulo de informações e conhecimento que essas ferramentas têm possibilitado gerar tem permitido um grande avanço no entendimento da diversidade microbiana, em diferentes ambientes como solo, planta e água. Entretanto, diferentes amostras ambientais impõem diferenciados obstáculos e à medida que informações se acumulam limitações são identificadas colocando novos desafios.

Apesar das diversas oportunidades de estudos nessa área algumas aplicações ainda têm sido retardadas significativamente devido a problemas com a extração de DNA das amostras que podem conter diferentes tipos de inibidores que retardam ou completamente evitam a amplificação via PCR (Nazar et al., 2004).

A utilização de protocolos convencionais para a extração do DNA geralmente não permite a eliminação destes inibidores. Nestes casos, a extração de DNA resulta na co-extração de contaminantes que apresentam propriedades de solubilidade similares às do DNA, onde se observa a presença de compostos quimicamente complexos como ácidos húmicos ou metabólicos secundários tipo polifenóis, taninos e polissacarídeos. A presença destes contaminantes pode ser observada através do aspecto pegajoso, tipo cola, ou de alguma coloração que estes conferem ao produto obtido. A presença destes variados tipos de contaminantes torna o DNA inacessível por pipetagem, interferem na detecção e quantificação do DNA, além de inibirem a atividade da DNA polimerase (Porebski et al., 1997; Lakay et al., 2007).

Para se iniciar um estudo utilizando técnicas dependentes de PCR uma etapa de significativa importância e que está diretamente relacionada com o sucesso na obtenção dos resultados, é a etapa de extração de DNA total da amostra. Para que uma amostra de DNA possa ser amplificada por meio da PCR, um produto de qualidade precisa ser alcançado na extração. Qualidade aqui é entendida como uma relação indissociável entre pureza do produto obtido e quantidade de DNA produzida na extração. Dessa forma constitui-se de grande importância delinear protocolos de extração de DNA adequados ao tipo de amostra ambiental que se analisará.

Vários procedimentos que permitem a extração de DNA compatível com técnicas baseadas em PCR, bem como, várias adaptações a estes procedimentos com o objetivo de solucionar problemas específicos têm sido reportados na literatura nos últimos anos. Alguns procedimentos propõem a separação das células alvos utilizando repetidas etapas de centrifugação, como forma de separar as células da matriz da amostra ambiental anteriormente à lise para a extração do DNA (Fægri et al., 1977). Outros autores propõem a utilização de diferentes tipos de preparo do material para a etapa de lise celular. Estas variações incluem maceração em nitrogênio líquido, ruptura utilizando microondas, lise enzimática ou a utilização de “beads” (grânulos de vidro) sob forte agitação (Volossiuk et al., 1995; Miller et al., 1999; Orsini e Romano-Spica, 2001; Stach et al., 2001). Variações nos métodos de purificação do DNA utilizando compostos químicos, como CTAB (Brometo de cetil trimetil amônio), SDS (Dodecil sulfato de sódio), PVPP (Polivinilpirrolidona), PVP (Polivinilpirrolidona), DTT (Ditiotreitol) e/ou etapas como a centrifugação utilizando gradiente de cloreto de cézio ou a filtração utilizando resinas também tem sido utilizadas (Jackson et al., 1997; Miller, 2001).

A utilização destas modificações em muitos casos tem produzido efeitos satisfatórios, especialmente, quando se trabalha com amostras contendo compostos recalcitrantes e

amostras que foram secadas e armazenadas, no entanto, até o momento nenhum procedimento de extração de DNA tem sido adequado o suficiente para ser generalizado como padrão (Schneegurt et al., 2003), uma vez que a obtenção de um produto de DNA de qualidade a partir de diferentes tipos de amostras requer variadas estratégias de purificação. Além disso, a maior parte dos protocolos desenvolvidos requer laboratórios com configuração sofisticada, ou consome muito tempo. Dessa forma, a análise de um elevado número de amostras se torna inviável ou pelo alto consumo de tempo ou pela elevada demanda de recursos para a aquisição de reagentes.

Recentemente, alguns autores têm acessado a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em amostras de raízes colonizadas. Estes autores argumentam que dessa forma acessam diretamente a comunidade mais intimamente associada à planta hospedeira e podem acessar populações que não são detectadas por meio da coleta de esporos (Clapp et al., 2002; Husband et al., 2002a; b; Scheublin et al., 2004). Para isso, tem sido feita a extração do DNA a partir das raízes e, posterior amplificação do DNA fúngico com iniciadores específicos. Como neste caso, inevitavelmente, a quantidade de DNA alvo obtida é baixa e não se pode discernir entre o DNA alvo do DNA da planta hospedeira, por uma simples quantificação em espectrofotômetro, um adequado protocolo de extração deve ser utilizado para permitir satisfatória amplificação do DNA alvo.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a qualidade, produtividade e pureza, do extrato de DNA produzido utilizando diferentes protocolos de extração e amostras de raízes de *Mucuna pruriens* coletadas de plantas crescendo no campo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Coleta e Preparo da Amostra de Raiz

Para esse estudo utilizou-se amostras de raízes de plantas da espécie *Mucuna pruriens* crescendo no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no Município de Seropédica, RJ (Latitude 22°44'38" Sul e Longitude 43°42'27" Oeste). *Mucuna pruriens* foi escolhida por ser uma espécie que apresenta raízes de coloração escura o que foi utilizado como um indicativo da presença de polifenóis. Algumas plantas da espécie foram coletadas em uma área de plantio de maracujá em um Planossolo. As raízes finas foram separadas e lavadas em água corrente. Parte das raízes foi separada para avaliação da taxa de colonização micorrízica e outra parte foi armazenada a -20°C para ser utilizada na extração de DNA.

A taxa de colonização foi estimada em placa quadriculada seguindo a metodologia de Giovannetti e Mosse (1980) após coloração conforme Phillips e Haymann (1970). Para avaliação dos diferentes protocolos de extração de DNA, a amostra de raiz que foi armazenada a -20°C foi macerada em nitrogênio líquido utilizando gral e pistilo. Posteriormente, o tecido macerado foi distribuído em tubos com capacidade de 1,5 mL, colocando-se 50 mg por tubo.

2.2 - Procedimento de Extração do DNA

Foram avaliados 28 protocolos de extração de DNA que diferiram principalmente quanto à composição do tampão de extração utilizado, tempo de incubação para lise celular e quanto à utilização de compostos para favorecer a produção de um extrato mais limpo.

Diferentes combinações entre reagentes foram utilizadas para compor os tampões de extração. Estes foram preparados utilizando tampão Tris-HCl, [Tris(hidroximetil)aminometano] e ácido clorídrico e tem a capacidade de absorver íons H^+ e OH^- mantendo a solução tamponada; EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético que tem a capacidade de quelar íons metálicos formando complexos muito estáveis; CTAB (Brometo de cetil trimetil amônio que age como surfactante caracterizado por alterar as propriedades interfaciais de um líquido, podendo ser aplicado, com efeito de detergência, emulsificação, espumante e solubilizante); PVP e PVPP (Polivinilpirrolidona e Polivinilpolipirrolidona são produtos da polimerização da vinilpirrolidona que proporcionam redução de polifenóis causando a descoloração oxidativa); DTT (Ditiotreitol é um agente redutor com baixo potencial redox que é usado principalmente para proteger grupos S-H livres da oxidação durante o isolamento de proteínas ou de outros processos bioquímicos). Utilizou-se também acetato de potássio (K) para promover uma redução de proteínas e polissacarídeos como resultado da formação de complexos estáveis e carvão ativado (CA) a fim de evitar a solubilização dos polissacarídeos, polifenóis e de compostos resinosos e coloridos que poderiam permanecer no extrato de DNA.

Abaixo segue descrição dos protocolos utilizados:

- Etapa 1: Macerar o tecido radicular em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino;
- Etapa 2: Pesar 50 mg de tecido em tubo com capacidade de 1,5 mL;
- Etapa 3: Adicionar 10 mg de carvão ativado em pó (CA); - Etapa testada
- Etapa 4: Adicionar 500 µL do tampão de extração; - Etapa testada

Tampão TE: Mistura contendo 20% (10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA pH 8) 80% (10 mM de Tris-HCl pH 8, 0,1 mM de EDTA pH 8),
Tampão TE – PVPP: Tampão Tampão TE descrito acima com 2%³ de PVPP,
Tampão TE –PVP: Tampão Tampão TE com 2% de PVP,
CTAB: 2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH8, 1% v/v de β -mercaptoetanol⁴,
CTAB-PVPP: Tampão CTAB descrito acima com 2% PVPP,
CTAB-PVP: Tampão CTAB descrito acima com 2% PVP,
CTAB-PVPP-DTT: Tampão CTAB descrito acima com 2% PVPP, 2% DTT,
CTAB-DTT–PVP: Tampão CTAB descrito acima com 2% DTT, 2% PVP
CTAB-DTT: Tampão CTAB descrito acima com 2% DTT,
CTAB-DTT-PVPP: Tampão CTAB descrito acima com 2% DTT, 2% PVPP;
Etapa 5: Adicionar 5 μ L de proteinase K (20 mg mL⁻¹);
Etapa 6: Incubar os tubos contendo tampão CTAB por 1 hora a 65°C sob agitação constante,
Etapa 6: Incubar os tubos contendo tampão Tampão TE por 10 min a 100°C sob agitação constante;
Etapa 7: Adicionar 250 μ L de acetato de potássio 5 M (K); -Etapa testada
Etapa 8: Incubar os tubos no gelo por 30 min;
Etapa 9: Centrifugar a 16100 g por 10 min a 4°C;
Etapa 10: Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
Etapa 11: Adicionar 500 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)
Etapa 12: Agitar levemente por inversão 10 vezes;
Etapa 13: Centrifugar a 16100 g por 10 min a 4°C;
Etapa 14: Transferir o sobrenadante para um novo tubo evitando a interface e adicionar 500 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
Etapa 15: Agitar levemente por inversão 10 vezes;
Etapa 16: Centrifugar a 16100 g por 10 min a 4°C;
Etapa 17: Transferir o sobrenadante para um novo tubo evitando a interface e adicionar 1 mL de isopropanol gelado homogeneizando por pipetagem;
Etapa 18: Incubar os tubos a -20°C durante a noite;
Etapa 19: Centrifugar a 16100 g por 30 min a 4°C;
Etapa 20: Descartar o sobrenadante retendo o precipitado;
Etapa 21: Adicionar 150 μ L de etanol 70% v/v e centrifugar a 16100 g por 5 min a 4°C;
Etapa 22: Descartar o sobrenadante e secar os tubos à temperatura ambiente;
Etapa 23: Solubilizar o precipitado em 50 μ L de Tris-HCl-EDTA (10 mM de Tris-HCl - 1 mM de EDTA) e,
Etapa 24: Armazenar os tubos a -20°C.

Além dos diferentes protocolos de extração citados acima a extração também foi realizada com o kit comercial Dneasy Mini Plant Kit (marca Qiagen). Na extração com o kit seguiu-se as recomendações do fabricante e o DNA foi eluído em 100 μ L do tampão de eluição disponível no kit. Foram utilizadas seis repetições por tratamento.

³ Os reagentes CTAB; PVP; PVPP e DTT foram adicionados aos tampões de extração em pó na concentração de 2%, sendo 2 g do reagente em 100 mL do tampão.

⁴ O β -mercaptoetanol foi adicionado ao tampão CTAB no momento da extração.

2.3 - Avaliação da Qualidade do Extrato de DNA Obtido

O produto de extração foi avaliado por leitura em espectrofotômetro tipo NanoDrop (Thermo Scientific) para verificação da concentração de DNA em $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e a razão entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm, como estimativa da pureza do extrato obtido. A qualidade do produto de extração foi avaliada pela observação do produto em gel de agarose (1% p/v) e por meio da realização de reações de PCR com diferentes pares de iniciadores.

Para a reação com os iniciadores universais para bactérias foram utilizados os iniciadores 968f-GC (5'AACGCGAAGAACCTTAC3') contendo um grampo GC (5'CGCCCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG3') e o iniciador 1401 (5'GCGTGTGTACAAGACCC-3'), específicos para a região 16S do rDNA entre os nucleotídeos 968 e 1401 correspondente a região variável V6 – V8 (Gelsomino et al., 1999). Com volume final de 20 μL as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 200 μM de cada; MgCl_2 1,5 mM; 0,2 μM de cada iniciador; 0,135 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA (albumina sérica bovina); 0,4 μL de Tween 2% e 1,4 U de DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase – Promega). Como DNA molde utilizou-se 1 μL de uma diluição 1:20 do produto de extração. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff seguindo os passos: 95°C por 3 min para desnaturação inicial; 34 ciclos de 93°C por 1 min para desnaturação; 55°C por 1 min para anelamento; 72°C por 2 min para extensão e 72°C por 5 min para extensão final.

Foram utilizados os iniciadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (White et al., 1990) desenvolvidos para amplificar DNA de fungos. Para a reação de PCR com volume final de 15 μL as condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 200 μM de cada; MgCl_2 2,5 mM; 0,5 μM de cada iniciador; 0,18 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA; 0,75% v/v de formamida e 0,75 U de DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase – Promega). Como DNA molde utilizou-se 2 μL de uma diluição 1:20 do produto de extração. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff seguindo os passos: 95°C por 3 min para desnaturação inicial; 34 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturação; 51°C por 30 s para anelamento; 72°C por 2 min para extensão e 72°C por 10 min para extensão final.

Para a reação de Nested-PCR utilizou-se iniciadores desenhados para fungos e iniciadores desenhados para fungos micorrízicos arbusculares. Sendo que as condições das reações de amplificação com os iniciadores NS31GC-AM1 e NS31-AM1 (NS31- 5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3', Simon et al., 1992); (NS31GC-5'-CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCAAGTCTGGTGCC-3', Kowalchuk et al., 2002); (AM1- 5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3', Helgason et al., 1998) com volume final de 20 μL foram: Tampão 1X; dNTPs 200 μM de cada; MgCl_2 2,5 mM; 0,2 μM de cada iniciador; 0,135 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA e 0,5 U de DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase – Promega). Como DNA molde utilizou-se 3 μL de uma diluição 1:100 do produto da reação com os iniciadores NS1-NS4. A reação foi realizada em termociclador marca Eppendorff seguindo os passos: 94°C por 3 min para desnaturação inicial; 34 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação; 59°C por 1 min para anelamento; 72°C por 2 min para extensão e 72°C por 5 min para extensão final.

Os produtos das reações de PCR foram verificados em gel de agarose (1% p/v) após coloração com brometo de etídio.

2.4 - Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores obtidos nas leituras em espectrofotômetro foram submetidos à análise de variância considerando delineamento inteiramente casualizado com seis repetições utilizando o teste Scott-Knott com nível de significância de 5% para comparação das médias.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas estruturas fúngicas na amostra de raiz usada e a taxa de colonização micorrízica foi estimada em 23%. A concentração de DNA obtida por meio de leitura em espectrofotômetro variou entre 4,71 e 664,89 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para os protocolos TE-CA-K e CTAB-PVP-CA, respectivamente. Houve diferença significativa entre os protocolos tanto para concentração quanto para pureza (Tabela 5). Os protocolos CTAB-PVP, CTAB-PVP-CA, CTAB-DTT e CTAB-PVPP-DTT foram os que proporcionaram a maior extração de DNA, enquanto que, os protocolos TE-CA-K, TE-CA-PVPP-K, TE-CA, TE-CA-PVPP, TE-PVP-K e TE-CA-PVP-K produziram extratos onde a concentração de DNA foi inferior a 50 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

Para a realização de técnicas como o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição) é importante que o protocolo de extração de DNA utilizado seja capaz de obter elevada quantidade de DNA sem que ocorra excesso de fragmentação do genoma. Tanto o excesso de fragmentação, quanto a quantidade insuficiente de DNA pode interferir no padrão de bandejamento observado no gel. Neste caso, a extração de DNA representa uma etapa com significativo consumo de tempo significativo em análises de populações (Stein et al., 2001). Por outro lado, por não ser uma ferramenta dependente de PCR, o extrato utilizado pode ser de pureza mais baixa, embora não seja o ideal. De uma maneira geral, nos protocolos que foi utilizado o detergente CTAB no tampão de extração proporcionaram elevadas quantidades de DNA (33 μg para o protocolo CTAB-PVP-CA), sendo estas superiores às quantidades proporcionadas pelos protocolos que foi utilizado apenas TrisHCl-EDTA no tampão de extração.

Um bom protocolo de extração de DNA deve proporcionar, além da extração de quantidade suficiente de DNA, um produto que tenha pureza adequada para permitir a atividade da enzima DNA polimerase nas reações de PCR. Um produto de extração de qualidade deve apresentar um valor entre 1,8 e 2,0 para a razão entre as leituras de absorbância a 260 e 280 nm, sendo que valores abaixo de 1,8 podem indicar contaminação por proteínas e acima de 2,0 podem indicar contaminação por solventes.

Cinco dos protocolos avaliados produziram extratos com pureza entre 1,8 e 2,0 (TE-CA-PVP, TE-CA-PVPP, CTAB-PVP-CA-K, CTAB-PVPP-CA-K e CTAB-CA) e outros cinco produziram extratos com pureza acima de 1,7 (TE-CA-PVP-K, TE-PVPP, TE-PVPP-K, TE-CA e CTAB-PVPP), evidenciando a viabilidade de se usar os diferentes compostos químicos para incrementar a pureza do extrato obtido. Observou-se efeito diferenciado dos reagentes químicos em promover incremento de pureza. Entre os cinco protocolos que apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0 em dois utilizou-se PVP em outros dois PVPP e nos cinco usou-se carvão ativado (CA). Considerando os 10 protocolos citados acima, em sete se utilizou carvão ativado (CA), mostrando o potencial desse composto em promover a pureza do extrato de DNA. Krizman et al. (2006) e Sathyanarayana et al. (2008) utilizaram o método CTAB modificado pela adição de carvão ativado para extração de DNA de tecidos maduros de plantas contendo óleos essenciais e polifenóis e para a extração de DNA de plantas de mucuna. No presente trabalho, a simples adição de carvão ativado (CA) ao tampão CTAB, embora tenha reduzido o rendimento de DNA de 447,26 para 365,45 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ promoveu uma alteração significativa na pureza que passou de 1,65 para 1,8 (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração e pureza dos diferentes produtos de extração de DNA de raízes de *Mucuna pruriens* obtidos a partir da extração com os diferentes protocolos comparados.

Protocolos	Concentração de DNA $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		Razão de absorvância a 260/280 nm	
CTAB	447,26	b	1,65	c
CTAB PVPP	316,62	b	1,75	b
CTAB DTT	636,27	a	1,57	c
CTAB PVP	530,54	a	1,59	c
CTAB CA	365,45	b	1,80	b
CTAB CA PVPP	453,01	b	1,68	c
CTAB PVP CA	664,89	a	1,64	c
CTAB DTT CA	276,42	c	1,68	c
CTAB PVPP DTT	592,64	a	1,62	c
CTAB DTT PVP	363,44	b	1,61	c
CTAB DTT CA PVP	416,23	b	1,54	d
CTAB DTT PVPP CA	312,97	c	1,69	c
CTAB PVP CA K	265,05	c	1,86	b
CTAB DTT PVP K	290,22	c	1,55	d
CTAB PVPP CA K	262,99	c	1,92	a
CTAB DTT PVPP K	307,98	c	1,64	c
CTAB DTT PVP CA K	250,81	c	1,64	c
TE CA	13,64	e	1,74	b
TE PVPP	201,85	d	1,70	c
TE PVP	58,96	e	1,51	d
TE CA PVP	75,84	e	1,83	b
TE CA PVPP	17,47	e	2,02	a
TE CA K	4,71	e	1,46	e
TE PVP K	24,88	e	1,68	c
TE PVPP K	192,04	d	1,79	b
TE CA PVPP K	8,18	e	1,41	e
TE CA PVP K	46,93	e	1,78	b
Kit Qiagen	80,56	e	1,64	c
	CV=45%		CV=4,9%	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CTAB- Brometo de cetil trimetil amônio; PVPP- Polivinilpolipirrolidona; DTT- Ditiotreitolo; PVP- Polivinilpirrolidona; CA- Carvão ativado; K- Acetato de potássio; TE- Tris-HCl-EDTA, Tris- [Tris(hidroximetil)aminometano]; HCl- Ácido clorídrico; EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético; Kit Qiagen- Dneasy Mini Plant Kit.

Observou-se que o PVPP proporcionou melhores incrementos de pureza ao extrato quando comparado com o PVP e que a adição de acetato de potássio promoveu incremento do nível de pureza obtido quando se adicionou PVP ou PVPP ao tampão de extração, exceto quando se combinou PVP ou PVPP com carvão ativado (CA). A adição de PVP ou PVPP ao tampão de extração tem sido utilizada com sucesso por diferentes autores (Porebski et al., 1997; Bahnweg et al., 1998; Stein et al., 2001; Aras et al., 2003; Lakay et al., 2007).

Por outro lado, a adição de DTT ao tampão de extração não se mostrou viável. A adição de DTT não proporcionou efeito positivo quando comparado com o protocolo CTAB. Além disso, quando se combinou PVP ou PVPP com DTT ocorreu redução da pureza do extrato quando comparado com o protocolo similar sem a adição de DTT (Tabela 5).

Quando se comparou a qualidade do produto obtido pela extração com o kit comercial com os demais protocolos avaliados, pôde se perceber que para o tipo de material utilizado aqui não se justifica a aquisição do kit comercial. O kit comercial é de custo elevado e produziu resultados similares ao protocolo CTAB, em relação à pureza e inferior em relação à produtividade, além disso, foi inferior tanto para pureza quanto para produtividade quando comparado com os demais protocolos em que se utilizou PVP, PVPP ou CA. Uma vantagem do kit comercial reside no fato de este consumir pouco tempo e permitir que as etapas de centrifugação sejam realizadas à temperatura ambiente. Entretanto, resultados satisfatórios foram obtidos quando se utilizou o tampão B, para o qual o tempo de incubação foi de 10 min a 100°C.

Um coeficiente de correlação linear de -0,17 ($p=0,02$) foi obtido para os dados de concentração e pureza dos extratos indicando ausência de relação entre essas variáveis. Pela Tabela 5 pode se notar que pureza elevada foi obtida tanto para protocolos que recuperaram pouco DNA (TE-CA-PVP, TE-CA-PVPP) quanto para protocolos que recuperaram muito DNA (CTAB-PVP-CA-K, CTAB-PVPP-CA-K e CTAB-CA). O coeficiente de correlação foi de -0,44 ($p<0,001$) quando se considerou apenas os dados dos protocolos que levaram CTAB, mostrando que ainda uma falta de relação consistente entre as variáveis.

A verificação da qualidade do DNA por meio da leitura em espectrofotômetro é importante para definição de estratégias para realização das PCRs. Entretanto, a avaliação dessa qualidade também deve ser feita em gel de agarose e por meio da avaliação do sucesso das PCRs. Desta forma, a eletroforese em gel de agarose do extrato obtido é apresentada na Figura 21 e, diferentes PCRs são apresentadas nas Figuras 22 e 23.

Para a maior parte das amostras não se observou banda correspondente ao DNA total, mas para alguns protocolos isso foi possível (Figura 21). Foi observada, maior quantidade de DNA e um arraste de maior intensidade nos protocolos que se utilizou CTAB (Canaletas 2 a 18, Figura 21). Neste estudo não se empregou o tratamento com ribonuclease (RNase), que poderia reduzir a intensidade do arraste. Para os protocolos em que se utilizou o tampão de extração TE a intensidade do arraste observado foi menor indicando que nestes casos, embora a produtividade do DNA tenha sido menor o extrato obtido foi de boa qualidade e menor erro deve estar associado às leituras em espectrofotômetro.

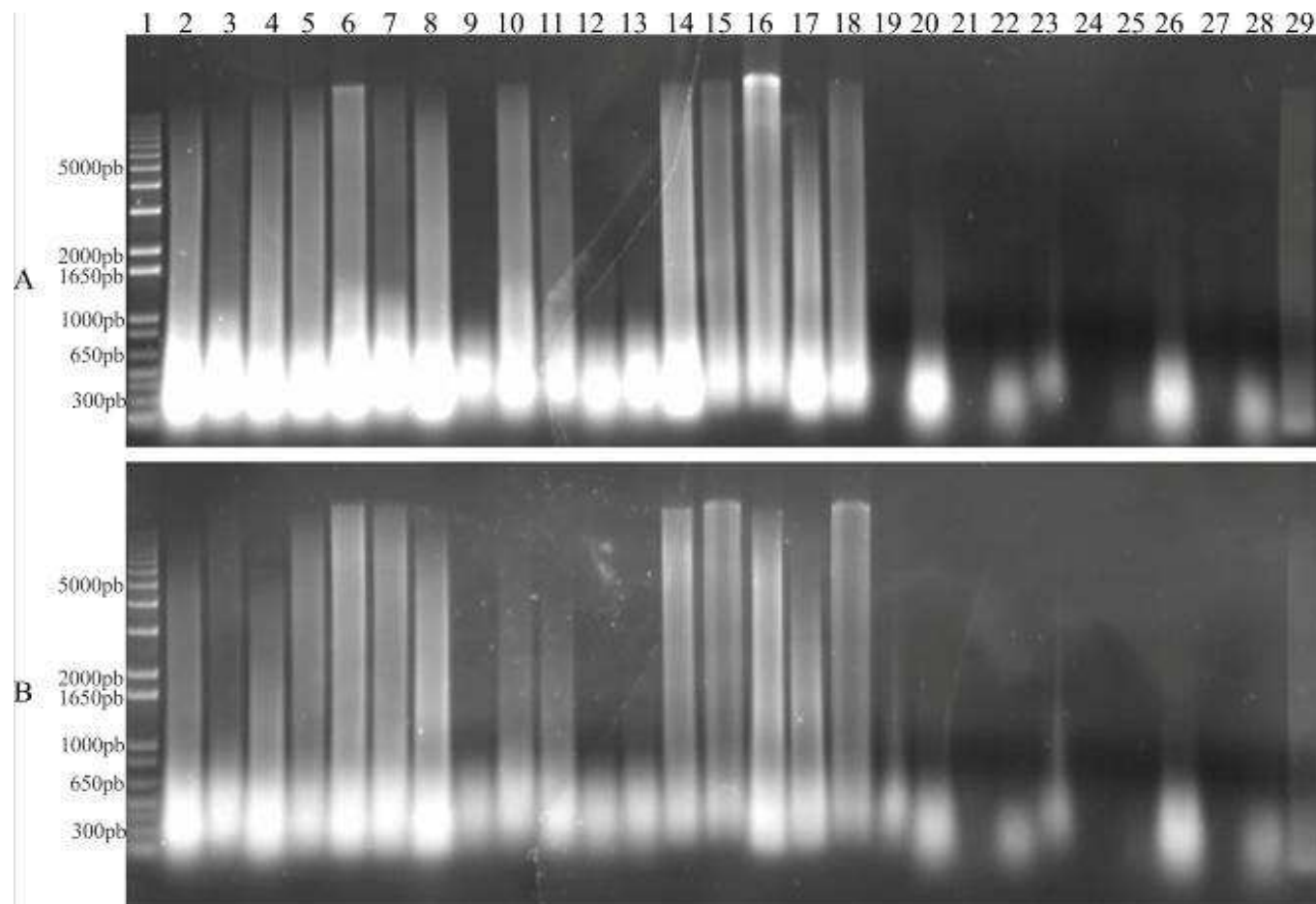


Figura 21: Géis de agarose mostrando o produto de extração de DNA de raiz de *Mucuna pruriens* obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) repetição 1 (B) repetição 2. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen.

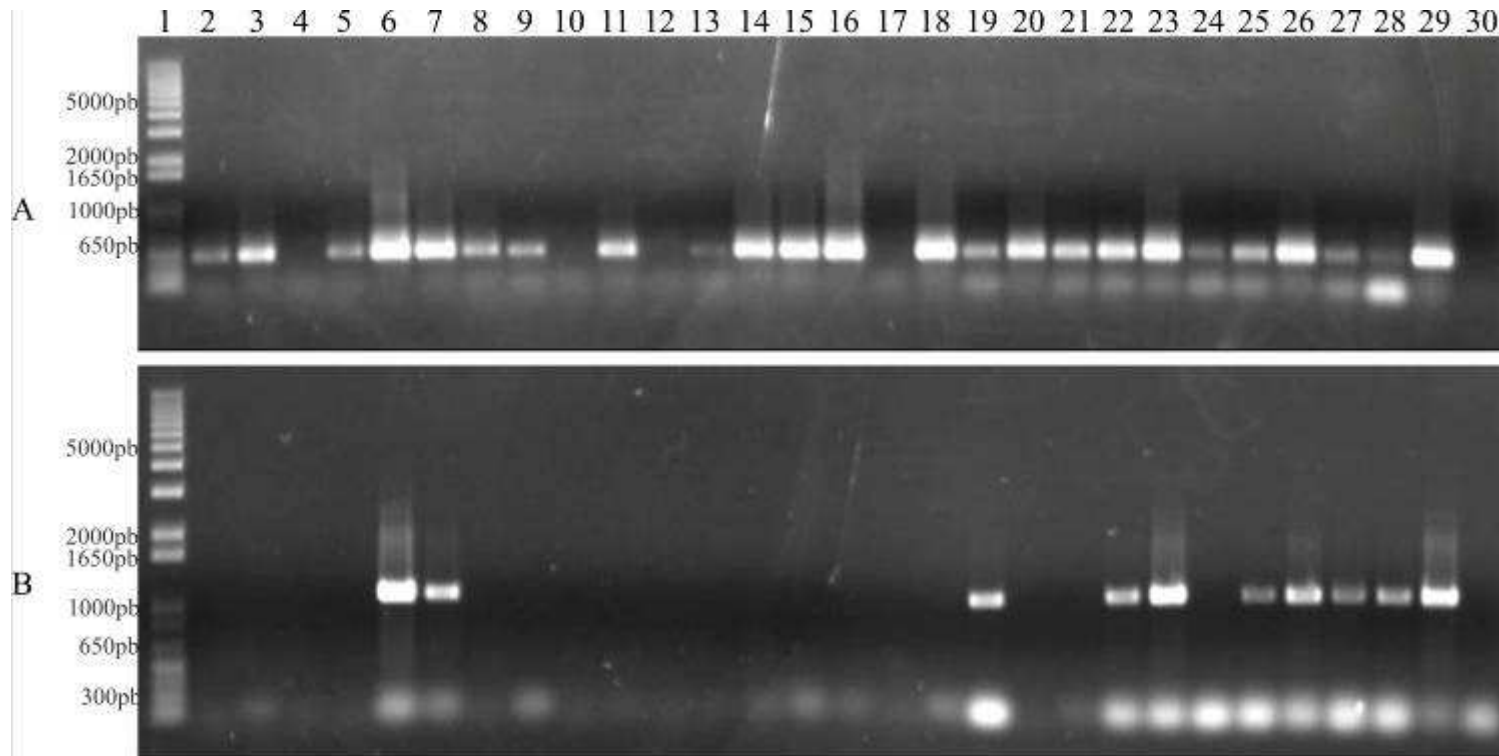


Figura 22: Géis de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) iniciadores 968f-GC-1401 (B) iniciadores NS1-NS4. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen; 30- controle negativo.

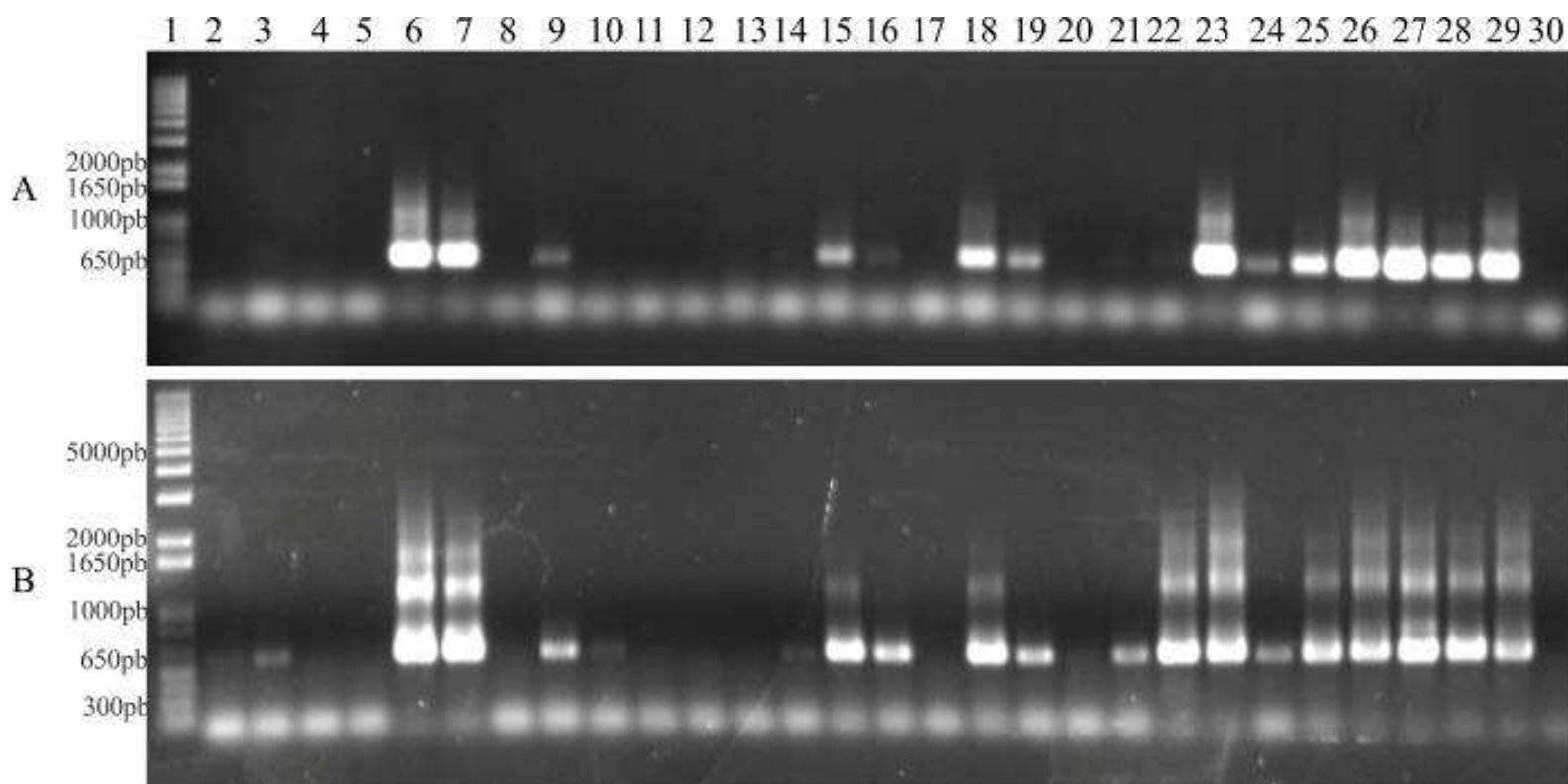


Figura 23: Géis de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os diferentes protocolos avaliados: (A) iniciadores NS31-AM1 (B) iniciadores NS31GC-AM1. Ordem das amostras: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus ladder; 2- CTAB; 3- CTAB-PVPP; 4- CTAB-DTT; 5- CTAB-PVP; 6- CTAB-CA; 7- CTAB-CA-PVPP; 8- CTAB-PVP-CA; 9- CTAB-DTT-CA; 10- CTAB-PVPP-DTT; 11- CTAB-DTT-PVP; 12- CTAB-DTT-CA-PVP; 13- CTAB-DTT-PVPP-CA; 14- CTAB-PVP-CA-K; 15- CTAB-DTT-PVP-K; 16- CTAB-PVPP-CA-K; 17- CTAB-DTT-PVPP-K; 18- CTAB-DTT-PVP-CA-K; 19- TE-CA; 20- TE-PVPP; 21- TE-PVP; 22- TE-CA-PVP; 23- TE-CA-PVPP; 24- TE-CA-K; 25- TE-PVP-K; 26- TE-PVPP-K; 27- TE-CA-PVPP-K; 28- TE-CA-PVP-K; 29- Kit Qiagen; 30- controle negativo.

Observou-se que em quatro casos, CTAB-DTT; CTAB-PVPP-DTT; CTAB-DTT-CA-PVP; CTAB-DTT-PVPP-K, o produto de DNA obtido não pode ser amplificado com os iniciadores 968f-GC-1401 (Figura 22A). Neste trabalho, os iniciadores 968f-GC-1401 foram utilizados porque amplificam um trecho do gene do DNA ribossomal 16S e têm sido utilizados com sucesso para amostras ambientais. Como as amostras de raízes foram coletadas em plantas crescendo diretamente no solo e não foi utilizado nenhum procedimento para eliminação de células bacterianas, pôde-se perceber que estes protocolos não produziram extratos com qualidade suficiente para serem utilizados em PCR. Para esses extratos a adição de etapas de purificação, posteriores à extração do DNA, deve ser avaliada. Interessantemente, nestes quatro casos foi utilizado o reagente DTT na composição do tampão de extração. Como observado na Tabela 5 a adição do DTT ao tampão de extração também reduziu a pureza do extrato obtido.

Para a avaliação da diversidade de FMAs em amostras de raízes tem sido utilizado um sistema em Nested-PCR, uma vez que a quantidade de sequências alvo nas amostras de raízes geralmente é baixa, não permitindo a verificação de produto na primeira PCR. Duas reações, sendo uma reação com iniciadores universais para fungos, seguida de outra amplificação com iniciadores específicos para FMAs têm sido utilizadas (Santos, 2008). Mais recentemente, tem se buscado a eliminação dos iniciadores universais (Lee et al., 2008; Krüger et al., 2009).

Para 10 dos protocolos utilizados, CTAB-CA; CTAB-CA-PVPP; TE-CA; TE-CA-PVP; TE-CA-PVPP; TE-PVP-K; TE-PVPP-K; TE-CA-PVPP-K; TE-CA-PVP-K e Kit Qiagen, foi possível observar banda no gel de agarose já na primeira PCR quando se utilizou iniciadores universais NS1-NS4 (Figura 22B). A pureza dos extratos obtidos variou entre 1,41, para TE-PVPP-K e 1,83 para TE-CA-PVP. Destes em sete utilizou-se carvão ativado (CA) no tampão de extração, confirmando a viabilidade de se utilizar esse composto para promover a qualidade do extrato obtido, conforme observado na Tabela 5.

Para as reações de Nested-PCR com os iniciadores NS31-AM1 e NS31GC-AM1 observou-se banda para 14 e 20 diferente protocolos, respectivamente (Figura 23). No presente caso, como se utilizou uma única amostra de raiz não é de se esperar diferença na quantidade de alvos, entretanto, para alguns produtos a quantidade de inibidores na reação reduziu a atividade da enzima DNA polimerase o suficiente para reduzir a quantidade de produto de PCR na primeira reação, embora alguma amplificação provavelmente tenha ocorrido. Para a segunda PCR, a diluição do produto da primeira PCR associado ao fato de a quantidade de alvos ter sido aumentada na primeira PCR proporcionaram a visualização de produtos em um número maior de amostras. Esse resultado evidencia a eficiência do sistema em Nested-PCR em proporcionar a detecção de FMAs em amostras de raízes.

Para os produtos obtidos com os protocolos CTAB-DTT; CTAB-DTT-PVP; CTAB-DTT-PVPP-CA; CTAB-DTT-PVPP-K; CTAB-DTT-CA-PVP; CTAB-PVP; CTAB-PVP-CA; B-PVPP; não foi possível obter amplificação na segunda reação. Desta forma deve-se dar prioridade aos protocolos que proporcionaram a obtenção de produto nas reações de PCR ou etapas adicionais de purificação do extrato obtido devem ser analisadas para esses protocolos.

Os resultados apresentados sustentam a possibilidade de se utilizar PVP, PVPP, mas principalmente carvão ativado (CA), como aditivos ao tampão de extração para incrementar a pureza do extrato obtido a partir de amostras de raízes. Como a possibilidade de um protocolo ser definido como padrão é relativamente baixa, uma vez que a variabilidade de composição de diferentes amostras ambientais é elevada, os resultados aqui apresentados são significativamente importantes. Foram identificados protocolos que produzem extratos com baixa e elevada concentração de DNA e bom grau de pureza, cujo DNA está pronto para ser utilizado na PCR. Foram também identificados protocolos que produzem extratos com concentração elevada de DNA, mas que necessitam de purificação adicional antes da PCR.

4 - CONCLUSÕES

A concentração de DNA extraído utilizando-se tampão com o detergente CTAB foi superior à obtida usando o tampão com Tris-HCl-EDTA.

Não houve correlação entre pureza e concentração de DNA nos extratos obtidos.

Cinco protocolos avaliados produziram extratos com pureza entre 1,8 e 2,0 (TE-CA-PVP, TE-CA-PVPP, CTAB-PVP-CA-K, CTAB-PVPP-CA-K e CTAB-CA).

Entre os protocolos com pureza entre 1,8 e 2,0, os protocolos TE-CA-PVPP e CTAB-CA produziram extratos para nos quais se obteve amplificação em todas as reações de PCR testadas.

A adição de carvão ativado no tampão de extração proporcionou melhores resultados quando comparado com a adição de PVP, PVPP ou DTT.

O protocolo CTAB-CA mostrou ser muito viável, pois proporcionou bom rendimento de DNA e um extrato de qualidade.

CAPÍTULO IV

RELACÃO ENTRE DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICAS, FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E PLANTAS EM ÁREAS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA COM DIFERENTES IDADES DE REVEGETAÇÃO

RESUMO

A biodiversidade vegetal é de significativa importância para a manutenção da funcionalidade de ecossistemas naturais. Diferentes autores têm procurado determinar quais são os fatores determinantes da diversidade vegetal com o objetivo de melhor manejar esses ecossistemas. Recentemente demonstrou-se, em condições experimentais, que a diversidade de plantas responde positivamente à riqueza de FMAs no solo. Estes resultados foram empolgantes e desencadearam vários outros estudos, os quais levaram ao entendimento que ecossistemas naturais são formados por componentes interligados, localizados abaixo e acima do solo. No presente trabalho buscou-se avaliar a relação de riqueza e diversidade entre isolados de nódulos, FMAs e plantas em áreas com diferentes idades de revegetação. Observou-se baixa correlação entre a diversidade de microrganismos e de plantas, entretanto pôde-se notar que a natureza do relacionamento entre diversidade de plantas e de FMAs depende da composição de espécies, como proposto recentemente.

Palavras chave: Diversidade vegetal. Diversidade microbiana. Grupos funcionais.

ABSTRACT

Plant diversity is important to the functional maintenance of natural ecosystems. Several authors have tried to determine the determinants of plant diversity with the aim to enable better management of the ecosystems. Recently it was shown in experimental conditions that the plant diversity responds positively to arbuscular mycorrhizal fungi richness in soil. These results were exciting and have led to several other studies which led to the understanding that natural ecosystems are composed of interconnected components, located below and above-ground. The aim of this work was to evaluate the relationship of richness and diversity among nodule root bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and plants in the areas with different ages of revegetation. There was low correlation between the diversity of microorganisms and plants; however, it was possible to observe that the nature of relationship between diversity of plants and arbuscular mycorrhizal fungi depends of species composition as recently proposed.

Keywords: Plant diversity. Microbial diversity. Functional groups.

1 - INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm enfatizado a importância de microrganismos para o funcionamento dos ecossistemas naturais. Considerando os microrganismos como parte integral do ecossistema e avaliando a íntima relação entre microrganismos e plantas a literatura mostra a participação de microrganismos para a determinação da estrutura de comunidades de plantas, bem como, para a realização de processos de significativa importância para o sistema (van der Heijden et al., 2008 ; Wardle et al., 2004).

Por um lado, uma vez que diferentes espécies de plantas são compostas por diferentes compostos de carbono, havendo uma variação tanto na composição de exsudados radiculares quanto na composição de material depositado sobre o solo formando a serrapilheira, espera-se que a diversidade de microrganismos que possa crescer em solos sob comunidades de plantas diversas seja alta (Nüsslein e Tiedje, 1999; Jesus et al., 2009). Por outro lado, em um ecossistema com elevada diversidade de FMAs, através do efeito de complementaridade estes fungos podem possibilitar o incremento da diversidade e da produtividade de plantas (van der Heijden et al., 1998; 2006b; Santos, 2008).

Durante o crescimento das plantas uma gama de compostos orgânicos é liberada pelas raízes. Estes exsudados principalmente carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos são liberados no solo formando gradiente de concentração a partir da raiz. Este processo denominado de rizodeposição, associado ao processo de deposição de material vegetal sobre o solo, são de significativa importância ecológica por fornecerem “combustível” para a comunidade microbiana. Desta forma, mudanças na diversidade e composição da comunidade de plantas podem diretamente afetar a comunidade microbiana através da variação no tipo, complexidade e na quantidade de matéria orgânica depositada no solo (Benizri e Amiaud, 2005).

A composição da comunidade de plantas pode também indiretamente afetar a composição da comunidade microbiana através de mudanças ocasionadas no ambiente solo. Em função das características de crescimento, como profundidade e densidade de enraizamento e intensidade de cobertura vegetal, variações tanto na composição de plantas quanto na fenologia destas, podem acarretar mudanças no teor de umidade, na temperatura e no pH do solo (Nüsslein e Tiedje, 1999; Jesus et al., 2009).

van der Heijden et al. (1998) conduziram dois experimentos onde avaliaram o efeito da riqueza de FMAs sobre diferentes comunidades de plantas. No primeiro avaliaram o efeito da inoculação, isoladamente e de forma conjunta de quatro isolados de FMAs, sobre uma comunidade de plantas composta por 11 espécies distintas. No segundo avaliaram o efeito do incremento da riqueza de FMAs, variando entre zero e 14 sobre uma comunidade de plantas composta por 15 espécies. Foi observado que a redução da riqueza de FMAs de quatro para um ocasionou uma redução significativa da biomassa de várias espécies. Os autores propuseram que a diversidade e a produtividade do ecossistema aumentam com um incremento no número de táxons de fungos micorrízicos, uma vez que, estas foram mais elevadas em potes onde a riqueza de FMAs foi de oito ou 14, quando comparadas com microcosmos sem ou com a inoculação de apenas um isolado de fungo. Embora os experimentos tenham sido conduzidos de forma independente, produziram resultados similares. Os efeitos da riqueza de táxons de fungos foram justificados pelo aumento do comprimento das hifas, o que proporcionou um incremento no teor de fósforo nas plantas e um decréscimo do teor deste elemento no solo, proporcionando correlação positiva entre a diversidade de plantas e a produtividade do ecossistema.

Santos (2008) objetivando avaliar o efeito da riqueza de FMAs sobre a produtividade das espécies vegetais trema, fedegoso, aroeirinha e pau ferro em condições de cultivo individual e conjunto conduziu um experimento utilizando os tratamentos, controle sem inoculação, aplicação de alto teor de fósforo, a inoculação de uma (*Glomus etunicatum*), duas (*Glomus etunicatum* + *Gigaspora margarita*), quatro (*Glomus etunicatum* + *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata* + *Scutellospora heterogama*) e oito (*Glomus etunicatum* + *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata* + *Scutellospora heterogama* + *Gigaspora gigantea* + *Glomus clarum* + *Scutellospora pellucida* + *Entrophospora colombiana*) espécies de FMAs. Neste estudo o autor observou efeito significativo dos tratamentos, sobre a produção e distribuição de biomassa entre as espécies. Ocorreu incremento de produtividade vegetal e produção de biomassa mais equilibrada entre as espécies da comunidade, com o incremento da riqueza de FMAs. Evidenciando, dessa forma o efeito do incremento de riqueza de FMAs sobre a produtividade das plantas como observado por van der Heijden et al. (1998).

Os resultados permitiram aos autores concluir que a presença de fungos micorrízicos é requerida para manutenção de um nível básico de diversidade de plantas e que uma baixa diversidade do fungo pode levar a flutuações na composição e estrutura das comunidades de plantas.

Como uma evolução do entendimento da relação entre biota acima e abaixo do solo, van der Heijden et al. (2008) e Wardle et al. (2004) mencionam que os ecossistemas naturais são constituídos por componentes interligados, localizados abaixo e acima do solo, e que os microrganismos podem atuar por meio de mecanismos diretos e indiretos sobre a produtividade e diversidade de plantas. Estes autores propuseram modelos bastante complexos, mostrando várias possibilidades de ligações ecológicas entre os componentes da biota acima e abaixo do solo. Neste cenário observam-se mecanismos de controle, de um componente sobre o outro, com a participação de relações outras que não apenas entre simbioses. Ou seja, além das relações diretas por meio de interações de microrganismos associados às raízes estabelecendo relações mutualísticas, os autores mencionam a participação considerada também direta de microrganismos parasitas de plantas, bem como, a participação de microrganismos com capacidade de viverem livremente no solo, que alteram as taxas de suprimento de nutrientes e o particionamento de recursos, como efeitos indiretos.

Os autores argumentam que existem respostas positivas e negativas com forte capacidade de influência entre os componentes de cada compartimento. Enquanto as plantas fornecem o carbono necessário para os decompositores e organismos obrigatoriamente associados às raízes, os decompositores e os seus consumidores atuam sobre o material vegetal depositado determinando a disponibilidade de nutrientes, influenciando tanto o crescimento quanto a composição da comunidade (Wardle et al., 2004).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a relação entre a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas, fungos micorrízicos arbusculares e de espécies vegetais em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da relação entre diversidade acima e abaixo do solo foram utilizados os dados apresentados nos capítulos I e II, que tratam da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e de fungos micorrízicos arbusculares e dados relativos à composição florística das parcelas. Os dados relativos à composição de plantas de cada parcela foram gerados pelo pesquisador Dr. Rafael de Paiva Salomão (Museu Paraense Emilio Goeldi) e colaboradores (Salomão et al., 2007). Este pesquisador é o responsável pelo monitoramento da regeneração natural nas parcelas revegetadas pela Mineração Rio do Norte.

Calculou-se o coeficiente de correlação linear entre a riqueza e o índice de Shannon para as bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e para as espécies de plantas, bem como, o coeficiente de correlação linear entre a riqueza e o índice de Shannon para as bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e para a riqueza e proporção de espécies leguminosas e não leguminosas.

A relação entre diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e plantas nas áreas foi inicialmente verificada pelo coeficiente de correlação linear entre os valores de riqueza e índice de Shannon para cada grupo de organismo.

Posteriormente, as espécies de plantas foram agrupadas segundo o seu grupo ecológico (pioneira, secundária inicial, secundária tardia e clímax) e novamente calculou-se o coeficiente de correlação linear entre a riqueza e o índice de Shannon para a comunidade de FMAs e a riqueza e o índice de Shannon para cada grupo de planta.

Calculou-se utilizando o coeficiente de Bray-Curtis a similaridade entre as áreas em função dos dados da composição da comunidade de plantas, composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e em função dos resultados da análise química das amostras de terra. Realizou-se o teste de Mantel para verificação de correlação entre as matrizes de similaridade construídas com base em cada conjunto de dados e, dendrogramas de similaridade foram construídos para agrupamento das áreas.

Com base nos agrupamentos visualizados no dendrograma em relação à comunidade de plantas as áreas foram distribuídas em grupos de similaridade. Para cada um destes grupos novamente foi calculado o coeficiente de correlação linear entre os valores de riqueza e índice de Shannon entre a comunidade de plantas e a comunidade de FMAs.

Para realização das análises foi utilizado o programa Past - PAlaeontological STatistics (Hammer et al., 2001).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos dados relativos à composição de plantas para 32 das 43 parcelas estudadas nos capítulos I e II. Dessa forma a relação entre diversidade acima e abaixo do solo foi avaliada em quatro parcelas para a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas (1981A1, 1985A1, 1993A2 e 1998A1) e 32 para a diversidade de FMAs.

Considerando as 32 parcelas para as quais os dados da composição florística estavam disponíveis um total de 177 espécies foi encontrado. Destas 73, 48, 47 e 9 foram classificadas como clímax, secundárias tardias, secundárias iniciais e pioneiras, respectivamente.

Na Tabela 6 são apresentados os valores para o coeficiente de correlação linear observados entre a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e de plantas. Os valores observados foram não significativos, de uma maneira geral os valores de correlação foram baixos e pôde-se observar correlação negativa para os parâmetros riqueza e diversidade entre as comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e de plantas. Foi observada correlação positiva entre o índice de Shannon para a comunidade de plantas e a riqueza de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas avaliada por ARDRA; riqueza e Shannon por ARDRA e riqueza por BOX em relação à proporção de espécies não leguminosas; Shannon por BOX e proporção de espécies leguminosas; riqueza por ARDRA e proporção de espécies de plantas que formam nódulos e, por fim entre, proporção de espécies de plantas que não formam nódulos e riqueza por ARDRA e Shannon (Tabela 6).

Os resultados mostram, para as parcelas aqui avaliadas, que não se pôde observar maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas nas parcelas em que se observou maior diversidade de plantas, nem mesmo quando se considerou a proporção de espécies leguminosas ou leguminosas nodulíferas. No presente caso como o número de parcelas avaliadas e os valores observados para os coeficientes de correlação foram baixos não se pode concluir com precisão que ocorre correlação negativa entre diversidade de plantas e de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas. Novos estudos considerando diferentes níveis de diversidade destes simbioss devem ser conduzidos para elucidar essa questão, uma vez que tem sido aceito que a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas deve refletir a diversidade de espécies de leguminosas na área.

A família leguminosa é a mais rica em número de espécies e está entre as cinco famílias de maior densidade na Amazônia (Moreira et al., 1992), entretanto, Jesus et al. (2005a) e Lima et al. (2009) observaram menor nível de diversidade de bactérias nodulíferas em leguminosas em áreas sob floresta na Amazônia brasileira quando comparado com áreas sob cultivo e, não foi observado relacionamento entre a diversidade de espécies de leguminosas e a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas (Lima et al., 2009). Segundo estes autores o fato de maior diversidade ter sido encontrado em áreas sob cultivo sugere alto grau de resiliência da comunidade de bactérias nodulíferas às mudanças de uso da terra após o desmatamento.

Observou-se que os valores de correlação linear entre riqueza e índice de Shannon foram elevados e estatisticamente significativos para a comunidade de plantas (Tabela 7). Por outro lado a correlação entre riqueza e índice de Shannon para a comunidade de FMAs foi baixa e não significativa, evidenciando que as populações de FMAs não estão uniformemente distribuídas dentro das comunidades para cada amostra de terra analisada.

Quando se levou em conta todas as espécies de plantas encontradas nas parcelas observou-se correlação baixa, não significativa, para riqueza e índice de Shannon entre as comunidades de plantas e de FMAs. Esses resultados mostram que para parcelas revegetadas

após atividade de mineração de bauxita, a maior diversidade de plantas não necessariamente foi acompanhada por maior diversidade de FMAs.

Alguns trabalhos têm mostrado comportamento diferenciado entre espécies vegetais pertencentes a diferentes grupos sucessionais e a associação micorrízica. Espécies pioneiras e secundárias iniciais que são generalistas apresentam alta suscetibilidade a infecção, alta colonização e alto grau de resposta a micorriza frequentemente predominam em áreas abertas com alto potencial de inóculo, enquanto, espécies consideradas secundárias tardias e clímax que são mais restritivas à colonização apresentam reduzido grau de infecção, reduzidas taxas de colonização e de resposta micorrízica, predominam no interior de florestas, onde o potencial de inóculo é baixo (Siqueira et al., 1998; Zangaro et al., 2000; 2002; 2003; 2005; Pouyu-Rojas et al., 2006).

Para avaliar a relação entre a comunidade de FMAs e espécies de plantas pertencentes a diferentes grupos sucessionais, calculou-se o coeficiente de correlação linear para riqueza e índice de Shannon (Tabela 7). A correlação foi baixa e não significativa, dessa forma não se pôde afirmar que houve correlações positivas entre a diversidade de FMAs e a diversidade plantas pertencentes a qualquer um dos quatro grupos ecológicos.

Tabela 6: Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e a comunidade de plantas para as parcelas 1981A1, 1985A1, 1993A2 e 1998A1.

Isolados de nódulos	Todas as plantas		Espécies Leguminosas		Espécies não Leguminosas		Espécies nodulíferas		Espécies não nodulíferas	
	Riqueza	Shannon	Riqueza	Proporção	Riqueza	Proporção	Riqueza	Proporção	Riqueza	Proporção
Riqueza ARDRA	-0,335 ^{ns}	0,141 ^{ns}	-0,341 ^{ns}	-0,359 ^{ns}	-0,329 ^{ns}	0,359 ^{ns}	-0,198 ^{ns}	0,149 ^{ns}	-0,400 ^{ns}	-0,149 ^{ns}
Riqueza BOX-PCR	-0,570 ^{ns}	-0,127 ^{ns}	-0,564 ^{ns}	-0,080 ^{ns}	-0,572 ^{ns}	0,080 ^{ns}	-0,472 ^{ns}	-0,160 ^{ns}	-0,610 ^{ns}	0,160 ^{ns}
Shannon ARDRA	-0,532 ^{ns}	-0,077 ^{ns}	-0,534 ^{ns}	-0,143 ^{ns}	-0,529 ^{ns}	0,143 ^{ns}	-0,413 ^{ns}	-0,065 ^{ns}	-0,585 ^{ns}	0,065 ^{ns}
Shannon BOX-PCR	-0,646 ^{ns}	-0,223 ^{ns}	-0,638 ^{ns}	0,019 ^{ns}	-0,649 ^{ns}	-0,019 ^{ns}	-0,559 ^{ns}	-0,254 ^{ns}	-0,679 ^{ns}	0,254 ^{ns}

^{ns} – Valor de correlação não significativo a 5% de probabilidade. ARDRA- Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado.

Tabela 7: Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a comunidade de plantas para 32 parcelas avaliadas.

Correlação linear	Todas as plantas		Espécies CL		Espécies ST		Espécies SI		Espécies PI		FMA	
	Riqueza	Shannon	Riqueza	Shannon	Riqueza	Shannon	Riqueza	Shannon	Riqueza	Shannon	Riqueza	
Riqueza PL												
Shannon PL	0,851*											
Riqueza CL	0,752*	0,524*										
Shannon CL	0,561*	0,558*	0,824*									
Riqueza ST	0,588*	0,658*	0,142 ^{ns}	0,061 ^{ns}								
Shannon ST	0,482*	0,667*	0,031 ^{ns}	-0,035 ^{ns}	0,916*							
Riqueza SI	0,683*	0,551*	0,264 ^{ns}	0,142 ^{ns}	0,190 ^{ns}	0,167 ^{ns}						
Shannon SI	0,616*	0,662*	0,095 ^{ns}	0,000 ^{ns}	0,339 ^{ns}	0,371*	0,880*					
Riqueza PI	0,333 ^{ns}	0,445*	0,124 ^{ns}	0,075 ^{ns}	0,313 ^{ns}	0,304 ^{ns}	0,055 ^{ns}	0,269 ^{ns}				
Shannon PI	0,308 ^{ns}	0,462*	0,102 ^{ns}	0,068 ^{ns}	0,322 ^{ns}	0,324 ^{ns}	0,041 ^{ns}	0,254 ^{ns}	0,921*			
Riqueza FMAs	0,047 ^{ns}	0,200 ^{ns}	0,110 ^{ns}	0,160 ^{ns}	0,273 ^{ns}	0,328 ^{ns}	-0,239 ^{ns}	-0,142 ^{ns}	-0,091 ^{ns}	0,038 ^{ns}		
Shannon FMAs	0,139 ^{ns}	0,327 ^{ns}	0,194 ^{ns}	0,164 ^{ns}	0,080 ^{ns}	0,197 ^{ns}	-0,057 ^{ns}	0,211 ^{ns}	0,214 ^{ns}	0,239 ^{ns}	0,243 ^{ns}	

PL- Todas as espécies de plantas; CL-Clímax; ST-Secundária tardia; SI- Secundária inicial, PI- Pioneira e FMAs fungos micorrízicos arbusculares.

^{ns} – Valor de correlação não significativo a 5% de probabilidade.

* – Valor de correlação significativo a 5% de probabilidade.

O'Connor et al. (2002) realizaram ensaio, para avaliar o efeito dos FMAs sobre a diversidade e produtividade de plantas. Neste caso os autores optaram por suprimir as fontes de inóculo de FMAs pela aplicação de fungicida, buscando assim comparar a riqueza de plantas e a estrutura da comunidade estabelecida sobre o substrato que não recebeu a aplicação e o que recebeu a aplicação de fungicida. Estes autores observaram alteração significativa na estrutura de comunidade de plantas pela supressão dos fungos micorrízicos. Neste estudo a espécie vegetal dominante foi uma espécie responsiva à colonização micorrízica e teve a sua produtividade reduzida pela supressão dos fungos, o que acarretou um incremento na biomassa das demais espécies e um incremento na diversidade da comunidade quando avaliada pelo índice de Shannon.

Estes autores defenderam a hipótese de que os efeitos dos FMAs sobre a comunidade de plantas não são absolutos, mas dependem da responsividade das espécies à micorriza, especialmente da espécie dominante. Neste caso, os autores destacam que as duas espécies mais abundantes no tratamento controle (*Medicago minima* e *Carrichtera annua*) foram afetadas diferentemente pela redução da atividade dos fungos micorrízicos como resultado da aplicação do fungicida. A espécie dominante e altamente responsiva à micorriza *M. minima* teve a produtividade reduzida, enquanto a não micorrízica *C. annua* teve a produção de biomassa incrementada no tratamento com supressão de fungos micorrízicos. Enfatizando que a participação das espécies subordinadas foi importante, mas não tão importante quanto, as espécies dominantes, na determinação da estrutura da comunidade.

Com base nestes resultados, incorporaram a noção de que a participação dos microrganismos do solo na diversidade de plantas varia em função da comunidade de plantas analisadas, sendo principalmente influenciada pela relação entre estes simbioss e a espécie vegetal dominante. De forma que o efeito regulatório destes simbioss sobre a estrutura da comunidade de plantas vai depender da identidade e das características funcionais das espécies vegetais.

Stürmer et al. (2006) avaliaram a diversidade de FMAs em áreas em estágio de sucessão secundária da floresta Atlântica e observaram que o índice de diversidade de Simpson e a equitabilidade para as espécies de FMAs não diferiram significativamente entre os estágios sucessionais. Neste trabalho, os autores observaram que a riqueza específica de FMAs foi negativamente correlacionada com a riqueza específica vegetal.

Flores-Ayala et al. (2003) observaram efeitos contrastantes da inoculação de FMA sobre a competitividade de plantas crescendo em comunidade, quando se alterou o nível de disponibilidade de fósforo no solo. Evidenciando que os efeitos dos FMAs sobre a competição entre plantas e por consequência sobre a diversidade vegetal, variam não somente em função da composição da comunidade de plantas, mas também em função do nível de fertilidade do sítio analisado.

Como não foi observada elevada correlação entre a diversidade de FMAs e de plantas quando se considerou todos os dados, procurou-se avaliar o efeito da composição da comunidade de planta sobre o relacionamento com os FMAs. Para isso foi realizado o agrupamento das áreas com base nas características químicas do solo, com base na composição da comunidade de FMAs e, por fim com base na composição das comunidades de plantas.

Foi possível concluir baseado nos dendrogramas de similaridade e no resultado do teste de Mantel (Tabela 8, Figura 24) que a correlação entre as matrizes foi baixa e não significativa, exceto para as matrizes construídas com base na composição da comunidade de FMAs e características químicas do solo. Estes dados mostram que as áreas foram agrupadas de formas diferentes quando se considera a composição de plantas, composição de FMAs e as características químicas do solo. O que foi confirmado pela baixa correspondência entre os agrupamentos nos três dendrogramas.

Dessa forma, as áreas foram distribuídas em nove grupos de similaridade (Figura 24C) para os quais o relacionamento entre diversidade de FMAs e espécies vegetais foi avaliado caso a caso (Tabela 9). Como os grupos 7, 8 e 9 apresentaram apenas duas áreas cada um, estes foram combinados em um só grupo.

O efeito da composição da comunidade de plantas sobre o relacionamento entre diversidade de plantas e FMAs pôde ser observado. A riqueza de FMAs foi negativamente correlacionada ao índice de Shannon da comunidade de plantas nos grupos 3 e 5 e positivamente correlacionada nos demais grupos, onde o valor foi baixo para a combinação dos grupos 7, 8 e 9 (0,076) e alto (0,828) no grupo 2. O índice de Shannon da comunidade de FMAs foi positivamente correlacionado à riqueza de plantas no grupo 1 e negativamente nos demais, com destaque para os valores de 0,935 no grupo 1 e -0,768 no grupo 5.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram as argumentações de O'Connor et al. (2002); Flores-Aylas et al. (2003); Urcelay e Díaz (2003); Wardle et al. (2004) e van der Heijden et al. (2008) de que ecossistemas naturais apresentam elevada complexidade e que a natureza do relacionamento entre diversidade de plantas e de FMAs depende da composição de espécies.

Tabela 8: Valores de correlação (abaixo da diagonal) e valores de probabilidade (acima da diagonal) obtidos pelo teste de Mantel entre as três matrizes de similaridade calculadas pelo coeficiente de Bray-Curtis.

Teste de Mantel / probabilidade	Solo	Composição de FMAs	Composição de plantas
Solo	1	0,000	0,143
Composição de FMAs	0,446	1	0,366
Composição de plantas	0,109	0,24	1

As matrizes de similaridade foram calculadas utilizando o coeficiente de Bray-Curtis e foram utilizadas 1000 permutações no teste de Mantel.

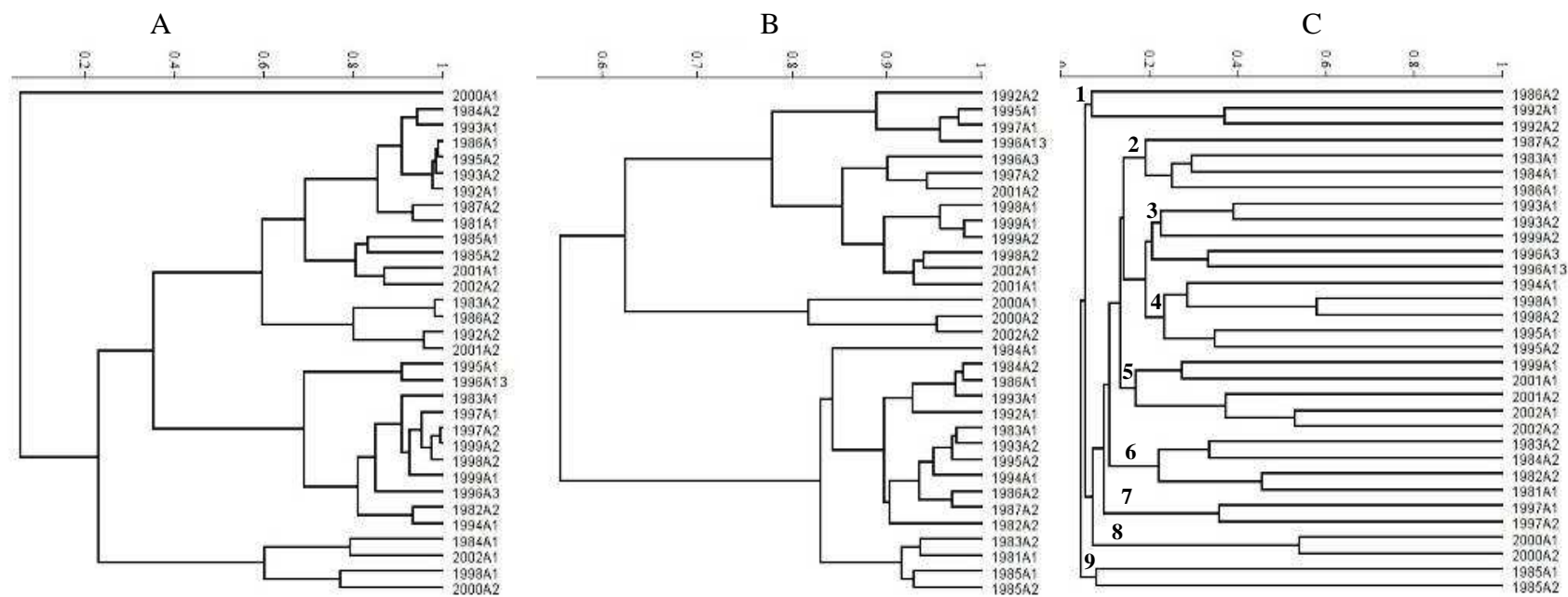


Figura 24: Dendrogramas de similaridade construídos com o coeficiente de Bray-Curtis e método de agrupamento UPGMA, baseados (A) na composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs); (B) nos valores para os diferentes parâmetros avaliados pela análise química de solo e (C) na composição da comunidade de espécies de plantas.

Tabela 9: Valores observados para o coeficiente de correlação linear para os parâmetros riqueza e diversidade entre a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a comunidade de plantas para os nove grupos distintos, identificados pela análise de agrupamento, com base na composição da comunidade de plantas.

Grupos	Riqueza de plantas	Diversidade de plantas Shannon
1	-0,277 ^{ns}	0,155 ^{ns}
2	-0,43 ^{ns}	0,828 ^{ns}
3	-0,799 ^{ns}	-0,156 ^{ns}
4	0,229 ^{ns}	0,166 ^{ns}
5	-0,558 ^{ns}	-0,526 ^{ns}
6	-0,272 ^{ns}	0,142 ^{ns}
7, 8, 9	0,104 ^{ns}	0,076 ^{ns}
1	0,935 ^{ns}	0,997 *
2	-0,533 ^{ns}	0,329 ^{ns}
3	-0,053 ^{ns}	0,944 *
4	-0,237 ^{ns}	0,385 ^{ns}
5	-0,768 ^{ns}	-0,829 ^{ns}
6	-0,446 ^{ns}	-0,725 ^{ns}
7, 8, 9	0,483 ^{ns}	0,306 ^{ns}

PL- Todas as espécies de plantas; CL-Clímax; ST-Secundária tardia; SI- Secundária inicial e PI- Pioneira.

^{ns} – Valor de correlação não significativo a 5% de probabilidade.

* – Valor de correlação significativo a 5% de probabilidade.

4 – CONCLUSÕES

Não houve correlação entre a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e de espécies vegetais.

Não houve correlação entre diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e a proporção de espécies leguminosas ou espécies nodulíferas.

Não houve correlação entre riqueza e índice de Shannon entre as comunidades de FMAs e de plantas.

Houve efeito da composição da comunidade de plantas sobre a relação entre diversidade de plantas e de FMAs.

CONCLUSÕES GERAIS

Com relação à diversidade de isolados de nódulos pôde se perceber que as diferentes amostras de terra utilizadas como inóculo não promoveram a nodulação em *Mimosa acutistipula* e, observou-se efeito do tempo de revegetação das áreas sob a diversidade de isolados de nódulos obtidos de siratro, onde as áreas revegetadas a mais tempo mostraram maiores níveis de riqueza. Observou-se que a área sob Floresta apresentou menor nível de riqueza e diversidade que as áreas revegetadas e os valores do coeficiente de correlação foram baixos e negativos entre a diversidade de isolados de nódulos e de espécies vegetais.

Com relação à diversidade de FMAs, 13 espécies foram encontradas e observou-se predomínio da espécie *Glomus macrocarpum*, sendo que 96,65% dos esporos encontrados pertenceram a essa espécie. Não foi observado relação entre a diversidade de FMAs e o tempo de revegetação das áreas. Observou-se redução da diversidade de FMAs, avaliada pelo índice de Shannon, nas áreas revegetadas recentemente, em especial para as áreas revegetadas após o ano de 2000. Houve baixa correlação para riqueza e índice de Shannon entre as comunidades de FMAs e de plantas, evidenciando que não necessariamente áreas com maior diversidade de plantas contêm maior diversidade de FMAs. Entretanto pôde-se observar efeito da comunidade de plantas sobre o relacionamento entre diversidade de plantas e FMAs.

Cinco protocolos de extração de DNA avaliados produziram extratos com pureza entre 1,8 e 2,0 e dois produziram extratos com pureza entre 1,8 e 2,0 para os quais foi possível obter amplificação em todas as reações de PCR testadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para Wardle et al. (2004), embora ainda haja poucas evidências, os efeitos da biodiversidade de organismos do solo sobre os atributos (diversidade, produtividade e composição) das comunidades acima do solo são dependentes do contexto, podendo ser negativos ou positivos, dependendo dos organismos do solo considerados (simbiontes, decompositores ou patógenos), do papel da espécie de planta na comunidade (grupo funcional a que pertence), da posição na curva de dominância (dominantes ou subordinadas) e da fertilidade do solo.

A compreensão das ligações existentes entre a diversidade de plantas e a composição da comunidade microbiana do solo está apenas se iniciando (Carney e Matson, 2006). Entretanto, para esses autores os métodos utilizados nos diferentes sistemas de estudo para detectar a mudança na comunidade microbiana e a variação na produtividade das plantas, provavelmente influenciam a natureza deste relacionamento.

Nüsslein e Tiedje (1999) e Jesus et al. (2009) encontraram menor nível de diversidade bacteriana em áreas sob floresta quando comparada com áreas sob pastagens. Embora esses resultados possam ser em parte entendidos pela alteração de pH do solo ocasionada pela alteração de uso da terra (Fierer e Jackson, 2006) o fato de pastagens apresentar maior nível de diversidade que uma área de Floresta com elevada diversidade de plantas ainda é intrigante.

Harris (2009) aponta que a relação entre biomassa de fungo e de bactéria muda ao longo do processo de sucessão. Em estágios iniciais de sucessão observa-se uma relação mais baixa, com o predomínio em biomassa de bactérias, quando comparada com uma floresta em estágio mais avançado, onde se observa uma dominância de biomassa fúngica. Dessa forma, um levantamento completo da relação entre diversidade acima e abaixo do solo, deve considerar a composição e diversidade de comunidades de bactérias e de fungos.

Para entender o complexo padrão de biodiversidade em ecossistemas naturais e sobre tudo, seu relacionamento com as funções do ecossistema, uma abordagem que permita a avaliação conjunta dos compartimentos acima e abaixo do solo faz-se necessária (Rodríguez-Loinaz et al., 2008). Considerando os resultados apresentados conclui-se que a demanda de estudos para elucidar a complexa relação entre diversidade acima e abaixo do solo ainda é alta.

O objetivo presente é continuar com estudos nessa linha. Os resultados apresentados aqui permitiram observar que as práticas de revegetação utilizadas estão possibilitando a recomposição em termos de biodiversidade das parcelas, entretanto, as áreas avaliadas não estão funcionando como experimentos naturais, ou seja, não são áreas onde apenas um fator conhecido está agindo. Provavelmente, as práticas utilizadas para a revegetação, bem como, a posição na paisagem de cada parcela estão influenciando os resultados. Dessa forma, a seleção de parcelas específicas deve ser considerada a partir de agora, o que possibilitará a redução no número de áreas, mas por outro lado o incremento no número de amostras de cada área em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology and Biochemistry*, v.38, p.1298–1307, 2006.
- ARAS, S.; DURAN, A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis l.* specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.21, p.461–461, 2003.
- ASNER, G.P.; HUGHES, R.F.; VITOUSEK, P.M.; KNAPP, D.E.; KENNEDY-BOWDOIN, T.; BOARDMAN, J.; MARTIN, R.E.; EASTWOOD, M.; GREEN, R.O. Invasive plants transform the three-dimensional structure of rain forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.11, p. 4519-4523, 2008.
- BAHNWEG, G.; SCHULZE, S.; MÖLLER, E.M.; ROSENBROCK, H.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN JR, H. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Annals of Biochemistry*, v.262, p.79-82, 1998.
- BENIZRI, E.; AMIAUD, B. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, p.2055–2064, 2005.
- BORGES, W.L.; SANTOS, C.E.R.S.; XAVIER, G.R.; RUMJENK, N.G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.2, n.1, p.32-37, 2007.
- CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A.; BERBARA, R.L.L.; TRUFEM, S.B.; GRANHA, J.R.D.O.; MONTEIRO, A.B. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.12, p. 1409-1418, 2003.
- CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A.; BERBARA, R.L.L.; GRANHA, J.R.D.O.; MARINHO, N.F. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. *Revista Árvore*, v.29, n.3, p.373-381, 2005.
- CARNEY, K.M.; MATSON, P.A. The Influence of Tropical Plant Diversity and Composition on Soil Microbial Communities. *Microbial Ecology*, v.52, p.226–238, 2006.
- CARRENHO, R.; SILVA, E.S.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.32, n.4, p.262-270, 2001.
- CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America.

Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.11, p.7461–7471, 2005.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S.Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.57, p.1055-1059, 2007.

CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.58, p.2174-2179, 2008.

CLAPP, J.P.; HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; YOUNG, J.P.W. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: Mycorrhizal Ecology (Eds. van der Heijden, M.G.A.; Sanders, I.R.) pp. 201–224. Springer, Heidelberg. 2002.

COLWELL, R. K. Estimates: statistical estimation of species richness and shared species from samples. EstimateS 8.2 User's Guide. Disponível em <<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>>. Acessado em 19 de junho de 2010.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T.; SCANNELL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.99, p-10494–10499, 2002.

de SOUZA, F.A.; TRUFEM, S.F.B.; ALMEIDA, D.L.; SILVA, E.M.R.; GUERRA, J.G.M. Efeito de pré-cultivos sobre o potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e produção da mandioca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, n. 10, p. 1913-1923, 1999.

de SOUZA, F.A.; DALPE, Y.; DE LA PROVIDENCIA, I; SESALON-DELMAS, N.; DECLERCK, S. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from root organ culture. In: DECLERCK, S.; STRULLU, DÉSIÉ-GEORGES; FORTIN, J. ANDRÉ. (Org.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. 1 Ed. Springer-Verlag: Heidelberg: Springer-Verlag, v. 4, p. 73-91, 2005.

de SOUZA, F.A.; DA SILVA, I.C.L.; BERBARA, R.L.L. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA; F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIJBERT, B. (Org.). Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros. Lavras, MG: Editora UFLA, v.1, p. 483-536, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa do Solo. Manual de métodos de análise de solos. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

FÆGRI, A.; TORSVIK, V.L.; GOKSØYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry*, v.9, p.105-112, 1977.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n.3, p-626–631, 2006.

FLORES-AYLAS, W.W.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.2, p.257-266, 2003.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p.897-903, 1997.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, v.38, p.1–15, 1999.

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*, v.46, p.235-244, 1963.

GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.217-229, 2006.

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

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, v.36, n.9, p.1389-1398, 2004.

GUADARRAMA, P.; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, F.J. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, México. *Mycorrhiza*, v.8, p.267–270, 1999.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v.4, n1, art.a, 9p, 2001.

HARRIS, J. Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? *Science*, v.325, p-573-574, 2009.

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

van der HEIJDEN, M.G.A.; BAKKER, R.; VERWAAL, J.; SCHEUBLIN, T.R.; RUTTEN, M.; VAN LOGTESTIJN, R.; STAEHELIN, C. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity um dune grassland. *FEMS Microbiological Ecology*, v.56, p.178-187, 2006a.

van der HEIJDEN, M.G.A.; STREITWOLF-ENGEL, R.; RIED, R.; SIEGRIST, S.; NEUDECKER, A.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, v.172, p.739-752, 2006b.

van der HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, v.11, p.296–310, 2008.

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

HSU, S.F.; BUCKLEY, D.H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *The ISME Journal*, v.3, p.124–136, 2009.

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

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; YOUNG, J.P.W. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, v.42, p.131-136, 2002b.

JACKSON, C.R.; HARPER, J.P.; WILLOUGHBY, D.; RODEN, E.E.; CHURCHILL, P.F. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.4993-4995, 1997.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, v.48, p.1-692, 1964.

JESUS, E.C. MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.8, p.769-776, 2005a.

JESUS, E.C.; SCHIAVO, J.A.; FARIA, S.M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 545-552, 2005b.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, v.3, n.9, p.1004-1011, 2009.

JOHNSON, N.C.; ZAK, D.R.; TILMAN, D.; PFLEGER, F.L. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia*, v.86, n.3, p.349-358, 1991.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of

rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, v.32, p.210–220, 2006.

KOWALCHUK, G.A.; de SOUZA, F.A.; van VEEN, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*, v.11, p.571–581, 2002.

KRIZMAN, M.; JAKSE, J.; BARICEVIC, D.; JAVORNIK, B.; PROSEK, M. Robust CTAB-activated charcoal protocol for Plant DNA extraction. *Acta Agriculturae Slovenica*, v.87, n.2, p.427-433, 2006.

KRÜGER, M.; STOCKINGER, H.; KRÜGER, C.; Schüßler, A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, v.183, p.212–223, 2009.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.56-63, 1994.

LAKAY, F.; BOTHA, A.; PRIOR, B. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*, v.102, p.265–273, 2007.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. *Science*, v.312, p-1917, 2006.

LEAL, P.L.; STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.111-121, 2009.

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

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A. DA SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). *Plant and Soil*, v.20, p.1-19, 2009.

LOVELOCK, C.E.; ANDERSEN, K.; MORTON, J.B. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, v.135, p.268–279, 2003.

MAGURRAN, A.E. *Ecological diversity and its measurement*. New Jersey: Princeton, 1987. 179p.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NOBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol.30, n.2, p. 235-246, 2006.

MILLER, D.N.; BRYANT, J.E.; MADSEN, E.L.; GHIORSE, W.C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.11, p.4715-4724, 1999.

MILLER, D.N. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, v.44, n.1, p.49-58, 2001.

MRN- Mineração Rio do Norte, Operação: Perfil Litológico da Jazida e Sequência Operacional. Disponível em http://www.mrn.com.br/index_1024.htm. Acessado em 10 de novembro de 2010.

MOREIRA, F.M.M.; da SILVA, M.F.; de FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytologist*, v.121, p.563-570, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, v.7, n.7, p.889-895, 1998.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2ª Edição Atual. e Ampl. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

MORTON, J.B.; MSISKA, Z. Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza*, v.20, n.7, p.483-496, 2010.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Proteobacteria. *Nature*, v.411, p.948-950, 2001.

NAZAR, R.N.; ROBB, E.J.; VOLOSSIOUK, T. Direct Extraction of fungal DNA from Soil. In: KOWALCHUK, G.A.; BRUIJN, F.J.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A.D.; van ELSAS, J.D (ed.). *Molecular microbial ecology manual*. 2 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p.171-180.

NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v. 29, p. 214-235, 1964.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J.M. soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.3622-3626, 1999.

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

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

ORSINI, M.; ROMANO-SPICA, V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in applied microbiology*, v.33, n.1, p. 17-20, 2001.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, v.55, n.1, p-158-161, 1970.

PICONE, C. Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica*, v.32, n.4a, p.734-750, 2000.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O.; SANTOS, J.G.D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p. 413-424, 2006.

REIS JÚNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M., ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; DE QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.-M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; DE FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v.186, p.934-946, 2010.

RODRÍGUEZ-LOINAZ, G.; ONAINDIA, M.; AMEZAGA, I.; MIJANGOS, I.; GARBISU, C. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests, *Soil Biology and Biochemistry*, v.40, p.49-60, 2008.

SALOMÃO, R.P.; ROSA, N.A.; MORAIS, K.A.C. Dinâmica da regeneração natural de árvores em áreas mineradas na Amazônia. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, v. 2, n. 2, p. 85-139, 2007.

SANTOS, C.E.R.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

SANTOS, J.G.D. dos. Riqueza de fungos micorrízicos arbusculares no solo e crescimento inicial de espécies arbóreas nativas. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Departamento de Solos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SATHYANARAYANA, N.; KUMAR, T.N.B.; VIKAS, P.B.; RAJESHA, R. In vitro clonal propagation of *Mucuna pruriens* var. *utilis* and its evaluation of genetic stability through RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n.8, p.973-980, 2008.

SCHENCK, N.C.; PERÉZ, Y. Manual for identification of VA mycorrhizal fungi. 3 ed. Gainesville: Synergistic Publications, 1990. p.250.

SCHEUBLIN, T.R.; RIDGWAY, K.P.; YOUNG, J.P.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Nonlegumes, legumes and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.6240-6246, 2004.

SCHNEEGURT, M.A.; DORE, S.Y.; KULPA JR., C.F. Direct Extraction of DNA from Soils for Studies in Microbial Ecology. *Current Issues in Molecular Biology*, v.5, p.1-8, 2003.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. Syst Appl Microbiol, August, v.33, n.5, p.269-274, 2010.

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

SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C.; CURI, ROSADO, N.S.C.S.; DAVIDE, A.C. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. Forest Ecology and Management, v.107, p.241–252, 1998.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. Mycorrhiza, v.11, p.245–255, 2001.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; DO VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi (1). Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.30, n.5, p.795-802, 2006a.

SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; DO VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – Feijoeiro. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.30, n.5, p.803-811, 2006b.

STACH, J.E.; BATHE, S.; CLAPP, J.P.; BURNS, R.G. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. FEMS Microbiology Ecology, v.36, p.139-151, 2001.

STEIN, N., HERREN, G. AND KELLER, B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breeding, v.120, p.354–356, 2001.

STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.32, n.3, p. 1107-1120, 2008.

STÜRMER, S.L.; KLAUBERG FILHO, O.; QUEIROZ, M.H.; MENDONCA, M.M. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic Forest in South Brazil. Acta Botanica Brasilica, v.20, n.3, pp. 513-521, 2006.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Ecossistemas Brasileiros. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. Eds. Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros – Lavras: Ed. UFLA, 2008. p.537-583.

POREBSKI, L.S.; BAILEY, G.; BAUM, B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, v.15, n.1, p.8-15, 1997.

- TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.1, p. 201-208, 2010.
- TILMAN, D.; REICH, P.B.; KNOPS, J.; WEDIN, D.; MIELKE, T.; LEHMAN, C. Diversity and Productivity in a Long-Term Grassland Experiment. *Science*, v.294, p.843-845, 2001.
- URCELAY, C.; DÍAZ, S. The mycorrhizal dependence of subordinates determines the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant diversity. *Ecology Letters*, v.6, p.388–391, 2003.
- VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J.R.P.; JUNG, G.C; GRANADA, C.E.; NEVES, A.G.; BRAGA, M.M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, n.4, p.647-654, 2007.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, v.5, n.1, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodulate bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IPB Handbook, 15).
- VOLOSSIOUK, T., ROBB, E.J. AND NAZAR, R.N. Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3972-3976, 1995.
- WARDLE, D.A.; BARDGETT, R.D.; KLIRONOMOS, J.N.; SETÄLÄ, H.; van der PUTTEN, W.H.; WALL, D.H. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*, v.304, p.1629-1633, 2004.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SMINSKI, J. J.; WHITE, T.J. (eds). *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, v.287, n.1-2, p.3-14, 2006.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.2271-2277, 1991.
- ZAK, D.R.; HOLMES, W.E.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A.D.; TILMAN, D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology*, v.84, n.8, p.2042-2050, 2003.
- ZANGARO, W.; BONONI, V.L.R.; TRUFEN, S.B. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.16, p.603-622, 2000.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.; NAKANO, E.M.; DOMINGOS, J.C.B. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi, Paraná. *Cerne*, v.8, n.1, p.77-87, 2002.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.19, p.315-324, 2003.

ZANGARO, W.; NISHIDATE, F.R.; CAMARGO, F.R.S.; ROMAGNOLI, G.G.; VANDRESSEN, J. Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.21, p.529-540, 2005.

ZANGARO, W.; NISHIDATE, F.R.; VANDRESEN, J.; ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.23, p.53-62, 2007.

ZANGARO, W.; ASSIS, R.L.; ROSTIROLA, L.V.; SOUZA, P.B.; GONÇALVES, M.C.; ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Changes in arbuscular mycorrhizal associations and fine root traits in sites under different plant successional phases in southern Brazil. *Mycorrhiza*, v.19, p.37-45, 2008.

ZHANG, H.; TANG, M.; CHEN, H.; TIAN, Z.; XUE, Y.; FENG, Y. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of *Caragana korshinkii* and *Hippophae rhamnoides* in Zhifanggou watershed. *Plant and Soil*, v.326, n.1-2, p.415-424, 2009.

ZILLI, J.É.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.281-287, 2004.