

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

Análise Molecular da Inoculação a Campo do Fungo
Micorrízico Arbuscular (FMA) *Glomus clarum*
CNPAB5 em plantas de milho, crotalária e batata-
doce

Gabriel Corradi Azevedo

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA E FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**ANÁLISE MOLECULAR DA INOCULAÇÃO A CAMPO DO FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR (FMA) *Glomus clarum* CNPAB5 EM
PLANTAS DE MILHO, CROTALÁRIA E BATATA-DOCE**

GABRIEL CORRADI AZEVEDO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Francisco Adriano de Souza

e Co-orientação da Professora
Dr^a. Eliane Aparecida Gomes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

Seropédica, RJ
Outubro de 2010

579.5

A994a

T

Azevedo, Gabriel Corradi, 1986-

Análise molecular da inoculação a campo do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* CNPAB5 em plantas de milho, crotalária e batata-doce/ Gabriel Corradi Azevedo. - 2010.

72f. : il.

Orientador: Francisco Adriano de Souza.

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia aplicada.

Bibliografia: p. 54-63.

1. Fungos micorrízicos - Teses. 2. *Glomus* (Fungo) - Teses. 3. Plantas - Biologia molecular - Teses I. Souza, Francisco Adriano, 1964- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia aplicada. III. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA E FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

**ANÁLISE MOLECULAR DA INOCULAÇÃO A CAMPO DO FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR (FMA) *Glomus clarum* CNPAB5 EM PLANTAS DE
MILHO, CROTALÁRIA E BATATA-DOCE**

GABRIEL CORRADI AZEVEDO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/10/2010.

BANCA EXAMINADORA:

Francisco Adriano de Souza Ph.D. CNPMS
(Orientador)

Lucy Seldin. Dr. UFRJ

Leonardo de Oliveira Medici. Dr. UFRRJ

Aos meus pais José Henrique Teixeira Azevedo e Zólvia Corradi Azevedo por serem essenciais em minha vida.

OFEREÇO

Aos meus Irmãos, Guilherme e Gabriela, Avós Zólvio e Maria e a todos meus familiares, pelo incentivo, amor e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me acompanhou;

A minha família, meu alicerce;

Aos meus pais, José Henrique Teixeira Azevedo e Zólvia Corradi Azevedo, por todo amor, carinho, compreensão e apoio que sempre neles encontrei;

Aos meus irmãos, Guilherme e Gabriela, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida;

As minhas avós, Arlete e Maria Peixoto Corradi e meus avôs José Andrade e Zólvio Corradi por todo apoio;

Aos meus primos, em especial Emílio, Manuella, Beatriz, Pedro, Gustavo e Mariana e meus tios Zangão, Cíntia, Andréa, Pedro, Valéria e Ronaldo;

Aos meus amigos-irmãos de infância, Victor, Moita, Xá, Magrelo, Fabrício, Digão, Davi e Fernando por todo o companheirismo;

As pessoas especiais, que jamais esquecerei, que conheci na Universidade, Jardel, Jocelino, Júlio, Areia, Rafael, Léo, Luana, Ísis, Iara, Bidu, Mayara, Tione, Renan, Vinícius, Rondônia, Ronaldo, Garganta, Dudu, Francly, Cândido, Val, Wardsson, Juscelio e Abella.

Aos amigos-irmãos de República Tcheca, Ademar, Danilo, Élber, Tabão, Dudu, Vitor, Gordo, Bruno e Magal por toda força e diversão que me proporcionaram;

Aos bolsistas e funcionários do laboratório de Biologia Molecular do CNPMS, Thaís, Crísia, Flávia, Dani, Bárbara, Fernandinha, Ubiana, Luciana, Janaína, Mariah, Cristiano, Belkiss, Bira, Miguel, Marília e Célio.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me propiciar um ensino de qualidade e uma formação profissional e pessoal;

A Embrapa Agrobiologia e Embrapa Milho e Sorgo por me dar todas as condições de exercer, com o máximo de excelência, meu trabalho;

Ao pesquisador Francisco Adriano de Souza, pela orientação, apoio e amizade;

A CAPES pela concessão da bolsa;

A todos aqueles que passaram por minha vida e de alguma forma me ajudaram a alcançar esse momento especial e de suma importância para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

MUITO OBRIGADO!!!!

RESUMO

AZEVEDO, Gabriel Corradi. **Análise molecular da inoculação a campo do Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA) *Glomus clarum* CNPAB5 em plantas de milho, crotalária e batata-doce.** 2010. 62p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A maioria das famílias de plantas estabelece simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Dentre os FMA, espécies de *Glomus* se destacam como promotoras do crescimento de plantas cultivadas e predominam em solos agrícolas brasileiros, dentre essas o *Glomus clarum*. No entanto, estudos relativos à inoculação extensiva à campo e persistência do FMA inoculado são escassos. O objetivo desse trabalho foi avaliar, através de PCR-DGGE e sequenciamento, a capacidade de estabelecimento e a persistência da estirpe *Glomus clarum* CNPAB5 após sua inoculação à campo, bem como verificar o poder dessa técnica de *fingerprint* na detecção de alterações temporais e espaciais na comunidade de espécies do gênero *Glomus*. Plantas de milho e crotalária foram inoculadas com quatro doses de inóculo (0, 300, 900 e 1800 esporos/m linear de sulco de plantio) e após cultivo, nas mesmas parcelas, foi plantada batata-doce em rotação. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com quatro repetições. Visando a detecção molecular da estirpe introduzida por PCR-DGGE, inicialmente, a capacidade de discriminação de espécies do gênero *Glomus* foi avaliada utilizando 17 estirpes pertencentes a 9 espécies. Parte do 18S rDNA, incluindo a região V9, até a ITS2 foram amplificadas utilizando-se três combinações de iniciadores (NS7-GC/ F1Ra, NS7-GC/ITS-2 e GLOM1310-GC/ITS-2). Praticamente todas as estirpes apresentaram perfis distintivos e com múltiplas bandas, principalmente quando amplificada a região ITS, indicando variação intraespecífica entre as cópias do rDNA nas regiões amplificadas e capacidade de discriminação das estirpes por PCR-DGGE. Fragmentos obtidos com os iniciadores NS7-GC/ITS-2 foram escolhidos para as análises do experimento de campo. Os perfis obtidos das raízes não permitiram diferenciar os tratamentos, no entanto o DGGE indicou variação temporal, espacial e com o plantio da batata-doce em rotação na estrutura da comunidade de *Glomus*. Em relação a detecção e acompanhamento do FMA inoculado essa técnica de *fingerprint* não se mostrou adequada, uma vez que, o padrão do *G. clarum* não foi claramente identificado nas amostras de milho e crotalária inoculadas, bem como na batata-doce plantada em rotação. A comparação das sequências de raízes inoculadas com 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5 com sequências depositadas no *GenBank* indicaram a presença de *G. clarum*, porém, como somente foi realizado o sequenciamento das raízes inoculadas com a maior dose de inóculo, aliado ao fato de que essa espécie também foi encontrado nos solos dos tratamentos não inoculados, não se pode afirmar que o fungo inoculado foi capaz de colonizar e persistir no sistema após sua inoculação.

Palavras-chave: Detecção Molecular, Polimorfismo, rDNA.

ABSTRACT

AZEVEDO, Gabriel Corradi. **Molecular analysis of the inoculation at field of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) *Glomus clarum* CNPAB5 in maize plants, sunn hemp and sweet potato.** 2010. 62p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Most plant families establishing symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Among the AMF, *Glomus* species stand out as growth promoter of cultivated plants and predominate in Brazilian crop soils, among those the *Glomus clarum*. However, studies related to extensive field inoculation and persistence of the inoculated AMF are scarce. The aim of this study was to evaluate, by PCR-DGGE and sequencing, the ability of establishment and persistence of *Glomus clarum* CNPAB5 strain after your inoculation at field and as verify the power of this fingerprint technique to detect temporal and spatial changes in community of species of the genus *Glomus*. Maize plants and sunn hemp were inoculated with four doses of inoculum (0, 300, 900 and 1800 spores / linear meter of furrow) and after cultivation, in the same plots was planted sweet potato in rotation. The experiment was conducted in a randomized block design with four repeats. With the aim of the molecular detection of the strain introduced by PCR-DGGE, initially, the ability to discriminate species of this genus was evaluated using 17 strains that belong to 9 species. Part of the 18S rDNA, including the V9 region until the ITS2 was amplified using three combinations of primers (NS7-GC / F1Ra, NS7-GC/ITS-2 and GLOM1310-GC/ITS-2). Almost all strains showed distinctive profiles and with multiple bands, especially when amplified ITS region, indicating intraspecific variation among rDNA copies in the amplified regions and capacity of discrimination of the strains by PCR-DGGE. The fragments obtained with the primers NS7-GC/ITS-2 were chosen for the analysis of field experiment. The profiles obtained from the roots did not vary between treatments, but the DGGE showed temporal variation, spatial and with the planting of sweet potato in rotation on the community structure of *Glomus*. The profiles obtained from the roots did not vary between treatments, but the DGGE showed temporal variation, spatial, and with the planting of sweet potato in rotation on the community structure of *Glomus*. The profiles obtained from roots did not allow differentiate the treatments, it is not possible to clearly detect the inoculated AMF. The DGGE showed temporal variation, spatial, and with the planting of sweet potato in succession to maize and sunn hemp in the structure of the community of *Glomus*. Regarding the detection and monitoring of AMF inoculated this fingerprint technique was not adequate, since the pattern of *G. clarum* not been clearly identified in samples of maize and sunn hemp inoculated as well as sweet potatoes planted in rotation. Comparing the sequences of roots inoculated with 1800 spores of *G. clarum* CNPAB5 with *GenBank* sequences indicated the presence of *G. clarum*, however, as only the sequencing was carried out of the roots inoculated with the higher dose of inoculum, coupled with the fact that this species was also found in non-inoculated soil treatments, cannot say that the inoculated fungus was able to colonize and persist in the system after inoculation.

Key words: Molecular detection, polymorphism, rDNA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta de plantas cultivadas à inoculação com espécies de <i>Glomus</i> no Brasil (Modificado de SIQUEIRA & KLAUBERG FILHO, 2000).....	18
Tabela 2. Espécies, código das estirpes, fonte ou pesquisador, origem geográfica e bancos de germoplasma dos isolados utilizados nesse estudo.....	24
Tabela 3. Características químicas do solo da área experimental.....	25
Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados, grupo alvo e combinações utilizadas no presente estudo.....	27
Tabela 5. Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas esporos de <i>G. clarum</i> CNPAB5, utilizando os iniciadores <i>Glomus</i> A / ITS-4.....	37
Tabela 6. Porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada com os iniciadores NS7-GC / ITS-2 dos clones de <i>G. clarum</i> CNPAB5 utilizados para formação do marcador.....	38
Tabela 7. Número de bandas detectadas nos perfis de DGGE das raízes de milho, crotalária e batata-doce, cultivada em sucessão, submetidos a diferentes doses de inoculação.	39
Tabela 8. Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de milho, crotalária e batata-doce, inoculadas com 1800 esporos de <i>G. clarum</i> CNPAB5, utilizando os iniciadores <i>Glomus</i> A / ITS-2.	49
Tabela 9. Colonização micorrízica intrarradicular em plantas de milho, crotalária e batata-doce cultivada em rotação.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética dos *Glomeromycota* mostrando as quatro ordens e parafilias em *Glomerales* apresentando os grupos monofiléticos A e B indicados pelas linhas vermelhas. Note que o grupo A é subdividido em Aa (*Glomus mosseae*) e Ab (*Glomus intraradices*). Fonte: eq.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/.....15
- Figura 2.** Árvore filogenética dos FMA com foco no gênero *Glomus*. A árvore demonstra, com exemplos, a divisão desse gênero em 2 grupos monofiléticos A e B e a reclassificação do grupo C para a Ordem Diversisporales, Diversisporaceae, *Diversispora*. Fonte: eq.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/.....16
- Figura 3.** Representação esquemática do gene ribossomal (rDNA), indicando a posição de anelamento dos iniciadores utilizados nesse estudo. Em vermelho: iniciadores utilizados na 1ª PCR. Em azul: iniciadores utilizados no *nested*-PCR.....27
- Figura 4.** Sítios de anelamento dos iniciadores *Glomus*-A e *Glomus*-B na subunidade ribossomal 18S de FMA pertencentes aos grupos A e B do gênero *Glomus*. Foram colocados FMA não alvo e não Glomeromycetos para indicar a especificidade dos iniciadores. As sequências foram alinhadas de modo a facilitar a visualização.....32
- Figura 5.** Perfis de DGGE das espécies de *Glomus* utilizadas nesse estudo. (A) NS7-GC / ITS-2. Foi utilizado um gradiente de 25% - 45%, em gel de acrilamida 6%, com 16 horas de corrida a 80 Volts (aa:bis – 37,5:1). 1. *G. formosanum* ESALQ; 2. *G. geosporum* BEG11; *G. caledonium* BEG 20; 4. *G. mosseae* DCS28; 5. *G. mosseae* BEG12; 6. *G. intraradices* Biorize; 7. *G. intraradices* ESALQ; 8. *Glomus*. sp CNPAB12; 9. *G. clarum* DCS10; 10. *G. clarum* DCS9; 11. *G. clarum* CNPAB5. As setas indicam as bandas nas estirpes de *G. clarum* CNPAB5 e DCS9 que são ausentes na estirpe UFLA170. (B) GLOM1310-GC / ITS-2; Foi utilizado um gradiente de 25% - 35%, em gel de acrilamida 6%, com 16 horas de corrida a 75 Volts (aa:bis – 37,5:1). 1. *Glomus clarum* CNPAB 5; 2. *G. clarum* DCS9; 3. *G. clarum* DCS10; 4. *Glomus*. sp CNPAB 12; 5. *G. mosseae* BEG 12; 6. *G. mosseae* DCS28; 7. *G. coronatum* BEG22; 8. *G. intraradices* Biorize; 9. *G. intraradices* ESALQ; 10. *G. caledonium* BEG 20; 11. *G. geosporum* BEG 11. As setas amarelas indicam as bandas presentes nas estirpes de *G. clarum* CNPAB5 e UFLA306 não detectadas na estirpe UFLA170. As setas vermelhas indicam bandas detectadas na estirpe de *G. clarum* UFLA170 que são ausentes em CNPAB5 e UFLA306. (C) NS7-GC / F1Ra. Foi utilizado um gradiente de 30% - 50%, em gel de acrilamida 7%, com 16 horas de corrida a 75volts (aa:bis – 37:1). 1 - *G. clarum* CNPAB5; 2 - *G. intraradices* BIORIZE; 3 - 4 - *G. mosseae* DCS28; 5 – 7 - *Glomus*. sp. CNPAB12; 8 – 9 - *G. etunicatum* UFLA 221.....34
- Figura 6.** Perfil de DGGE utilizando os iniciadores NS7-GC / ITS-2 dos clones de *G. clarum* CNPAB5. Foi utilizado um gradiente de 25% - 45%, com 16 horas de corrida a 75 volts. 1-8 e 10-18 – Clones de *G. clarum* CNPAB5; 9 – Esporo de *G. clarum* CNPAB5. Os clones selecionados para o marcador estão identificados com uma letra e destacados em vermelho.....38

Figura 7. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente as 2 coletas de plantas de milho submetidas a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação..... ix

Figura 8. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente as 2 coletas de plantas de crotalária submetidas a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.....42

Figura 9. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referentes a 2ª coleta da crotalária e batata-doce cultivada em rotação. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.....46

Figura 10. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referentes a 2ª coleta do milho e da batata-doce cultivada em rotação. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.....47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares	3
2.2 O Gênero <i>Glomus</i>	3
2.3 Técnicas Moleculares Aplicadas ao Estudo da Ecologia dos FMA	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Estirpes de FMA Utilizadas.....	12
3.2 Produção de Inóculo de <i>Glomus clarum</i> CNPAB5 e Preparo do Inoculante	12
3.3 Descrição e Coleta do Experimento do Campo.....	13
3.4 Colonização Micorrízica Intrarradicular	14
3.5 Extração de DNA de Raízes	15
3.6 Extração de DNA de esporos de FMA	15
3.7 Condições do PCR para Amplificação do DNA dos Esporos de FMA e das Raízes.....	15
3.8 Análises por DGGE.....	17
3.9 Purificação e Clonagem do Gene Ribossomal de FMA Presentes nas Raízes e do <i>Glomus clarum</i> CNPAB5 Inoculado	18
3.10 Extração do DNA Plasmidial	18
3.11 Seleção de Clones Via PCR-DGGE e Sequenciamento.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Especificidade dos Iniciadores	21
4.2 Perfil de PCR-DGGE de FMA	22
4.3 Desenvolvimento de Marcador para DGGE e Caracterização da Heterogeneidade do rDNA de <i>Glomus clarum</i> CNPAB5	26
4.4 Análise da Inoculação a Campo de <i>G. clarum</i> CNPAB5 em Plantas de Milho, Crotalária e Batata-Doce Cultivada em Rotação por PCR-DGGE	28
4.5 Colonização Micorrízica Intrarradicular	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8 ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA), filo Glomeromycota, formam simbiose com raízes da maioria das famílias de plantas (SMITH & READ, 2008). Esses fungos atuam como extensões do sistema radicular, possibilitando uma exploração mais eficiente dos recursos do solo, notadamente o fósforo (JAKOBSEN, 1999), resultando, em geral, em aumentos no desenvolvimento, na taxa fotossintética e na taxa de transferência de carboidratos para as raízes (SIEVERDING et al, 1991; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os FMA recebem em troca açúcares, estabelecendo dessa forma uma relação de mutualismo nutricional, onde ambos os simbiossiontes são, em geral, beneficiados (BERBARA et al, 2006).

Dentre os gêneros de FMA, espécies de *Glomus* se destacam como promotores do crescimento de plantas cultivadas e predominam em solos agrícolas brasileiros (STÜRMER & SIQUEIRA, 2008). Entre as espécies mais utilizadas no Brasil destaca-se o *G. clarum* que apresenta resultados positivos para o crescimento de diversas culturas agrícolas, tais como: café, mandioca, soja, sorgo, goiaba, abacate, hortelã, cedro, seringueira (COLOZZI-FILHO et al, 1994; BALOTA et al, 1997; BRESSAN et al 2001; SCHIAVO & MARTINS, 2002; SILVEIRA et al, 2002; FREITAS, et al, 2004).

Estudos anteriores avaliaram o estabelecimento e a competitividade de *G. clarum*, em condições de casa de vegetação, após inoculação (SANTOS et al, 2000; GOMIDE et al, 2009). No entanto, estudos relativos à consistência, longevidade e custo-benefício da inoculação de FMA a campo são poucos e precisam ser ampliados (SIQUEIRA et al, 2002). Nesse sentido, é urgente o desenvolvimento de ferramentas para detecção e identificação dos FMA durante todo seu ciclo de vida, considerando-se que para se ter certeza que determinado FMA inoculado se associou, colonizando e influenciando o hospedeiro é necessário ter acesso aos FMA que estão presentes nas raízes da planta, uma vez que, os fungos detectados no solo na forma de esporos, não necessariamente estão colonizando as raízes das plantas (KJOLLER & ROSENDAHL, 2001; CLAPP et al, 2002). No entanto, a identificação morfológica, no nível de espécie, a partir de micélio fúngico intra-radicular, não é possível, em comunidades complexas, o que dificulta estudos de diversidade dos FMA. Dessa forma, a utilização de técnicas que permitam o acesso a diversidade de FMA *in planta* surge como alternativa. Nesse sentido as técnicas de *fingerprint* podem ser utilizadas para superar esse obstáculo, uma vez que permitem a caracterização da diversidade de FMA presentes nas raízes de plantas sendo desnecessárias etapas de cultivo (DANIELL et al, 2001; KOWALCHUK et al, 2002; ÖPIK et al 2008; LI et al, 2010).

A maioria das técnicas moleculares empregadas em estudos de diversidade de FMA baseia-se na utilização da PCR (VANDENKOORNHUYSE et al, 2002; ALGUACIL et al, 2009). A PCR pode ser combinada com técnicas de fingerprint, entre os quais se têm o DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante). O DGGE pode diferenciar, em géis de acrilamida com gradiente desnaturante, fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, que apresentem diferenças em relação a sua mobilidade após a desnaturação química de seus domínios, denominados “*Melting Domains*” (MUYZER & SMALLA, 1998; ROSADO & DUARTE, 2002; FELSKE & OSBORN, 2005). Essa técnica permite a caracterização da diversidade microbiana (KOWALCHUK et al, 2002; MA et al, 2005; LIU et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2009; ZHANG et al, 2010) e discriminação de espécies de FMA (DE SOUZA et al, 2004; SATO et al, 2005) a partir da amplificação por PCR de regiões selecionadas, tais como, 18S rDNA.

Em geral, as técnicas de *fingerprint* não permitem a identificação direta dos organismos presentes em uma comunidade. Essa identificação depende da associação entre a técnica de *fingerprint*, sequenciamento de DNA e análise filogenética. Essa sequência de procedimentos tem sido utilizada de modo a identificar os FMA presentes em raízes de plantas (KJOLLER & ROSENDAHL, 2001; KOWALCHUK et al, 2002; SANTOS et al, 2006; SONJAK et al, 2009; LI et al, 2010) e no solo (MA et al, 2005; LIANG et al, 2008;), além de verificar os efeitos da inoculação de determinados FMA sobre a estrutura da população de FMA autóctone (ANTUNES et al, 2009; MUMMEY et al, 2009). No entanto, pelo nosso conhecimento, não existem trabalhos que utilizaram PCR-DGGE para acompanhar a introdução de FMA em condições de campo após sua inoculação, tampouco confirmaram sua presença através de clonagem e sequenciamento.

O efeito da inoculação da estirpe *Glomus clarum* CNPAB5 sobre o desempenho agrônomo do milho, crotalária e batata-doce em rotação a essas culturas e a capacidade de estabelecimento do fungo foi avaliado em experimento de campo, em dois estudos complementares. Plantas de milho e de crotalária foram inoculadas com quatro doses de inóculo (0, 300, 900 e 1800 esporos/m linear de sulco de plantio) e após cultivo, nas mesmas parcelas, foi plantada batata-doce em rotação.

O primeiro estudo, realizado por SOUZA (2010) avaliou aspectos agrônômicos sendo observado que a inoculação com *G. clarum* CNPAB5 proporcionou ganhos da biomassa seca e fresca da parte aérea e aumento nos teores e acumulação total de N, P e K na parte aérea do milho e da crotalária. Foram detectados esporos de *G. clarum* em todos os tratamentos, inclusive no não inoculado, sendo observadas respostas lineares, com o aumento no número de esporos à medida que a dose de inoculação aumentou, para todas as culturas avaliadas.

O presente estudo teve como objetivo a detecção do FMA inoculado através de PCR-DGGE, clonagem e sequenciamento. No entanto, os perfis obtidos das raízes não permitiram diferenciar os tratamentos, além de não possibilitarem detectar claramente o FMA inoculado. Em contrapartida, o emprego dessa técnica de *fingerprint* possibilitou acessar a diversidade temporal e espacial das comunidades de FMA do gênero *Glomus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares

Os FMA são os simbiontes mais comuns de raízes de plantas (SMITH & READ, 2008), sendo considerados benéficos, uma vez que, em geral, favorecem o desenvolvimento ou a sobrevivência do macrosimbionte, por atuarem como extensões do sistema radicular, possibilitando uma exploração mais eficiente dos recursos do solo (FITTER, 1985; SIEVERDING 1991; MOREIRA & SIQUEIRA 2006), principalmente o fósforo que é um dos elementos mais críticos para a produção agrícola nos trópicos (NOVAIS & SMITH, 1999). Além disso, esses microrganismos atuam na estabilidade de agregados do solo (WRIGHT & UPADHYAYA, 1998; BEARDEN & PETERSEN, 2000; RILLIG, 2004), resistência ou proteção a fitopatógenos (FITTER & GARBAYE, 1994; FRITZ et al, 2006; BORGES et al, 2007) e na proteção ao estresse hídrico (RUIZ-LOSANO, 2003; SMITH & READ, 2008).

Acredita-se que a conquista do ambiente terrestre pelas plantas vasculares foi favorecida pela capacidade de estabelecer simbiose com os FMA (REMY et al, 1994; HECKMAN et al, 2001), visto que o descobrimento de estruturas fúngicas fossilizadas, que se relacionam fortemente as estruturas dos FMA modernos, data do período Ordoviciano (500-439 Ma atrás), coincidindo com a origem das primeiras plantas terrestres (REDECKER et al, 2000).

Outro aspecto importante relacionado aos FMA são os estudos ligados à produtividade e biodiversidade dos ecossistemas vegetais terrestres. Estudos apontam a diversidade de FMA como um dos fatores-chave que contribuem para a produtividade e manutenção da diversidade das comunidades de plantas (van der HEIJDEN et al., 1998, 2006; O'CONNOR et al, 2002).

Atualmente os FMA são classificados no filo Glomeromycota (SCHÜBLER et al. 2001; Figura 1). Sendo reconhecidas aproximadamente 205 espécies (DE SOUZA et al. 2008), distribuídas em 4 ordens, 10 famílias e 13 gêneros.

2.2 O Gênero *Glomus*

Glomus é caracterizado pela formação de esporos na porção terminal ou intercalar de uma hifa esporogênica (DE SOUZA & BERBARA, 1999; DECLERCK et al, 2000). Na maioria das espécies, a hifa esporogênica se desenvolve a partir de hifas extraradiculares. A parede externa dos esporos apresenta superfície lisa ou raramente ornamentada. Em geral, os esporos são produzidos isoladamente no solo, podendo também ocorrer em agregados e esporocarpos, sendo que algumas espécies produzem esporos intraradiculares. Todos os membros do gênero *Glomus* apresentam uma única parede que possui de 2 a 4 camadas, sendo que a camada contínua à hifa de sustentação consiste de várias subcamadas (lâminas).

Atualmente, o gênero *Glomus* é classificado como parafilético (Figura 1). Esse gênero apresentava-se como polifilético, porém com a reclassificação das espécies *Glomus C* para *Diversispora* (Figura 2) (WALKER & SCHÜBLER, 2004), passou a apresentar dois grupos: Grupo *Glomus A*, subdividido em Aa e Ab e Grupo *Glomus B* (Figuras 1 e 2) originários do mesmo ancestral comum (Figura 1). Essa classificação é baseada em análise molecular dos genes ribossomais. Até o momento, essa caracterização foi feita com um pequeno número de espécies descritas, sendo conhecido um maior número de espécies para o grupo A em relação

ao grupo B. Considerando o levantamento da diversidade de FMA feito para ecossistemas brasileiros por STÜRMER & SIQUEIRA (2008) e a caracterização molecular disponível da página da web AMF-phylogeny (<http://www.lrz-muenchn.de/~schuessler/amphylo>, em 24/08/2010), já foram reportadas as seguintes espécies pertencentes ao grupo A: *Glomus clarum*, *G. coremioides*, *G. fasciculatum*, *G. geosporum*, *G. intraradices*, *G. mosseae* e *G. sinuosum* enquanto que as espécies já caracterizadas do grupo B foram: *G. claroideum*, *G. etunicatum* e *G. microaggregatum*.

O gênero *Glomus* apresenta o maior número de representantes dentre os Glomeromycota, com cerca de 110 dentre as mais de 205 espécies de FMA descritas (DE SOUZA et al, 2008). A partir de inventários de espécies de FMA no Brasil e considerando o número absoluto de espécies por gênero, STÜRMER & SIQUEIRA (2008) verificaram que *Glomus* é predominante em agrossistemas, Cerrado, Floresta Atlântica, Amazônica e de Araucária, plantações de café e em áreas degradadas.

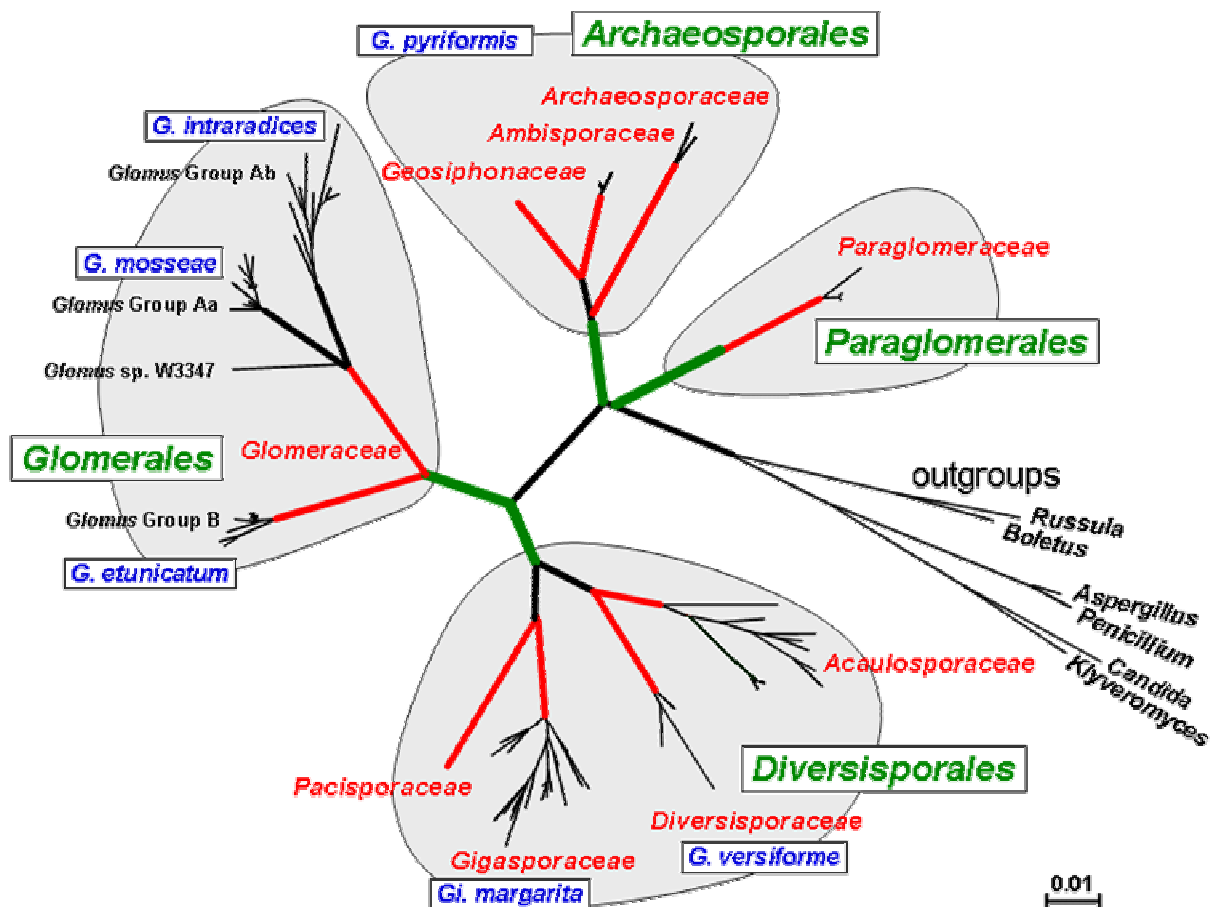


Figura 1. Árvore filogenética dos *Glomeromycota* mostrando as quatro ordens e parafilia em *Glomerales* apresentando os grupos monofiléticos A e B. Note que o grupo A é subdividido em Aa (*Glomus mosseae*) e Ab (*Glomus intraradices*). Fonte: www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/.

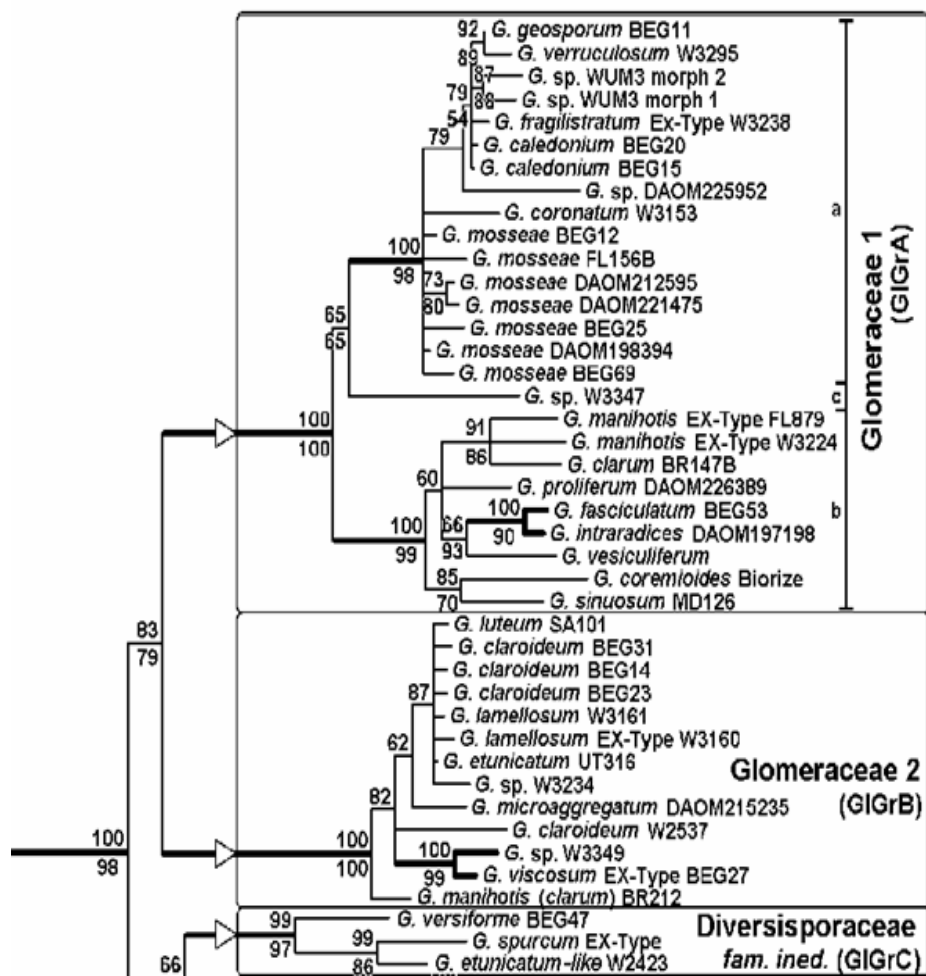


Figura 2. Árvore filogenética dos FMA com foco no gênero *Glomus*. A árvore demonstra, com exemplos, a divisão desse gênero em 2 grupos monofiléticos A e B e a reclassificação do grupo C para a Ordem Diversisporales, Diversisporaceae, *Diversispora*. Fonte: eq.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/.

A maior frequência de espécies pertencentes a *Glomus* em solos agrícolas pode ser explicada pela sua estratégia de vida (HART & READER, 2002; KLIRONOMOS & HART, 2002; DE SOUZA et al, 2005). A estratégia de vida pode ser descrita por uma série de características das espécies, tais como: habilidade de colonização, habilidade de dispersão, sobrevivência e modo de reprodução (PIANKA, 1970). No caso dos FMA, a maioria dos trabalhos foca na capacidade de colonização das espécies. Com o objetivo de testar diferenças da estratégia de colonização de diferentes táxons de FMA, KLIRONOMOS & HART (2002), utilizaram diferentes fontes de propágulos infectivos (esporos, hifa extra-radicular e fragmentos de raiz colonizados) e verificaram claras evidências de diferenças entre espécies de FMA em relação à habilidade de colonização de raízes sob diferentes fontes de inóculo. Espécies pertencentes a *Glomus* foram capazes de colonizar raízes com as 3 fontes de inóculo, em detrimento a espécies pertencentes aos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*, capazes de colonizar as raízes somente a partir de esporos. Os resultados sugerem que existem diferenças na estratégia de vida entre os FMA em termos de colonização, e essas diferenças se dão ao nível de família. DE SOUZA e colaboradores (2005) avaliaram a esporulação ao longo do ciclo de vida de *Scutellospora reticulata*, *Glomus caledonium*, *Glomus proliferum* e *Glomus intraradices*, e verificaram que as espécies de *Glomus* testadas tiveram o pico de esforço

reprodutivo em 5 semanas, decrescendo rapidamente em seguida, já a *S. reticulata* apresentou pico após a 17^o semana e manteve praticamente constante até a 34^o semana. Esses resultados sugerem que essas espécies concentram seus esforços reprodutivos em momentos diferentes, demonstrando estratégias de vida distintas, onde Gigasporaceae favorece o crescimento somático e Glomeraceae a reprodução. O revolvimento frequente dos solos agrícolas, o emprego de culturas anuais e a ausência de plantas por certos períodos do ano são práticas agrícolas que podem favorecer a seleção de espécies que esporulam rapidamente, conforme observado em *Glomus*.

O presente estudo visou avaliar o estabelecimento e a persistência de *G. clarum* CNPA5 inoculado em plantas de milho e crotalária, cultivadas em rotação com batata-doce. Conforme observado por DE SOUZA e colaboradores (2005), essa espécie esporula concomitantemente com o crescimento das raízes, favorecendo a reprodução, colonizando rapidamente o hospedeiro. Essa característica confere maior tolerância a perturbações no ambiente e, aliada a alta capacidade infectiva dessa espécie (SANTOS et al, 2000), leva-nos a crer que as plantas serão colonizadas pela espécie inoculada, possibilitando a análise da inoculação pela técnica de *fingerprint* utilizada, que, aliada a clonagem e sequenciamento, tem a capacidade de identificar os FMA *in planta*.

A tabela 1 apresenta respostas de plantas cultivadas à inoculação com espécies de *Glomus* no Brasil. Entre as espécies mais utilizadas destaca-se o *G. clarum*, que apresenta resultados positivos para o crescimento de diversas culturas agrícolas (Tabela 1). Plantas de café apresentaram maior sobrevivência e melhor desenvolvimento no campo, quando inoculadas com *G. clarum* e *G. etunicatum* (COLOZZI-FILHO et al, 1994). Plantas de mandioca, inoculadas com *G. clarum*, apresentaram acréscimos na parte aérea e nas raízes de 632% e 3091% respectivamente, em relação ao tratamento não inoculado (BALOTA et al, 1997). A inoculação de *G. clarum* em abacateiro promoveu melhor desenvolvimento vegetativo na fase de porta enxerto, ao longo do período de produção da planta e após o transplante para o pomar (SILVEIRA et al, 2002).

O estabelecimento e a competitividade de *G. clarum* após inoculação foi avaliado por SANTOS e colaboradores (2000) e GOMIDE e colaboradores (2009). No primeiro estudo, com o objetivo de avaliar o estabelecimento e capacidade infectiva de FMA introduzidos em relação à comunidade de FMA autóctones, constatou-se que *G. clarum* foi capaz de competir com a comunidade de FMA autóctone de um solo sob erosão (Podzólico Vermelho) mesmo quando a comunidade apresentou um maior número de esporos do que a quantidade inoculada. Os autores concluíram que, para o solo estudado, justifica-se a recomendação desse isolado para a produção de inoculante comercial para espécies responsivas a inoculação com esse fungo. No segundo estudo, avaliando os efeitos do pré-cultivo de diferentes espécies vegetais e de FMA na esporulação, colonização e crescimento de braquiária cultivada em sucessão, sob condições de casa de vegetação, os autores verificaram que *G. clarum* dominou a comunidade de FMA, e que houve efeito da espécie fúngica, mas não das plantas na composição da comunidade micorrízica.

Apesar dos resultados consistentes obtidos nos estudos de SANTOS e colaboradores (2000) e GOMIDE e colaboradores (2009) citados acima, existem algumas considerações a serem feitas em relação a metodologia adotada nesses trabalhos. Em ambos, a forma utilizada para verificar o estabelecimento dos FMA inoculados foi a extração de esporos do solo após o cultivo do hospedeiro. No entanto, para se ter acesso aos FMA que estão colonizando e influenciando o hospedeiro é necessário ter acesso aos FMA *in planta*, uma vez que a população de esporos no solo pode não refletir a população de FMA da raiz (esse aspecto será abordado de forma mais abrangente na próxima seção).

Tabela 1. Resposta de plantas cultivadas à inoculação com espécies de *Glomus* no Brasil (Modificado de SIQUEIRA & KLAUBERG FILHO, 2000).

Culturas	FMA eficientes	Resposta à inoculação	Referências
Abacate	<i>G. etunicatum</i>	Maior desenvolvimento vegetativo.	SILVEIRA et al, 2002
Acerola	<i>G. etunicatum</i>	Maior altura, aumento da biomassa da parte aérea e da área foliar	COSTA et al, 2001
Alecrim	<i>G. clarum</i>	Aumento na altura da planta e na massa fresca e seca da parte aérea	RUSSOMANNO et al, 2008
Banana	<i>G. clarum</i>	Incrementos na altura, na MSPA e no acúmulo de N, P e K	LEAL et al, 2005
Batata-doce	<i>G. clarum</i>	Aumento na produtividade de ramas	SOUZA, 2010
Café	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i>	Melhor desenvolvimento de mudas, melhor sobrevivência no campo e maior produção.	COLOZZI-FILHO et al, 1994
Goiaba	<i>G. clarum</i>	Aumento na produção de matéria seca, MSPA e teor de N	SCHIAVO & MARTINS, 2002
Citros	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i>	Crescimento do porta enxerto	NUNES, 2004
Feijão	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i> ; <i>G. manihots</i>	Aumento da matéria seca.	SIQUEIRA & KLAUBERG- FILHO, 2000
Leguminosas	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i>	Favorecimento da nodulação, do acúmulo de N, da produção de grãos e da tolerância ao déficit hídrico.	SIQUEIRA & KLAUBERG- FILHO, 2000
Mamão	<i>G. clarum</i>	Aumento da MSPA e no teor de P na parte aérea.	MARTINS et al, 2000
Mandioca	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i> ; <i>G. manihots</i>	Maior crescimento, vasos e campo.	BALOTA et al, 1997
Manjeriçã	<i>G. clarum</i>	Aumento na altura da planta e na massa seca da parte aérea	RUSSOMANNO et al, 2008
Maracujá	<i>G. etunicatum</i>	Maior vigor para planta, reduzindo o tempo de transplantio para o campo	CAVALCANTE et al, 2002
Milho	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i>	Aumento do crescimento e da produção.	SOUZA et al, 2010
Soja	<i>G. etunicatum</i> ; <i>G. macrocarpum</i>	Aumento da matéria seca e na produção de grãos	BRESSAN et al, 2001
Sorgo	<i>G. clarum</i> ; <i>G. etunicatum</i>	Aumento da matéria seca e na produção de grãos	BRESSAN et al, 2001
Tomate	<i>G. clarum</i>	Redução do índice de galhas ocasionadas por <i>M. incognita</i> .	SOUSA et al, 2010

Além disso, o estudo realizado por SANTOS e colaboradores (2000) utilizou o cultivo-armadilha para verificar a capacidade infectiva dos FMA inoculados. No entanto, é sabido que o resultado do cultivo-armadilha é influenciado pela espécie de planta utilizada, fonte de propágulo, regime de fertilização e irrigação e duração do período de cultivo (BRUNDRETT et al, 1999a; BRUNDRETT, 1999b). Portanto, os resultados baseados no cultivo armadilha, assim como os baseados na extração de esporos do solo, não refletem necessariamente a estrutura da comunidade de FMA presente *in planta* e devem ser interpretados com cautela

(SOUZA et al, 2007). Faz-se necessário o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem o acesso aos FMA *in planta*, tornando possível a caracterização das comunidades de FMA que realmente estejam colonizando e influenciando o hospedeiro.

2.3 Técnicas Moleculares Aplicadas ao Estudo da Ecologia dos FMA

Em condições naturais uma mesma planta pode estar colonizada por diversos FMA, e os métodos de identificação desses fungos são laboriosos, imprecisos e lentos (SILVA & COLOZZI-FILHO, 2007). Além disso, para determinar quais FMA estão colonizando e influenciando o hospedeiro é necessário acessar os FMA presentes nas raízes da planta, uma vez que inventários baseados em esporos coletados no solo podem não representar a população de FMA que esteja colonizando ativamente as raízes das plantas de interesse (CLAPP et al., 2002; KOWALCHUK et al, 2002, HEMPEL et al, 2007). No entanto, a fase vegetativa, micelial não pode ser discriminada a nível de espécie em comunidades complexas, dificultando a determinação das espécies de FMA colonizando raízes de plantas. Nesse sentido, o estudo da ecologia da interação FMA-plantas tem sido revolucionado pelo uso de técnicas de ecologia molecular microbiana, que permitem a caracterização da comunidade microbiana *in planta* sendo desnecessárias etapas de cultivo (JACQUOT et al, 2000; DANIELL et al, 2001; KOWALCHUK et al, 2002; SHEPERD et al, 2006; ÖPIK et al 2008; LI et al, 2010; RYSZKA et al, 2010).

Um dos principais genes utilizados no estudo da diversidade dos FMA são os ribossomais (RRS) nucleares (DANIELL et al, 2001; CLAPP et al, 2002; HIJRI et al, 2006). Esses são constituídos por regiões codificadoras de diferentes tamanhos (25S, 18S e 5,8S), separadas por 2 regiões transcritas não codificantes, denominadas de “internal transcribed spacers” (ITS) que apresentam certo grau de variação e taxas de evolução mais rápidas que os genes ribossomais propriamente ditos, podendo ser utilizadas para diferenciar espécies próximas (LANFRANCO et al, 2001). A utilização do RRS para inferências filogenéticas e análise de comunidades microbianas tem-se fundamentado em uma série de vantagens, em relação a outros genes, como: organização conservada no genoma de todos os organismos e presença em unidades repetidas adjacentes; aparente ausência de transferência genética lateral; presença de regiões altamente conservadas em grupos definidos de organismos flanqueando regiões hipervariáveis; número elevado de cópias; o gene que codifica a subunidade menor do RRS tem um tamanho satisfatório para análises filogenéticas, cerca de 1.900 nucleotídeos (AMANN & LUDWIG, 2000; LAMBAIS, et al, 2005). Outra vantagem dos genes ribossomais é o grande número de sequências depositadas em banco de dados de livre acesso, em relação a outros genes.

A maior parte das técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos FMA baseia-se na utilização da PCR, que permite a amplificação, a partir de poucas cópias do DNA alvo, de uma região específica do DNA situada entre dois iniciadores (MULLIS, 1990; MULLIS et al, 1994). Uma vez amplificado, uma série de técnicas baseadas na discriminação de sequências de DNA podem ser utilizadas, de modo a estudar a diversidade de sequências produzidas na PCR (SANDERS et al, 1995; HUSBAND et al , 2002; ALGUACIL et al 2009; YAO et al, 2010).

Dentre as técnicas de *fingerprint* utilizadas em estudos de diversidade de FMA *in planta*, destacam-se o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo no Tamanho de Fragmentos de Restrição) (DANIELL et al, 2001; HUSBAND et al, 2002; VANDENKOORNHYSE et al, 2002), T-RFLP (Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo no Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminais) (MUMMEY & RILLIG, 2008; VAN DER VOORDE et al, 2010) e SSCP (Single Strand

Conformation Polymorphism - Polimorfismo de conformação de filamento único (KJOLLER & ROSENDAHL, 2001; ALGUACIL et al, 2009). Detalhes sobre as técnicas podem ser obtidos em LAMBAIS e colaboradores (2005).

Além das técnicas citadas acima, tem-se o DGGE, que pode discriminar mutações pontuais em fragmentos de DNA de mesmo tamanho, amplificados por PCR. A técnica se baseia em diferenças no comportamento de desnaturação de fragmentos de DNA de cadeia dupla que apresentem padrão de migração diferenciado em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de formamida e uréia. Os fragmentos de DNA que possuem maior conteúdo de GC terão menor tendência a desnaturação e conseqüentemente, apresentarão maior mobilidade, ficando mais concentrados na parte inferior do gel de poliacrilamida. Através desta técnica é possível detectar, aproximadamente, 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (MYERS et al, 1985). Quando se acrescenta à extremidade 5' de um dos iniciadores um "grampo" de GC contendo de 30 a 50 nucleotídeos, há um impedimento da dissociação das fitas de DNA aumentando para 100% a detecção das variações existentes (MUYZER, 1993; MUYZER & SMALLA, 1998; FELSKÉ & OSBORN, 2005; ROSADO & DUARTE, 2002).

Essa técnica foi inicialmente utilizada em estudos de ecologia microbiana por MUYZER e colaboradores (1993) amplificando a região 16S de genes ribossomais para avaliar a estrutura de comunidades bacterianas. Atualmente, o DGGE vem sendo utilizado em estudos que visam avaliar mudanças na estrutura e diversidade de comunidades microbianas *in planta*. Para FMA, o PCR-DGGE foi utilizado, inicialmente, para o estudo de comunidades de FMA associadas a gramíneas crescendo em dunas costeiras na Holanda (KOWALCHUK et al, 2002). Os autores citam que essa estratégia permitiu uma rápida comparação das comunidades de FMA no solo e nas raízes colonizadas, sem o uso de culturas-armadilha. Foram observadas diferenças entre a comunidade de fungos dominantes, detectada em áreas contendo plantas saudáveis e plantas em declínio. Os autores observaram também diferenças entre a comunidade de fungos no solo e a comunidade de fungos colonizando as raízes, avaliada pela análise do 18S rDNA dos esporos e das raízes colonizadas. Os resultados obtidos reforçam que a diversidade de esporos na rizosfera pode não representar a estrutura da comunidade que está colonizando as raízes e que o PCR-DGGE é uma ferramenta poderosa para se estudar a ecologia dos FMA. Utilizando PCR-DGGE, OLIVEIRA e colaboradores (2009) detectaram diferenças nas comunidades de FMA na rizosfera de genótipos de milho contrastantes em relação ao uso de P em solos com alto e baixo nível desse macronutriente. Os autores concluíram que a eficiência na aquisição de P dos genótipos de milho e o nível de P no solo, podem influenciar a comunidade de FMA na rizosfera.

O PCR-DGGE também pode ser utilizado para discriminação de espécies de FMA (DE SOUZA et al, 2004; SATO et al, 2005). O primeiro estudo avaliou diferentes regiões do rDNA 18S para determinar a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares do gênero *Gigaspora* por meio de PCR-DGGE. Os padrões de DGGE obtidos revelaram que a região V3-V4 não apresentava variação suficiente para separar as espécies desse gênero, dividindo-as somente em 2 grupos. Por outro lado, a região V9 possibilitou a separação de todas as espécies desse gênero, inclusive estirpes de *Gigaspora albiba*, *Gi. margarita* e *Gi. gigantea*. Os autores concluíram que o PCR-DGGE é um método rápido e confiável para discriminar espécies de *Gigaspora*. No outro estudo, foi desenvolvido um par de iniciadores que foi utilizado com sucesso para separar as espécies *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *G. claroideum*, *Gi. margarita* e *Archaeospora leptoticha* por PCR-DGGE. Os autores concluíram que o PCR-DGGE foi efetivo na separação das espécies de FMA, mostrando que pode ser útil em estudos de diversidade de FMA em pastagem.

Como qualquer técnica de *fingerpint*, o PCR-DGGE apresenta algumas limitações, como por exemplo, o aparecimento de bandas denominadas heteroduplex, resultado do

pareamento de fitas simples complementares obtidas de diferentes organismos ou genes homólogos durante a PCR, que podem influenciar na análise dos géis utilizados para avaliação de diversidade, quando o número de bandas é utilizado como indicativo de riqueza. Um aspecto a ser ressaltado nesse sentido é que, apesar dos FMA apresentarem polimorfismo entre cópias do gene ribossomal, alguns trabalhos utilizaram o número de bandas apresentadas no DGGE como indicativo de riqueza (YAO et al, 2010, ZHANG et al 2010). Além disso, por ser baseada na PCR, essa técnica de *fingerprint* não detecta populações em menor número (MUYZER & SMALLA, 1998) o que pode levar a uma subestimativa da diversidade real. Apesar desses problemas, a técnica molecular apresenta vantagens, como por exemplo, baixo custo, fácil execução, permitindo com isso a análise de várias amostras a um custo reduzido.

Em geral, as técnicas de *fingerprint* não permitem a identificação direta dos organismos presentes em uma comunidade. Essa identificação depende da associação entre a técnica de *fingerprint*, a análise filogenética e sequenciamento (KJOLLER & ROSENDAHL, 2001; KOWALCHUK et al, 2002; SANTOS et al, 2006; LIANG et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009; SONJAK et al, 2009; LI et al, 2010). Utilizando sequenciamento das bandas obtidas no DGGE, SANTOS et al (2006) caracterizaram a composição e mudanças na comunidade de FMA ao longo de um gradiente de fertilização e em relação a variação sazonal em uma pastagem seminatural na Suécia. Para tanto, analisaram 2 espécies de plantas comuns e com ampla distribuição nas pastagens, porém com sistemas radiculares distintos. Os autores detectaram 10 grupos de sequências de DNA, com 7 pertencentes ao *Glomus*, 2 a *Scutellospora* e 1 a *Diversispora*. Os autores não observaram nenhum padrão de especificidade em relação à planta hospedeira. SONJAK e colaboradores (2009) utilizaram TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) para estudar os FMA associados a raízes de plantas selecionadas de ambientes salinos e poluídos com metais. Foram observadas diferenças na comunidade de FMA das plantas estudadas, mesmo quando essas pertenciam ao mesmo ambiente. As sequências das bandas de TGGE foram agrupadas com *Glomus mosseae*, *G. intraradices* e uma espécie de *Glomus* não identificável, ou seja, todas as raízes das 4 plantas estudadas apresentaram associação com o gênero *Glomus*. Os autores concluíram que o TGGE associado a sequenciamento é aplicável para análise da diversidade de FMA em raízes coletadas a campo e para estudos da diversidade natural dos FMA.

O monitoramento, bem como os efeitos de organismos inoculados sobre a população de organismos autóctones podem ser avaliados por técnicas de *fingerprint*. BOA SORTE (2008) monitorou o efeito de um inoculante composto pela mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (BR11505, BR11335, BR11115, BR11281 e BR11366) em 2 variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB72454) por PCR-DGGE. O autor verificou que houve um baixo estabelecimento das bactérias inoculadas, e não foi possível a detecção de todas as bactérias presentes no inoculante. Em relação aos FMA, os efeitos da inoculação de espécies de FMA sobre a estrutura e funcionalidade da comunidade de FMA autóctone foram avaliados pela combinação de sequenciamento e T-RFLP (ANTUNES et al, 2009; MUMMEY et al, 2009). O primeiro estudo simulou a introdução de *G. intraradices* em um solo agrícola sujeito a diferentes condições de perturbação. Foi verificado que o FMA inoculado pode interagir de forma direta ou indireta com os FMA autóctones e a perturbação do solo teve um impacto negativo sobre os FMA que estavam colonizando as raízes de milho. Os autores concluíram que a perturbação do solo pode, em certas condições, ter maior efeito sobre a estrutura da comunidade de FMA nativa em solos agrícolas do que a inoculação com *G. intraradices*. O segundo estudo avaliou a inoculação de espécies de FMA, pertencentes à Glomeraceae e Gigasporaceae. Foi observado que a inoculação com Gigasporaceae foi menos impactante na comunidade de FMA nativas do que Glomeraceae. Os autores concluíram que a identidade do inoculante influencia a riqueza dos ribotipos detectados nas raízes.

Apesar da existência de estudos que avaliaram a diversidade de FMA *in planta*, pelo nosso conhecimento, não existem estudos relativos ao estabelecimento e detecção de FMA inoculados em campo, por técnicas de *fingerprint*. Portanto, avanços nessa área são necessários e oportunos, uma vez que possibilita avaliar de forma concreta, se o FMA inoculado se associou a planta hospedeira, além de elucidar aspectos da biologia do FMA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estirpes de FMA Utilizadas

Estirpes de FMA foram selecionadas com o objetivo de se obter representantes dos grupos alvo *Glomus-A* e *Glomus-B* e de espécies pertencentes a outros gêneros consideradas como não alvo para os iniciadores utilizados nesse estudo (Tabela 2). Essas estirpes foram utilizadas como controle para ajuste das condições de amplificação por PCR, na padronização da técnica do PCR-DGGE, bem como, para testar o nível de discriminação entre espécies e isolados geográficos de uma mesma espécie.

As estirpes foram obtidas de coleções de culturas na forma de solo inóculo ou envoltas em papel filtro dentro de tubos de microcentrífuga. Esporos foram extraídos pelo método do peneiramento úmido (GERDEMANN & NICOLSON, 1963), onde o solo foi suspenso em água e passado por uma peneira com malha de 425µm encaixada sobre outra com malha de 53µm. O solo retido na peneira de menor malha foi transferido para tubos falcon de 50mL sendo centrifugado com água por 4 minutos a 3000rpm (HETTICH, Rotofix 32A, Tipo 1206, Rotor 4097). O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante solto da parte inferior do tubo, sendo misturado em sacarose (60%), e novamente centrifugado por 2 minutos a 1000rpm (HETTICH, Rotofix 32A, Tipo 1206, Rotor 4097). O sobrenadante foi passado através de uma peneira de 53µm e lavado com água. Por fim os esporos foram transferidos para uma placa de petri, onde foram examinados em microscópio estereoscópio, para verificar a pureza e a qualidade dos mesmos. Os esporos passaram então por um processo de limpeza por ultrassom visando à remoção de hifas e sujidades aderidas a parede dos esporos. A limpeza foi executada em aparelho de ultra-som (BRANSON 3210) e consistiu de 4 ciclos de 15 segundos, intercalando com lavagem com água destilada estéril. Por fim, os esporos foram reexaminados ao microscópio estereoscópio, e os que se apresentavam visualmente perfeitos e sadios, foram selecionados, separados e transferidos, individualmente ou em grupos de 10 e 50 esporos, para tubos de microcentrífuga de 1,5mL, identificados com o código do isolado e número de esporos, sendo armazenados a -20°C até serem utilizados.

3.2 Produção de Inóculo de *Glomus clarum* CNPAB5 e Preparo do Inoculante

Os inóculos de *G. clarum* foram produzidos a partir de solo inóculo do acesso CNPAB5 depositado no Banco de Germoplasma de Glomales da Embrapa Agrobiologia. O acesso foi multiplicado durante 5 meses individualmente em cubas plásticas contendo 20kg de substrato composto pela mistura de solo e areia de 1:1 (v:v) e tendo como planta hospedeira *Brachiaria decumbens*. Quinze dias antes do final da multiplicação do inóculo a irrigação das cubas foi cessada, possibilitando a secagem das plantas e do substrato. A parte aérea da braquiária foi cortada e o substrato contendo esporos foi peneirado em malha de 2mm. As raízes retidas pela peneira foram descartadas. Após esta etapa, procedeu-se a quantificação de esporos após extração conforme descrito anteriormente.

Foram detectados em média 114 esporos de FMA por 50g de substrato. O preparo do inoculante foi feito de acordo com essa densidade, onde a quantidade de substrato utilizada foi calculada de modo a atender a dose de esporos determinada para cada tratamento.

Tabela 2. Espécies, código das estirpes, fonte ou pesquisador, origem geográfica e bancos de germoplasma dos isolados utilizados nesse estudo.

Nº	Espécie	Código	Fonte/Pesquisador	Origem	Banco de Germoplasma ^a
1	<i>Glomus clarum</i>	CNPAB5	F. A. de Souza	EUA ^b	CNPAB
2	<i>Glomus clarum</i>	DCS9	J. O. Siqueira	EUA ^b	DCS-UFLA
3	<i>Glomus clarum</i>	DCS10	J. O. Siqueira	Brasil ^c	DCS-UFLA
4	<i>Glomus intraradices</i>	ESALQ	E. J. N. Cardoso	Brasil ^d	ESALQ
5	<i>Glomus intraradices</i>	Biorize	-	-	Biorize
6	<i>Glomus mosseae</i>	DCS28	J. O. Siqueira	Brasil ^c	UFLA
7	<i>Glomus mosseae</i>	BEG12	V. Gianninazzi-Person	Inglaterra	BEG
8	<i>Glomus</i> sp.	CNPAB12	F. A. de Souza	Brasil ^f	CNPAB
9	<i>Glomus geosporum</i>	BEG11	V. Gianninazzi-Person	Inglaterra	BEG
10	<i>Glomus coronatum</i>	BEG22	V. Gianninazzi-Person	Austrália	BEG
11	<i>Glomus formosanum</i>	ESALQ	E. J. N. Cardoso	Brasil ^d	ESALQ
12	<i>Glomus caledonium</i>	BEG20	V. Gianninazzi-Person	Reino Unido	BEG
13	<i>Glomus claroideum</i>	BEG23	V. Gianninazzi-Person	Rep. Tcheca	BEG
14	<i>Glomus etunicatum</i>	DCS11	J. O. Siqueira	Brasil ^g	DCS-UFLA
15	<i>Glomus etunicatum</i>	DCS12	J. O. Siqueira	Brasil ^h	DCS-UFLA
16	<i>Glomus etunicatum</i>	DCS13	J. O. Siqueira	Brasil ^c	DCS-UFLA
17	<i>Glomus etunicatum</i>	DCS14	J. O. Siqueira	Brasil ⁱ	DCS-UFLA
18	<i>Gigaspora margarita</i>	WV205A	F. A. de Souza	EUA ^j	INVAM
19	<i>Gigaspora rosea</i>	FL105	F. A. de Souza	EUA ^k	INVAM
20	<i>Scutellospora heterogama</i>	CNPAB2	F. A. de Souza	Brasil ^l	CNPAB

^a CNPAB, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil; ESALQ, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, Brasil; UFLA, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil; BEG, The International Bank for Glomeromycota, Dijon, França; INVAM, International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Morgantown, W.V.

^b Proveniente da Flórida; ^c Três Pontas, MG; ^d Piracicaba, SP; ^e Rio de Janeiro, RJ; ^f Barra do Pirai, RJ; ^g Patrocínio, MG; ^h São Sebastião do Paraíso, MG; ⁱ Lavras, MG; ^j West Virginia; ^k Flórida; ^l São Paulo, SP.

- sem informação.

3.3 Descrição e Coleta do Experimento do Campo

Com o objetivo de estudar a persistência do *Glomus clarum* CNPAB5 após sua inoculação a campo, foi realizado experimento conduzido na Área Experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (latitude 22° 44’S, longitude 43° 42’W e altitude de 26 ms), no período de dezembro de 2008 a setembro de 2009. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso, com oito tratamentos dispostos em arranjo fatorial 2 x 4 com 4 repetições. O experimento foi instalado em um talhão de 32 x 33m, totalizando uma área de 1056 m² com uma área útil de 576 m². As parcelas apresentavam dimensões de 4 x 3 m sendo separadas por intervalos de 1 m.

Foram semeadas plantas de milho (M) e crotalária (C) em monocultivos, inoculados com a espécie de FMA *Glomus clarum* CNPAB5, na ocasião da semeadura, constituindo os tratamentos T1, T2, T3 e T4, com as seguintes doses de inoculação: 0, 300, 900 e 1800 esporos por m linear, respectivamente. A inoculação do *G. clarum* a campo foi feita com o semeio do substrato nas linhas de plantio de milho e crotalária, antes de plantar as sementes,

ou seja, essas ficaram sobre o substrato. A profundidade da inoculação foi de 5cm. A quantidade de substrato foi o seguinte para cada tratamento: 0, 132, 395 e 790 g de substrato por m linear, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

O solo foi preparado inicialmente com aração e gradagem. As características químicas do solo da área experimental encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Características químicas do solo da área experimental.

Bloco	pH em H ₂ O	Al ⁺⁺⁺ cmol _c /dm ³	Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺ cmol _c /dm ³	P mg/dm ³	K mg/dm ³
1	4,9	0,21	1,00	46,00	20,00
2	5,1	0,12	1,70	31,40	13,00
3	5,48	0,06	2,50	25,20	27,00
4	5,38	0,05	1,40	49,60	22,00

Tendo como base a análise inicial do solo e as recomendações contidas no Manual de Adubação para o Estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al, 1988), foram realizadas adubações para fornecimento de nitrogênio (20 kg ha) e de potássio (40 kg ha) na época de plantio e duas coberturas de N (20 kg ha) aos 30 e 45 DAP (dias após o plantio) somente para as linhas de milho, sendo fontes respectivamente, uréia e sulfato de potássio. Tanto a crotalária como o milho, foram semeados em sulcos distanciados de 0,40 m, com as seguintes densidades de plantio: 30 plantas/m linear para crotalária e 10 plantas/m linear para o milho.

Visando detectar a estratégia de colonização do *G. clarum* CNPAB5 inoculado e a diversidade temporal dos FMA foram realizadas 2 coletas durante a condução da primeira fase do experimento. A primeira procedeu-se no 35° DAP e a segunda no 95° DAP. Em ambas foram coletadas raízes de 3 amostras por parcela de modo a representar de forma mais fiel a diversidade espacial da comunidade micorrízica. As raízes pré-selecionadas no campo foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixa térmica até o transporte ao laboratório, onde foram lavadas com água corrente e secas em papel toalha. Visando remover partículas de solo aderidas, após a secagem, as raízes mais finas foram selecionadas e transferidas para tubos de 50 mL, contendo 0,1% de pirofosfato de sódio, onde ficaram sob agitação constante por 30 minutos. Após esse processo, as raízes foram submetidas a um processo de lavagem com água destilada e armazenadas em álcool etílico 70% para posterior realização das análises moleculares e determinação na taxa de colonização micorrízica.

No 105° DAP, em função da época do estágio fisiológico de floração da crotalária, as plantas de cobertura foram cortadas com o auxílio de catana e picadeira tratorizada. Após o corte, os resíduos vegetais (fitomassa) foram incorporados nas leiras empregadas para o plantio da batata-doce (BD). Doze dias após a incorporação, realizou-se o plantio de ramas de batata-doce, variedade Rosinha do Verdan, no espaçamento de 0,20 m entre plantas e 0,80 m entre leiras.

Foram realizadas 2 coletas nos 80° e 140° DAP. Os procedimentos realizados com as plantas de batata-doce, em relação à coleta da parte aérea, das raízes e do solo seguiram o mesmo procedimento utilizado nas coletas do milho e crotalária.

3.4 Colonização Micorrízica Intrarradicular

Para a avaliação da colonização intrarradicular pelos FMA, raízes de milho foram lavadas em água corrente e imersas em KOH 5% por uma noite. Depois, foram novamente lavadas em água corrente e imersas em HCl (1%) por uma noite. Em seguida, as raízes foram

aquecidas a 60°C por 1 hora em solução de glicerol acidificada (1% HCl) com Azul de Metila 0,01%. As estruturas fúngicas foram observadas em lupa e a colonização micorrízica foi estimada segundo GIOVANNETTI & MOSSE (1980).

Os dados de colonização micorrízica foram submetidos a testes para verificação de normalidade e homogeneidade com o auxílio do programa SAEG. Como os dados apresentavam-se não balanceados, para comparação de médias, foi utilizado o programa SAS, onde foram avaliados os contrastes entre as amostras pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.5 Extração de DNA de Raízes

As raízes armazenadas em álcool etílico 70% foram secas em estufa a 60°C. Após a eliminação dos resíduos de etanol as raízes foram maceradas em almofariz, com auxílio de um pistilo e N₂ líquido. Cerca de 50mg do macerado foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2,0mL, onde ocorreu a adição de 800µL de tampão CTAB 2% (Brometo de cetiltrimetilamônio), originalmente desenvolvido para extração do DNA vegetal (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998), e 0,1mg/ml de proteinase K. Os passos até a completa extração do DNA, foram: (i) agitação em vórtex por 3 segundos; (ii) incubação durante 1 hora a 65°C; (iii) precipitação das proteínas com adição de 800µL de fenol : clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1); (iv) homogeneização por inversão; (v) centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos; (vi) transferência da fase aquosa (superior) para um novo microtubo; (vii) lavagem com 500µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) a fim de se retirar os resíduos de fenol; (viii) centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos; (ix) transferência da fase aquosa (superior) para um novo microtubo; (x) precipitação do DNA com adição de 1mL de isopropanol e incubação a -20°C por uma noite; (xi) centrifugação a 13000 rpm durante 25 minutos; (xii) remoção do isopropanol; (xiii) lavagem do *pellet* com 150µL de etanol 70%; (xiv) centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos; (xv) remoção do etanol; (xvi) secagem do *pellet* a temperatura ambiente; (xvii) ressuspensão do DNA em 100µL tampão TE estéril. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

3.6 Extração de DNA de esporos de FMA

A extração de DNA de esporos de FMA foi feita segundo o procedimento descrito anteriormente por DE SOUZA e colaboradores (2004). Inicialmente, esporos previamente selecionados e armazenados em microtubos à -20°C foram transferidos para banho de gelo. Em seguida, os esporos foram macerados com o auxílio de um micro-pestilo (Treff AG, Degershein, Suíça). Imediatamente após a maceração adicionou-se 40 µl de tampão TE (Tris EDTA, 10:1) e 10µl de resina Chelex 20% (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) em cada tubo. Os tubos contendo esporos foram então submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento (N₂ líquido – 90°C), seguido de uma incubação a 95°C por 15 min. Após essa etapa, material foi centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos de 1,5mL. O produto de extração foi armazenado a -20°C, e utilizado quando necessário.

3.7 Condições do PCR para Amplificação do DNA dos Esporos de FMA e das Raízes

Inicialmente, foram adotadas três estratégias para a amplificação do DNA dos FMA e das raízes. Nas três abordagens foi utilizado um sistema de *nested*-PCR, onde o produto dessa

reação foi utilizado no DGGE, que permite a comparação em relação ao comportamento migratório, separação e resolução das bandas. O DNA de raízes foi diluído 30 vezes em água autoclavada de modo a ser utilizado como molde na PCR. O DNA extraído dos esporos de FMA foi utilizado diretamente na PCR.

Duas das estratégias utilizaram na 1ª PCR iniciadores específicos para *Glomus*, *Glomus-A* (modificado de REDECKER, 2000) ou *Glomus-B* (DE SOUZA, não publicado) de acordo com o grupo que pertencia a espécie analisada. Para ambos os grupos foi utilizado o iniciador ITS4 (WHITE et al, 1990) como reverso, produzindo um fragmento com aproximadamente 980pb. Uma terceira estratégia utilizou na primeira reação os iniciadores NS5 e ITS-4, que produziu fragmentos com aproximadamente 1515pb (WHITE et al, 1990). Os fragmentos amplificados e as sequências dos iniciadores utilizados nesse estudo estão indicados na Figura 3 e Tabela 4, respectivamente.

Para os pares de iniciadores *Glomus-A* ou *Glomus-B* / ITS-4, foi utilizado na reação um volume final de 20µl, com aproximadamente 20ng de DNA molde, sendo o “mix” composto de 0,3µM de cada iniciador, 2,5mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, BSA 0,1% (Soro albumina bovina - 3 mg/mL), formamida 1% (v/v) e 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences). O tampão de reação foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as PCR desse trabalho foram realizadas em termocicladores MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO RAD). As reações seguiram os passos: 94°C por 3 min; 2 ciclos de 94°C por 45 s; 60°C por 1 min; 72°C por 1 min; 2 ciclos de 94°C por 45 s; 59°C por 1 min; 72°C por 1 min; 28 ciclos de 94°C por 45 s; 58°C por 1 min; 72°C por 1 min; com um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

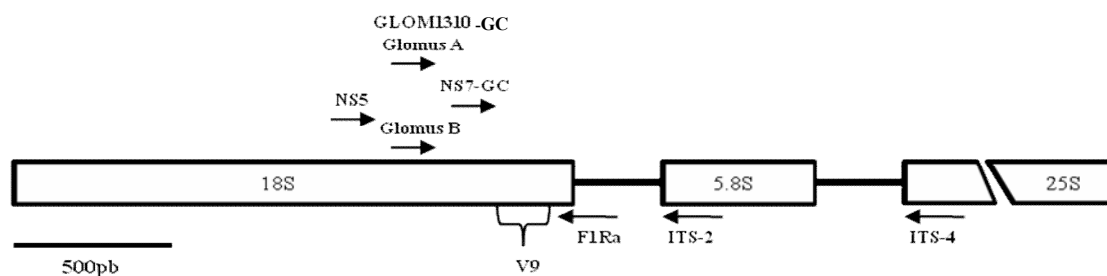


Figura 3. Representação esquemática do gene ribossomal (rDNA), indicando a posição de anelamento dos iniciadores utilizados nesse estudo. Em vermelho: iniciadores utilizados na 1ª de PCR. Em azul: iniciadores utilizados no *nested*-PCR.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados, grupo alvo e combinações utilizadas no presente estudo.

Iniciador ⁽¹⁾	Sequência	Grupo Alvo	Iniciador complementar
<i>Glomus-A</i>	5'-AGCTAGGYTAAACATTGTTA-3'	<i>Glomus</i> grupo A	ITS-4
<i>Glomus-B</i>	5'-TGCTAAATAGTTAAACCTGATT-3'	<i>Glomus</i> grupo B	ITS-4
GLOM1310-GC	5'-AGCTAGGYCTAACATTGTTA-3'	<i>Glomus</i> grupo A	ITS-2
NS5	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	Universal Eucariotos	ITS-4
NS7-GC ⁽²⁾	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	Universal Eucariotos	F1Ra

1. Fonte dos iniciadores: *Glomus A* (de Souza não publicado, modificado de Redecker, 2000); *Glomus B* (de Souza não publicado); NS7-GC e F1Ra (DE SOUZA et al, 2004); NS5, ITS2 e ITS4 (WHITE et al, 1990).

2. Grupo de GC: 5'-CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGG-3' (DE SOUZA et al, 2004).

Já na terceira estratégia (NS5 e ITS-4) o volume final foi de 20µL, com 20ng do DNA molde, sendo o “mix” composto por 0,2µM de cada iniciador, 2,5mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂ e 1 unidade de Taq Polimerase (Fermentas Life Sciences). O tampão de reação foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. As reações seguiram os passos: 95°C por 3 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s; 51°C por 1 min; 72°C por 2 min; com um passo final de extensão a 72°C por 10 min.

Para a amplificação do DNA a ser utilizado no DGGE o produto obtido na 1ª PCR foi diluído em água estéril na razão de 1:100 quando não apresentavam bandas no 1º PCR ou na razão de 1:1000 quando as bandas apareciam na primeira reação. A diferenciação entre as estratégias que utilizaram os iniciadores *Glomus*-A ou *Glomus*-B / ITS-4 na primeira PCR ocorreu no *nested* PCR. Em uma, foram utilizados os iniciadores NS7-GC e F1RA, enquanto na outra utilizou-se os iniciadores NS7-GC e ITS-2, produzindo fragmentos com 344 e 515pb, respectivamente, seguindo as mesmas condições descritas acima, diferindo somente no volume final que foi de 50 µL com 7 µL do produto da 1ª reação diluído. As reações seguiram os passos, respectivamente: 94°C por 2 min; 34 ciclos de 94°C por 45 s; 62°C por 1 min; 72°C por 28 s; com um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos e 94°C por 2 min; 34 ciclos de 94°C por 45 s; 60°C por 1 min; 72°C por 35 s; com um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Já o *nested*, da reação que utilizou os iniciadores NS5 / ITS-4, foi realizado com os iniciadores *Glomus*1310 (REDECKER, 2000) com grampo GC e ITS-2, que produziu um fragmento de 600pb, apresentando as mesmas condições descritas na 1ª PCR, diferindo somente no volume final que foi de 50µL com 7µL do produto da 1ª PCR diluído, seguindo os passos: 95°C por 1 min; 34 ciclos de 94°C por 20s; 55°C por 35 seg; 72°C por 1 minutos; com um passo final de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos do *nested*-PCR foram utilizados no PCR-DGGE. Nas três estratégias, os produtos gerados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (90 V, 80 minutos) a fim de se verificar a eficiência dos iniciadores, além de se detectar eventuais problemas na amplificação.

3.8 Análises por DGGE

As análises de DGGE foram realizadas em DCODE™ (Universal Mutation Detection System – BIORAD), e variaram de acordo com a estratégia adotada. Na estratégia em que foram utilizados os iniciadores NS7-GC / F1Ra o gradiente desnaturante foi de 30% a 50% em géis de acrilamida 7% (37:1; acrilamida:bis-acrilamida) ou de 32% a 42% em géis de acrilamida 8% (37,5:1; acrilamida:bis-acrilamida). Nas estratégias que utilizaram os iniciadores NS7-GC /ITS-2 e *Glomus* A / ITS-2 o gradiente foi de 25% a 45% e de 35% a 45%, respectivamente, em géis de acrilamida 6% (37,5:1; acrilamida:bis-acrilamida). Em todas as estratégias os géis tinham 1,8mm de diâmetro e 20 cm de comprimento. Após a aplicação de 20µL de cada amostra, a eletroforese foi iniciada a 200 volts por 10 minutos e seguida por 16 horas a 80v com o tampão de corrida TAE 0,5 X (10 mM tris-acetato [pH 7,4], 5 mM de acetato de sódio, 0,25 mM EDTA dissódico) a 60° C de temperatura.

Os géis foram corados em brometo de etídio e digitalizados em transiluminador de UV com captador de imagem (Kodak – Gel Logic 200 IMAGING SYSTEM). Quando a resolução do perfil de bandas do gel não era considerada ideal, procedia-se a coloração com nitrato de prata (AgNO₃) segundo a metodologia descrita por CRESTE (2001) com modificações. Para isso, os géis foram imersos em solução fixadora (álcool etílico 10% + ácido acético 1%) e mantido sob agitação por 10 minutos, seguido de lavagem de 1 minuto em água destilada. Após a lavagem o gel foi imerso em AgNO₃ e mantido sob agitação por 15 minutos. Os géis foram então lavados em água destilada e imersos em solução reveladora

(NaOH 3% + formaldeído 0,5 %) onde foi mantido até o aparecimento das bandas. Por fim, os géis foram transferidos para solução de bloqueio (ácido acético 5%) para evitar o escurecimento excessivo e lavados por 1 minuto em água destilada para serem fotografados.

Os géis foram analisados no programa Gel Compar 2 (Versão 3.1), com o coeficiente de similaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA (MUELLER-DOMBOIS & ELLEMBERG, 1974). Foram gerados dendro de similaridade e uma matriz binária de presença e ausência de bandas. O dendrograma permitiu fazer agrupamentos e a matriz binária localizar bandas correspondentes as do FMA inoculado.

3.9 Purificação e Clonagem do Gene Ribossomal de FMA Presentes nas Raízes e do *Glomus clarum* CNPAB5 Inoculado

Com o intuito de identificar as espécies de *Glomus* e verificar se o FMA inoculado estava presente nas raízes das plantas de milho, crotalária e batata-doce foi realizado um sistema de *nested*-PCR, utilizando na 1ª reação os iniciadores NS5 / ITS-4 e no *nested* os iniciadores *Glomus* A / ITS-2, de acordo com as condições descritas acima, utilizando amostras dessas culturas inoculadas com 1800 esporos. Paralelamente, foi desenvolvido um marcador a partir de clones que representassem as variantes do rDNA do *G. clarum* CNPAB5, de modo a ser utilizado no DGGE. Nesse sentido, foi realizada a amplificação do DNA de esporos de *G. clarum* CNPAB5, utilizando os iniciadores *Glomus* A e ITS-4, seguindo as mesmas condições citadas acima. O produto de ambas as reações foi aplicado em gel de agarose 1% a fim de se verificar a eficiência da amplificação.

Os amplicons, tanto os obtidos a partir da amplificação de DNA das raízes, quanto dos esporos de *G. clarum* CNPAB5, antes da clonagem, foram purificados, para eliminação dos iniciadores e sais, utilizando-se o kit comercial Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, modificando-se apenas o número de lavagens com isopropanol 80% de 1 para 2 vezes.

A clonagem dos amplicons foi feita no vetor pJET1.2 (Fermentas Life Sciences), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente por uma noite. As células bacterianas foram transformadas quimicamente, adicionando-se 10µL da ligação e 40µL do tampão de transformação (KCM 10x; PEG 10%; H₂O MilliQ) em um tubo de microcentrifuga de 1,5mL, colocado em gelo por 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 100µL de células ultra-competentes e o produto foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta, retornando ao gelo por 30 minutos. Após essa etapa, o tubo foi deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 700µL do meio Luria Bertani (LB – 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) ao tubo que ficou sob agitação a temperatura constante de 37°C por 1 hora. Por fim os tubos foram centrifugados rapidamente e 100µL do produto plaqueados em meio LB-ágar, contendo ampicilina (50µg/ml), seguido de incubação à temperatura de 37°C por 22 horas.

As colônias formadas foram individualizadas em novas placas contendo meio LB-ágar com ampicilina (50µg/ml) utilizando palitos de dente, previamente esterilizados em autoclave. O período de incubação foi de 22 horas à temperatura constante de 37°C.

3.10 Extração do DNA Plasmidial

Colônias individualizadas foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo 1mL de meio de cultivo LB e 100µL de ampicilina (50µg/ml) por poço e incubadas a temperatura de 37°C por 22 horas a 200 rpm (LAB-LINE[®] Incubator-Shaker). Após esse período de

crescimento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 20° C por 5 minutos a 4000rpm (Eppendorf, Centrifuge 5804R, Rotor: A-2-MTP) de modo a sedimentar as células bacterianas. O sobrenadante foi descartado, invertendo-se a microplaca e colocando-a sobre papel absorvente por 5 minutos. O *pellet* foi lavado pela adição de 200µL de GET (Glicose 20%, 0,5M EDTA, 1M Tris-HCl), a microplaca foi selada, e o *pellet* ressuspenso por agitação. As microplacas foram centrifugadas a 20°C por 5 minutos e 4000rpm. O sobrenadante foi descartado como descrito acima e adicionou-se ao *pellet* 80 µL de GET + RNase (10µg/ml). A microplaca foi novamente selada e as células bacterianas foram ressuspenso por agitação e 60µL da suspensão foram transferidos para microplacas de fundo redondo (composta por 96 poços). A cada poço foram adicionados 80µL de solução de lise composta por NaOH 0,2M e SDS 1%, a microplaca foi selada, homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida foi adicionado a cada poço 80µL de solução de acetato de potássio KOAc 3M. A microplaca foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e incubada aberta em estufa de ventilação constante (TECHNE, Hybridiser HB-1D) por 30 minutos. A microplaca foi selada e esfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 20°C por 9 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços Milipore (MAGV N22) fixada no topo de uma microplaca de fundo redondo. Esse conjunto foi centrifugado a 20°C por 3 minutos a 4000 rpm. A placa Milipore foi removida e adicionou-se 100µL de isopropanol gelado ao filtrado na microplaca de fundo redondo que foi selada e centrifugada a 20°C por 45 minutos a 4000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100µL de etanol 70% gelado à microplaca, que foi submetida à centrifugação a 20°C por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a microplaca invertida sobre papel absorvente e centrifugada até atingir 900 rpm. Após secar durante 1 hora em temperatura ambiente o DNA foi ressolubilizado em 30µL de água ultrapura autoclavada, quantificado em gel de agarose e armazenado a -20° C.

3.11 Seleção de Clones Via PCR-DGGE e Sequenciamento

Os clones sequenciados foram selecionados previamente por PCR-DGGE. O DNA plasmidial foi diluído em água ultrapura autoclavada (1:250; DNA:Água) e utilizado como “molde” para a PCR que utilizou os iniciadores NS7-GC / ITS-2, conforme as condições descritas acima. Para auxiliar a seleção de clones o perfil de bandas de DGGE obtido a partir da amplificação de esporos de *G. clarum* CNPAB5 foi utilizado com padrão (marcador). A seleção dos clones foi baseada na posição das bandas apresentada no DGGE, sendo selecionados aqueles que migraram para posições diferentes no gel de acrilamida, de modo a representar as variáveis do rDNA dos FMA.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se 2µL de DNA plasmidial, 2µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2µL de tampão de diluição (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂.6H₂O), 0,5µL do iniciador PJET 1.2 (10µM) e água ultrapura, com volume final de 10µL. As reações foram submetidas a 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, repetidos por 30 ciclos.

Ao término da reação, foram adicionados ao produto 40µL de isopropanol 75% (v/v), seguido de homogeneização e incubação no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 45 minutos. O isopropanol foi retirado, vertendo-se diretamente as placas. Foram adicionados 10µL de etanol gelado 70% (v/v) e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o etanol, vertendo novamente a placa e deixando o *pellet* secar em estufa a 65° C por 3 minutos. Por fim, adicionou-se ao *pellet* 10µL de formamida HI-DI que foi submetido à desnaturação no

termociclador a 95° por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Especificidade dos Iniciadores

A especificidade dos iniciadores *Glomus*-A e *Glomus*-B utilizados no presente estudo foi confirmada, uma vez que, tendo como reverso ITS-4, possibilitou a amplificação do DNA somente dos grupos alvo (*Glomus* A ou *Glomus* B), com tamanho esperado (em torno de 980pb), não ocorrendo amplificação inespecífica (dados não mostrados). No teste de especificidade, para o iniciador *Glomus* A, além das espécies utilizadas por REDECKER (2000), adicionou-se *G. mosseae*, *G. coronatum*, *G. caledonium* e *G. intraradices*, além de espécies não alvo. Já para o iniciador *Glomus* B foram utilizadas quatro isolados de *G. etunicatum* e um de *G. claroideum*, além das espécies de *Glomus* A e de outros gêneros, como controle negativo. O iniciador *Glomus* A (DE SOUZA não publicado) possui 1 base degenerada a mais em relação ao iniciador GLOM1310 (ver Tabela 4) desenvolvido por REDECKER (2000). Conforme observado na figura 4, as espécies de *Glomus* A, apresentam, na região onde se anelam esses iniciadores, 2 bases degeneradas, que variam entre CC, CT ou TC. Logo, o iniciador *Glomus* A, por possuir também duas bases degeneradas, é mais abrangente, uma vez que permite a amplificação do DNA de espécies com ambas as variações.

A figura 4 ilustra a homologia da sequência dos iniciadores *Glomus* A e *Glomus* B em relação à sequências alvo e não alvo. Repare no iniciador *Glomus* A as 2 bases degeneradas, representadas por Y. Os FMA pertencentes a outros gêneros e também os representantes de outros filões de fungos, não possuem sequência complementar a esses iniciadores, o que vem a corroborar com a especificidade dos mesmos e garantir a amplificação somente de representantes do gênero *Glomus*.

Nesse trabalho foram utilizadas diferentes estratégias de *nested*-PCR. Primeiramente, foram empregados iniciadores específicos para *Glomus* no 1º PCR – *Glomus* A ou *Glomus* B – seguido de *nested* com iniciadores universais acrescidos de uma sequência grampo utilizados no DGGE – NS7-GC / F1Ra ou ITS-2. Essa estratégia permite que somente material genético de membros do gênero *Glomus*, possam ser amplificados no *nested*-PCR, uma vez que esses já foram selecionados pelo uso de um iniciador específico na primeira PCR. No entanto, é necessário salientar que essas estratégias podem não funcionar quando a população de *Glomus* for baixa no material analisado, como em raízes ou solo, por exemplo. Em outra estratégia, foram utilizados iniciadores universais no 1º PCR – NS5 / ITS-4 – seguido de *nested* com iniciadores específicos para *Glomus* – GLOM1310. A utilização dessa abordagem resultou em grande quantidade de material genético para ser usado como molde no *nested*-PCR, onde ocorria a seleção dos membros de *Glomus* grupo A. Esse tipo de abordagem mostra-se interessante quando a população de FMA de determinado gênero no material analisado for baixa. A utilização de iniciadores grupo-específico mostra-se pertinente quando se deseja selecionar determinado grupo de amostras ambientais, onde não se tem o conhecimento dos FMA presentes nas raízes das plantas estudadas.

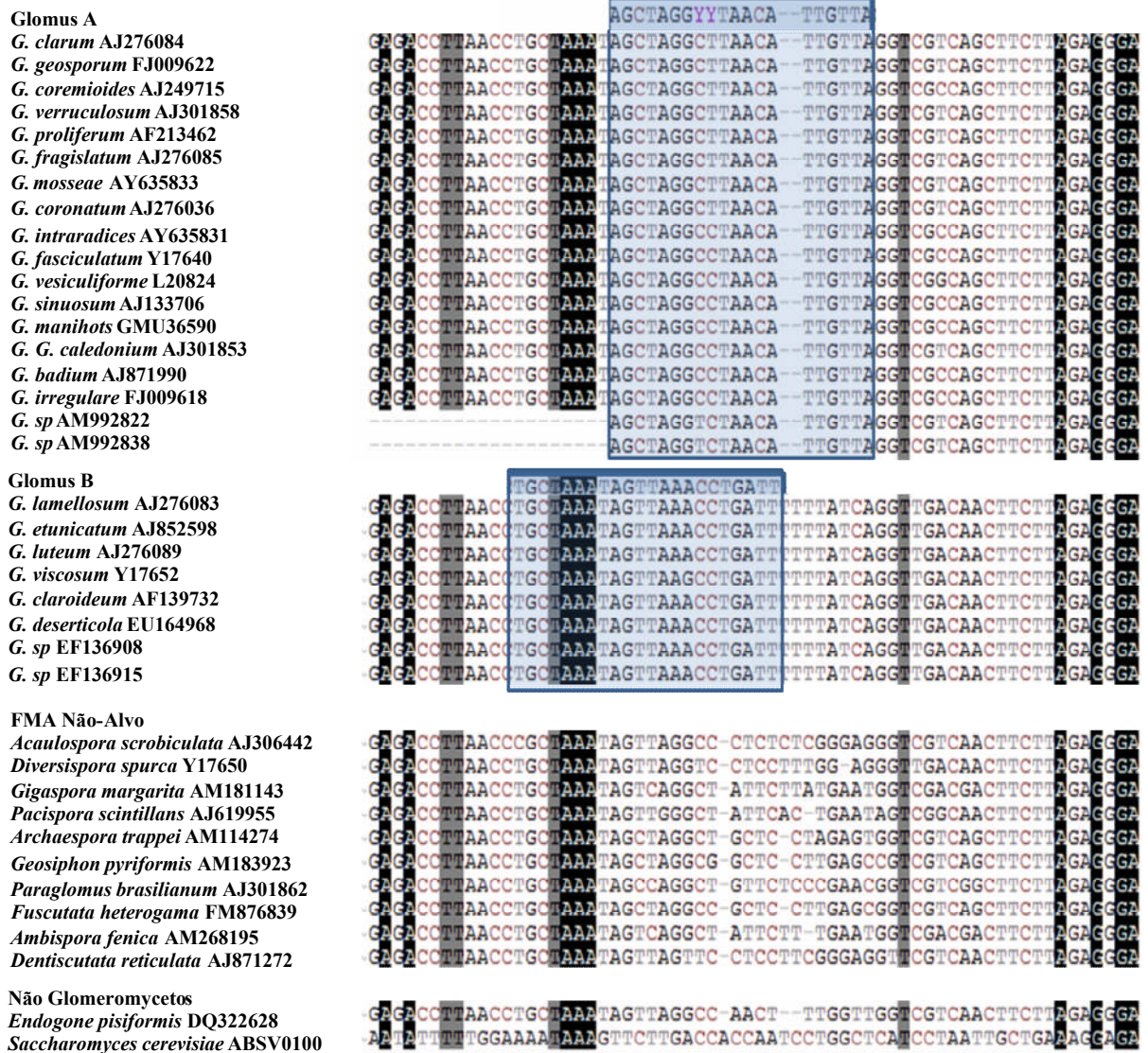


Figura 4. Sítios de anelamento dos iniciadores *Glomus-A* e *Glomus-B* na subunidade ribossomal 18S de FMA pertencentes aos grupos A e B do gênero *Glomus*. Foram colocados FMA não alvo e não Glomeromycetos para indicar a especificidade dos iniciadores. As seqüências foram alinhadas de modo a facilitar a visualização.

4.2 Perfil de PCR-DGGE de FMA

O emprego da técnica de PCR-DGGE possibilitou diferenciar as espécies de *Glomus* utilizadas, com essas apresentando comportamento migratório característico. Praticamente todos os isolados avaliados produziram perfis com múltiplas bandas, independente do conjunto de iniciadores utilizados no DGGE (Figura 5A, B e C), confirmando o polimorfismo intragenômico do gene ribossomal para as regiões avaliadas (DE SOUZA et al., 2004, 2005; NOVAIS et al, 2010). Para as estratégias em que os amplicons possuíam a região ITS, a variabilidade entre cópias do rDNA das regiões analisadas, possibilitou diferenciar espécies ao nível de isolados, por exemplo, duas estirpes de *G. mosseae* (DCS28 e BEG12). Essa

variabilidade ao nível de isolados mostrou alta especificidade e consistência, uma vez que se apresentou sempre com o mesmo padrão de bandas nos inúmeros DGGE realizados, podendo ser útil na identificação específica destas estirpes em experimentos envolvendo competição ou em estudos de estabelecimento, além de experimentos que avaliam os efeitos de FMA sobre as plantas, considerando que os FMA são altamente específicos em relação ao seu efeito no hospedeiro, inclusive a nível de isolados (KOCH et al, 2006). De modo a indicar a reprodutibilidade do método adotado, todas as análises foram feitas com amostras em duplicatas independentes com essas sempre apresentando o mesmo padrão.

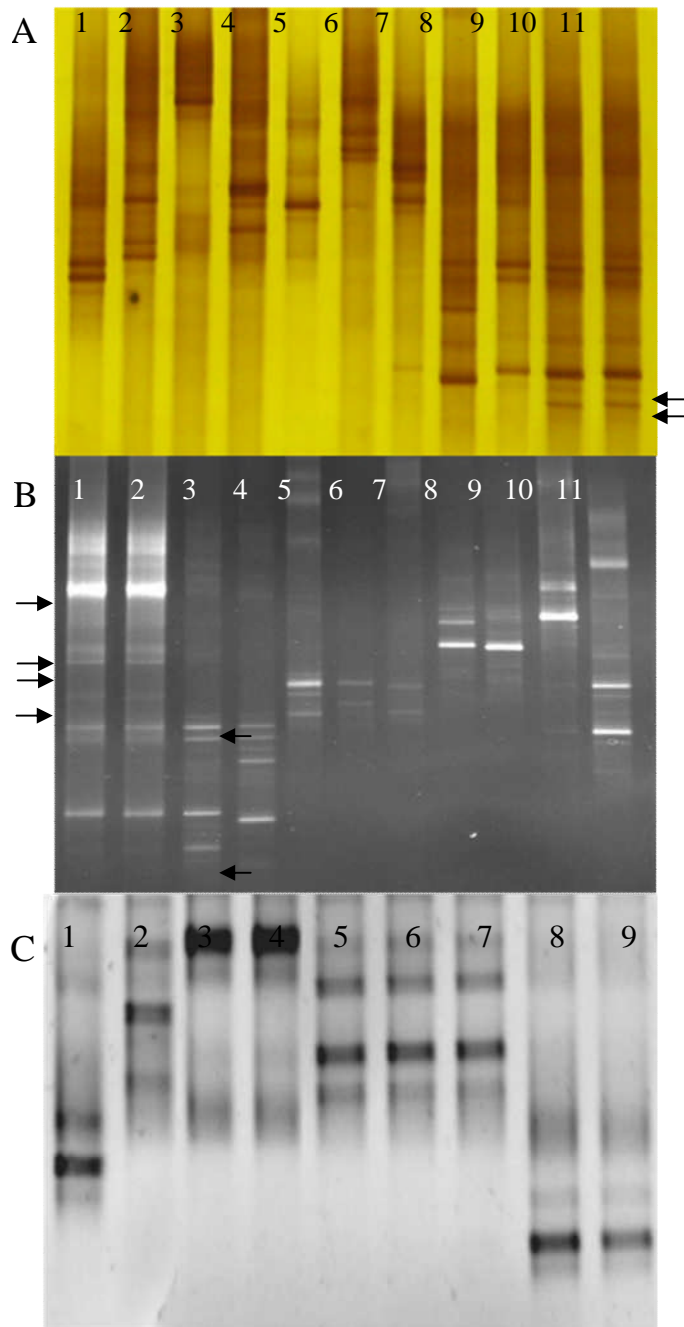


Figura 5. Perfis de DGGE das espécies de *Glomus* utilizadas nesse estudo. (A) NS7-GC / ITS-2. Foi utilizado um gradiente de 25% - 45%, em gel de acrilamida 6%, com 16 horas de corrida a 80 Volts (aa:bis – 37,5:1). 1. *G. formosanum* ESALQ; 2. *G. geosporum* BEG11; *G. caledonium* BEG 20; 4. *G. mosseae* DCS28; 5. *G. mosseae* BEG12; 6. *G. intraradices* Biorize; 7. *G. intraradices* ESALQ; 8. *Glomus*. sp CNPAB12; 9. *G. clarum* DCS10; 10 *G. clarum* DCS9; 11. *G. clarum* CNPAB5. As setas indicam as bandas nas estirpes de *G. clarum* CNPAB5 e DCS9 que são ausentes na estirpe UFLA170. (B) GLOM1310-GC / ITS-2; Foi utilizado um gradiente de 25% - 35%, em gel de acrilamida 6%, com 16 horas de corrida a 75 Volts (aa:bis – 37,5:1). 1. *Glomus clarum* CNPAB 5; 2. *G. clarum* DCS9; 3. *G. clarum* DCS10; 4. *Glomus*. sp CNPAB 12; 5. *G. mosseae* BEG 12; 6. *G. mosseae* DCS28; 7. *G. coronatum* BEG22; 8. *G. intraradices* Biorize; 9. *G. intraradices* ESALQ; 10. *G. caledonium* BEG 20; 11. *G. geosporum* BEG 11. As setas amarelas indicam as bandas presentes nas estirpes de *G. clarum* CNPAB5 e UFLA306 não detectadas na estirpe UFLA170. As setas vermelhas indicam bandas detectadas na estirpe de *G. clarum* UFLA170 que são ausentes em CNPAB5 e UFLA306. (C) NS7-GC / F1Ra. Foi utilizado um gradiente de 30% - 50%, em gel de acrilamida 7%, com 16 horas de corrida a 75volts (aa:bis – 37:1). 1 - *G. clarum* CNPAB5; 2 - *G. intraradices* BIORIZE; 3 - 4 - *G. mosseae* DCS28; 5 - 7 - *Glomus*. sp. CNPAB12; 8 - 9 - *G. etunicatum* UFLA 221.

A utilização dos iniciadores NS7-GC / F1Ra não possibilitou a separação entre isolados de uma mesma espécie (Dados não mostrados). Considerando que os genes ribossomais apresentam regiões altamente conservadas (18S, 5,8S e 25S) flanqueando regiões hipervariáveis (ITS), uma explicação para esse resultado se deve a região amplificada por esses iniciadores não incluir a região ITS, logo apresenta menor variabilidade, o que torna a separação de espécies com padrão genético similar mais difícil pela técnica adotada. Já a utilização dos pares de iniciadores NS7-GC / ITS-2 e Glom1310-GC / ITS-2, amplifica, além da região V9 do 18S rDNA, a região ITS1, que, devido a sua hipervariabilidade, permite a separação de organismos geneticamente próximos, como por exemplo, isolados de uma mesma espécie (Figura 5 A e B).

Um ponto a ser destacado nas estratégias que utilizaram os iniciadores que amplificavam a região ITS, foi que a diferenciação entre os isolados DCS28 e BEG12 de *G. mosseae* e Biorize e ESALQ de *G. intraradices*, foi bem mais evidente que a diferenciação entre os isolados de *G. clarum* DCS10, CNPAB5 e DCS9 (Figura 5A e 5B) – esses dois últimos representam o mesmo isolado, com a mesma origem, porém, por terem sido mantidas no Brasil em laboratórios diferentes, receberam códigos de identificação distintos – (ver tabela 2). Os perfis de bandas obtidos para os diferentes isolados geográficos de *Glomus* indicam variação genética entre esses isolados, sendo mais similar entre os isolados de *G. clarum*, em relação aos isolados de *G. intraradices* e *G. mosseae*. Um fato a se destacar é que, como os FMA sofrem variabilidade genética ao longo do tempo, mesmo organismo de origem comum podem ser diferenciados. Isso é exemplificado na seção 4.3, onde a variabilidade do rDNA entre esporos de *G. clarum* CNPAB5 foi elevada a ponto de ter sua sequência relacionada a *G. irregulare*.

Variabilidade genética entre isolados geográficos de uma mesma espécie já tinha sido observado anteriormente em outros estudos (GIOVANNETTI et al, 2003; AVIO et al, 2009). Em ambos foram analisados isolados de *G. mosseae*. O primeiro estudo verificou a não ocorrência de anastomose entre hifas de diferentes isolados geográficos, ocorrendo retração do protoplasma e formação de septos, indicando incompatibilidade vegetativa e, consequentemente, variabilidade genética entre os isolados. Os autores observaram através de PCR-RFLP maior nível de diversidade molecular entre 2 isolados europeus (IMA1 e BEG25), do que entre um europeu (IMA1) e isolados com origem nos EUA. No segundo estudo, os autores avaliaram a variabilidade morfológica e genética de isolados de *G. mosseae* provenientes de quatro continentes. Foi verificado que todos os isolados apresentaram um único perfil de restrição com a enzima *Hinf1*. Em contrapartida, através de ISSR-PCR, a magnitude da divergência genética entre isolados geográficos foi superior a 50%, sugerindo que a diversidade intraespecífica é muito superior que o previsto pela morfologia e por regiões do rDNA, e deve ser investigado usando outros genes, tais como os relacionados a diversidade funcional. Apesar disso, o presente estudo demonstrou que, desde que analisados amplicons que possuam a região ITS, é possível discriminar claramente isolados geográficos de uma mesma espécie, utilizando-se regiões do rDNA.

Em relação às espécies de *Glomus* B, o ajuste da concentração de desnaturantes, acrilamida e condições da eletroforese não foram obtidas para amplicons desse grupo que continham parte da região ITS. O fragmento com a região V9 separou claramente das espécies do grupo A (Figura 5C), porém as estirpes DCS11, DCS12, DCS13 e DCS14 de *G. etunicatum*, além de não apresentarem variação no padrão de bandas entre si, também apresentaram comportamento migratório idêntico a *G. claroideum*, não sendo separadas (Dados não mostrados). Visando determinar se a não separação indicava que as sequências comparadas eram semelhantes ou se a técnica não apresentava poder de resolução para diferenciar os fragmentos amplificados, a similaridade entre sequências depositadas no *Genbank* para espécies desse grupo foi determinada. Essa análise mostrou que as sequências

das espécies *G. claroides* AJ276075 e *G. etunicatum* AJ855298 apresentavam, para a região do fragmento analisado, 99,42% de similaridade. Esse resultado sugere que a mobilidade eletroforética semelhante foi devido à alta similaridade entre as sequências na região analisada e que, nesse caso, o DGGE não apresentou poder de separação para diferenciar polimorfismos únicos.

É necessário ressaltar que, mesmo não apresentando variação suficiente para separar os isolados de *G. clarum* e de *G. etunicatum*, além de não separar as espécies do grupo *Glomus* B utilizadas no presente trabalho, a região V9 foi utilizada para caracterização molecular de outros FMA, conforme demonstrado por DE SOUZA e colaboradores (2004), que encontraram diferenças claras no padrão de bandas de vários isolados de *Gigaspora albida*, *Gigaspora margarita* e *Gigaspora gigantea*, essa com 2 estirpes isoladas do mesmo sítio experimental, demonstrando o poder do PCR-DGGE em diferenciar espécies de *Gigaspora*, inclusive ao nível de isolados. DE SOUZA e colaboradores (2005) utilizaram com sucesso a mesma região para discriminar *Scutellospora reticulata* das outras espécies desse gênero, porém não conseguiram separar as espécies *Sc. calospora* e *Sc. coralloidea*, que apresentavam sequências próximas. Também analisando a mesma região para caracterizar 36 isolados fúngicos mantidos em vasos de cultivo na coleção do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), NOVAIS e colaboradores (2010) obtiveram a separação de todas as espécies, inclusive as pertencentes ao mesmo gênero, porém, da mesma forma ocorrida no presente trabalho, não foi observada qualquer diferença entre os isolados geográficos de *G. clarum*, e entre os de *G. etunicatum*.

Até o momento poucas espécies de *Glomus* foram caracterizadas filogeneticamente quanto ao seu grupo (Aa, Ab ou B) correspondente. Os iniciadores utilizados nesse estudo permitem uma rápida caracterização das espécies de *Glomus* quanto ao grupo A ou B sem que seja necessário sequenciamento.

Devido à condição de simbionte obrigatório dos FMA, a identificação desse grupo baseia-se principalmente na análise da morfologia dos esporos. Dessa maneira, a identificação taxonômica precisa, é extremamente dependente da habilidade e interpretação do taxonomista, ou seja, uma mesma espécie pode ter identificações distintas de acordo com o taxonomista que a avaliou (REDECKER, 2003). Nesse sentido a utilização de uma ferramenta molecular que permita a caracterização dos FMA, possibilitando a separação não só ao nível de espécie, mas também de isolado, uma vez que os FMA são específicos em relação a seus efeitos nas plantas (PAULA et al, 1988; KOCH et al, 2006), surge como alternativa para superar os obstáculos da identificação morfológica. Os resultados obtidos indicaram que o PCR-DGGE representa uma ferramenta rápida e confiável para identificação e caracterização de espécies de FMA do gênero *Glomus*, considerando que os perfis das espécies testadas foram reprodutíveis, e que a consistência do polimorfismo entre cópias do rDNA para uma mesma espécie, pode ser utilizada como uma característica vantajosa para a geração de perfis de rDNA estirpe-específicos para identificação e detecção de FMA.

4.3 Desenvolvimento de Marcador para DGGE e Caracterização da Heterogeneidade do rDNA de *Glomus clarum* CNPAB5

Para comparar diferentes DGGE, faz-se necessário a utilização de um marcador padrão, comum a todos os géis, uma vez que uma das limitações dessa técnica é a baixa reprodutibilidade entre géis (ROSADO & DUARTE, 2002). Para que o marcador possa ser útil nessa comparação, é necessário que ele possua um padrão de bandas bem definido e, de preferência, apresente bandas distribuídas ao longo do gel. Possuindo essas características, um marcador pode ser uma amostra ambiental, uma espécie de FMA ou, como no presente

estudo, ser obtido a partir de clones que representam variantes do rDNA no genoma de uma determinada estirpe de FMA. Nesse sentido, DNA de *G. clarum* CNPAB5 foi amplificado com os iniciadores *Glomus* A / ITS-4, sendo o produto da reação purificado e clonado no vetor pJET1.2. Os clones foram amplificados com os iniciadores NS7-GC / ITS-2 de modo a serem utilizados no DGGE. Um aspecto importante observado no DGGE com os clones do *G. clarum* CNPAB5, foi o aparecimento de um número superior de bandas, além de mais intensas, quando comparadas com o perfil obtido diretamente de esporos (Figura 6). Esse resultado era esperado, porque as bandas no DGGE representam os amplicons mais abundantes, já a clonagem pode revelar sequências em menor quantidade dentro de uma população, considerando que cada clone representa apenas uma das variantes do rDNA. A seleção dos clones sequenciados por PCR-DGGE, possibilita o desenvolvimento de uma estratégia de avaliação do polimorfismo do rDNA e estudar em detalhes o polimorfismo entre cópias do rDNA em um indivíduo (esporo) (DE SOUZA et al., 2004). Clones que apresentaram posições distintas no DGGE, representam variantes do rDNA do *G. clarum* CNPAB5, foram sequenciados, sendo relacionados, independente da posição no gel, à *G. clarum* quando comparadas com sequências no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa BlastN, com exceção de um clone que apresentou sequência relacionada a *G. irregulare*, evidenciando que a heterogeneidade entre cópias do rDNA de *G. clarum* CNPAB5 se mostra tão elevada a ponto de se relacionar a outra espécie (Tabela 5). Essa característica já havia sido reportada para *Gigaspora* e *Scutellospora* sensu stricto por DE SOUZA e colaboradores (2004 e 2005, respectivamente) indicando, possivelmente, sinais de hibridização entre as espécies (DE SOUZA 2007). Por fim, foram selecionados 5 clones para formar o marcador a ser utilizado no DGGE para análise de comunidade de FMA (Figura 6). É necessário frisar que para serem utilizados como marcador, os clones foram sempre amplificados separadamente, sendo reunidos somente no momento da aplicação no gel.

Tabela 5. Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas esporos de *G. clarum* CNPAB5, utilizando os iniciadores *Glomus* A / ITS-4.⁽¹⁾

Código clones ⁽²⁾	Sequência mais similar	Acesso	Similaridade (%) ⁽³⁾⁽⁴⁾	Cobertura (%) ⁽⁴⁾
7E / 7G / 8C / 8E 8F / 9C / 9D / 10B 10C / 11A / 12A / 12B	<i>G. clarum</i>	FN423697	96 – 99	91 – 100
7A / 7F / 8D / 9A / 10A / 10D / 12C/ 12E 8A / 12F	<i>G. clarum</i>	FN423696	95 – 98	91 – 99
	<i>G. clarum</i>	FM865544	98	85 – 98
7D	<i>G. irregulare</i>	FJ009617	94	99

1. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> no dia 24/08/2010.

2. Cl se refere ao número da colônia onde se obtiveram os clones.

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

4. Quando aparecem 2 valores separados por um – significa que a faixa de variação entre os clones.

O perfil de bandas do marcador foi condizente com o gradiente desnaturante crescente e a porcentagem nucleotídica da região amplificada, onde os clones com maior conteúdo de GC migraram para as regiões do gel com maior concentração de desnaturantes e os com menor GC tiveram comportamento oposto (Tabela 6 e Figura 6).

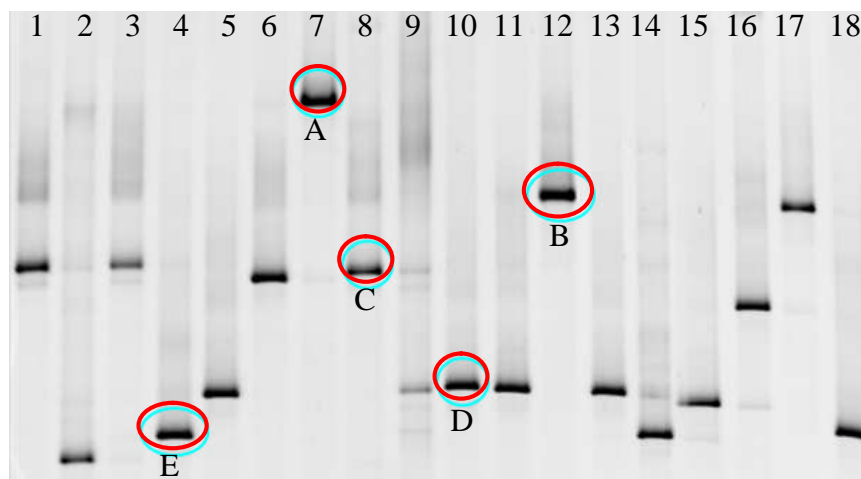


Figura 6. Perfil de DGGE utilizando os iniciadores NS7-GC / ITS-2 dos clones de *G. clarum* CNPAB5. Foi utilizado um gradiente de 25% - 45%, com 16 horas de corrida a 75 volts. 1-8 e 10-18 – Clones de *G. clarum* CNPAB5; 9 – Esporo de *G. clarum* CNPAB5. Os clones selecionados para o marcador estão identificados com uma letra e destacados por um círculo.

Tabela 6. Porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada com os iniciadores NS7-GC / ITS-2 dos clones de *G. clarum* CNPAB5 utilizados para formação do marcador.

Espécie	Código dos clones (de acordo com a Figura 6)	% GC da região amplificada
<i>G. clarum</i> CNPAB5	A	41,14
<i>G. clarum</i> CNPAB5	B	42,86
<i>G. clarum</i> CNPAB5	C	43,24
<i>G. clarum</i> CNPAB5	D	43,68
<i>G. clarum</i> CNPAB5	E	43,81

O marcador foi utilizado, também, com o intuito de se obter um padrão de bandas correspondente ao organismo inoculado e permitir a localização do FMA correspondente nas raízes, realizando, dessa maneira, o monitoramento do FMA inoculado. No entanto, quando se realiza a amplificação a partir de esporos de FMA, mesmo que seja a partir de um único esporo, dependendo da região amplificada, esse produzirá inúmeras bandas, devido a heterogeneidade entre cópias do rDNA, fazendo que a eficiência da amplificação de um ribotipo específico diminua, resultando em bandas menos intensas e em número inferior quando comparadas a perfis obtidos a partir de clones. Como consequência disso, o perfil obtido a partir dos esporos de *G. clarum* CNPAB5, apresentava sempre uma banda a menos que o marcador. Dessa maneira, com o intuito de representar de forma mais fiel o organismo inoculado, foi utilizado no DGGE das raízes, além do marcador, uma amostra de *G. clarum* CNPAB5.

4.4 Análise da Inoculação a Campo de *G. clarum* CNPAB5 em Plantas de Milho, Crotalária e Batata-Doce Cultivada em Rotação por PCR-DGGE

A avaliação do estabelecimento e persistência do FMA inoculado *G. clarum* CNPAB5, bem como das variações temporais e espaciais nas comunidades de FMA do gênero *Glomus*,

foi realizada em raízes coletadas aos 35 e 95 DAP para o primeiro ciclo do experimento, e aos 80 DAP para o segundo ciclo, sempre utilizando três plantas por parcela. Da mesma maneira adotada para os FMA, foram utilizadas três estratégias de PCR-DGGE para as raízes, de modo a selecionar a mais adequada para detectar o FMA inoculado, bem como identificar eventuais alterações da comunidade dos FMA nativos. Foram utilizadas amostras de milho da 1ª coleta, que representavam os 4 tratamentos: controle e/ou inoculados com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5/m linear. A estratégia adotada para avaliar a inoculação de *G. clarum* CNPAB5, bem como seus efeitos sobre outras populações de FMA, foi a que utilizou os iniciadores NS7-GC / ITS-2, uma vez que os perfis produzidos pelos pares de iniciadores NS7-GC / F1Ra e Glom1310-GC /ITS-2 foram muito semelhantes entre os tratamentos.

De modo a facilitar a visualização do perfil de bandas apresentado por cada amostra, foram construídos dendrogramas de similaridade por coleta, sendo aplicados a todas as culturas analisadas no presente estudo (ver Anexos A-F). Com as informações da matriz binária gerada pelo programa Gel Compar II, foi montada uma tabela relacionando a cultura, a época de coleta e a dose de inoculação com o número de bandas apresentado por cada tratamento (Tabela 7).

Tabela 7. Número total de bandas detectadas⁽¹⁾ por tratamento nos perfis de DGGE das raízes de milho, crotalária e batata-doce, cultivada em sucessão, submetidos a diferentes doses de inoculação.

Tratamentos ⁽²⁾	1º Ciclo		2º Ciclo
	Milho		Batata-doce
	1ª Coleta	2ª Coleta	
	Nº bandas	Nº bandas	Nº bandas
T1	42	30	17
T2	46	33	25
T3	47	33	18
T4	52	31	21
	Crotalária		Batata-doce
T1	19	14	22
T2	32	13	26
T3	38	20	24
T4	33	17	21



1. O número de bandas apresentado por cada tratamento na tabela é resultado do somatório das bandas dos tratamentos dos 3 blocos analisados do experimento.





2. **T1, T2, T3 e T4**, representam o tratamento não inoculado e inoculado com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5/m linear, respectivamente.

A análise das plantas do 1º ciclo do experimento revelou padrão de bandas heterogêneo entre e dentro dos tratamentos para ambas as culturas, não sendo possível estabelecer relação entre esse padrão e a dose de inoculação (Figuras 7 e 8; Anexo A - D). Para alguns casos, foi observada elevada similaridade entre plantas submetidas a diferentes doses de inoculação, inclusive o tratamento controle com amostras dos tratamentos inoculados. É importante ressaltar que a ocorrência natural de *G. clarum* foi observada em

parcelas não inoculadas desse experimento, inclusive na batata-doce cultivada em rotação (SOUZA, 2010), ocorrendo um aumento significativo no número de esporos em resposta a inoculação até as doses de 1300 a 1400 esporos respectivamente por m linear (SOUZA, 2010), sugerindo que a inoculação favoreceu o aumento de propágulos do fungo inoculado.

Legenda:

Época de coleta:  - 1ª Coleta  - 2ª Coleta

Dose de inoculação:  - Sem inoculação  - 300 esporos  - 900 esporos  - 1800 esporos

Bloco e Repetição:  - 1  - 2  - 3

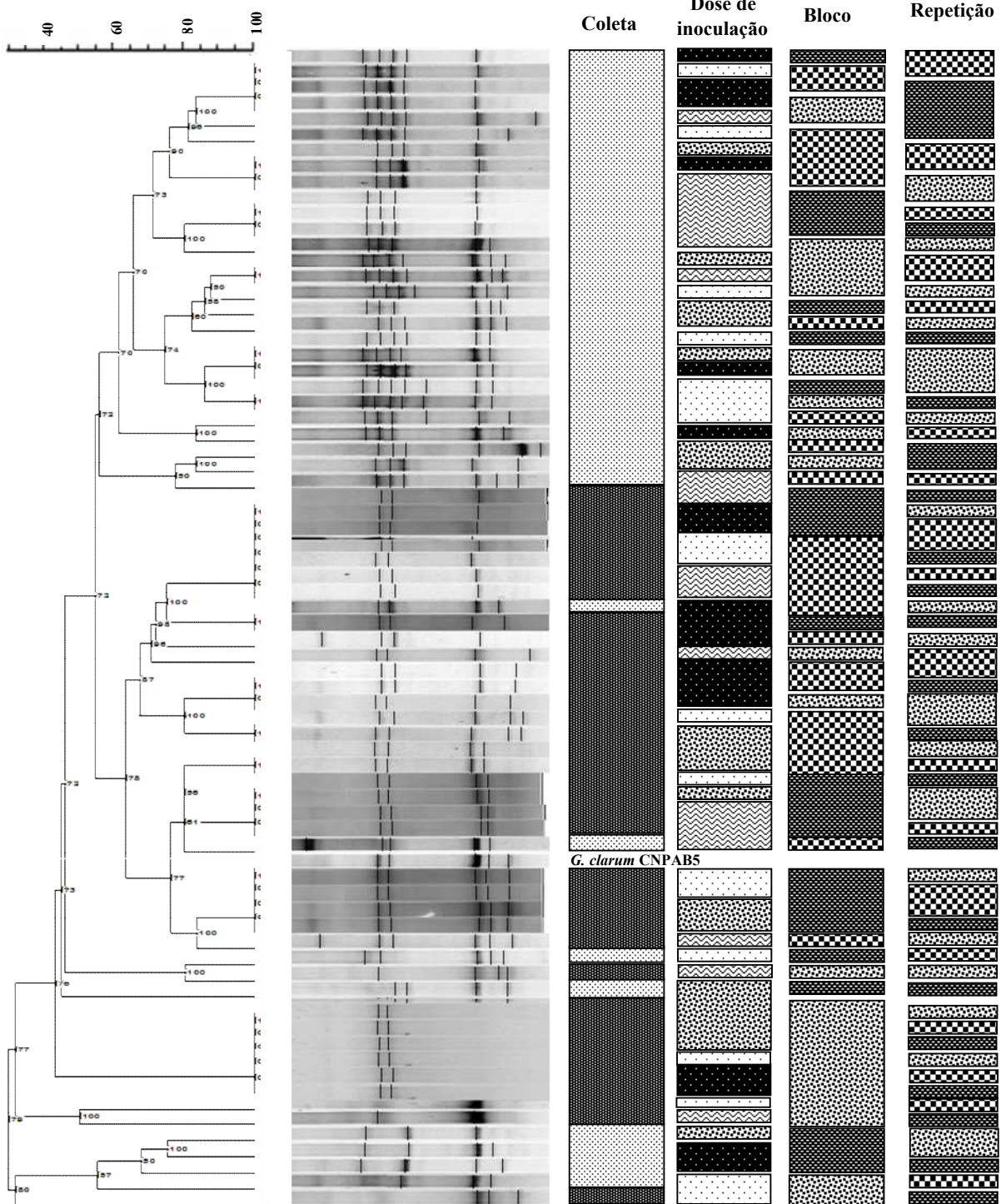


Figura 7. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente as 2 coletas de plantas de milho submetidas a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

Legenda:

Época de coleta: [padrão] - 1ª Coleta [padrão] - 2ª Coleta

Dose de inoculação: [padrão] - Sem inoculação [padrão] - 300 esporos [padrão] - 900 esporos [padrão] - 1800 esporos

Bloco e Repetição: [padrão] - 1 [padrão] - 2 [padrão] - 3

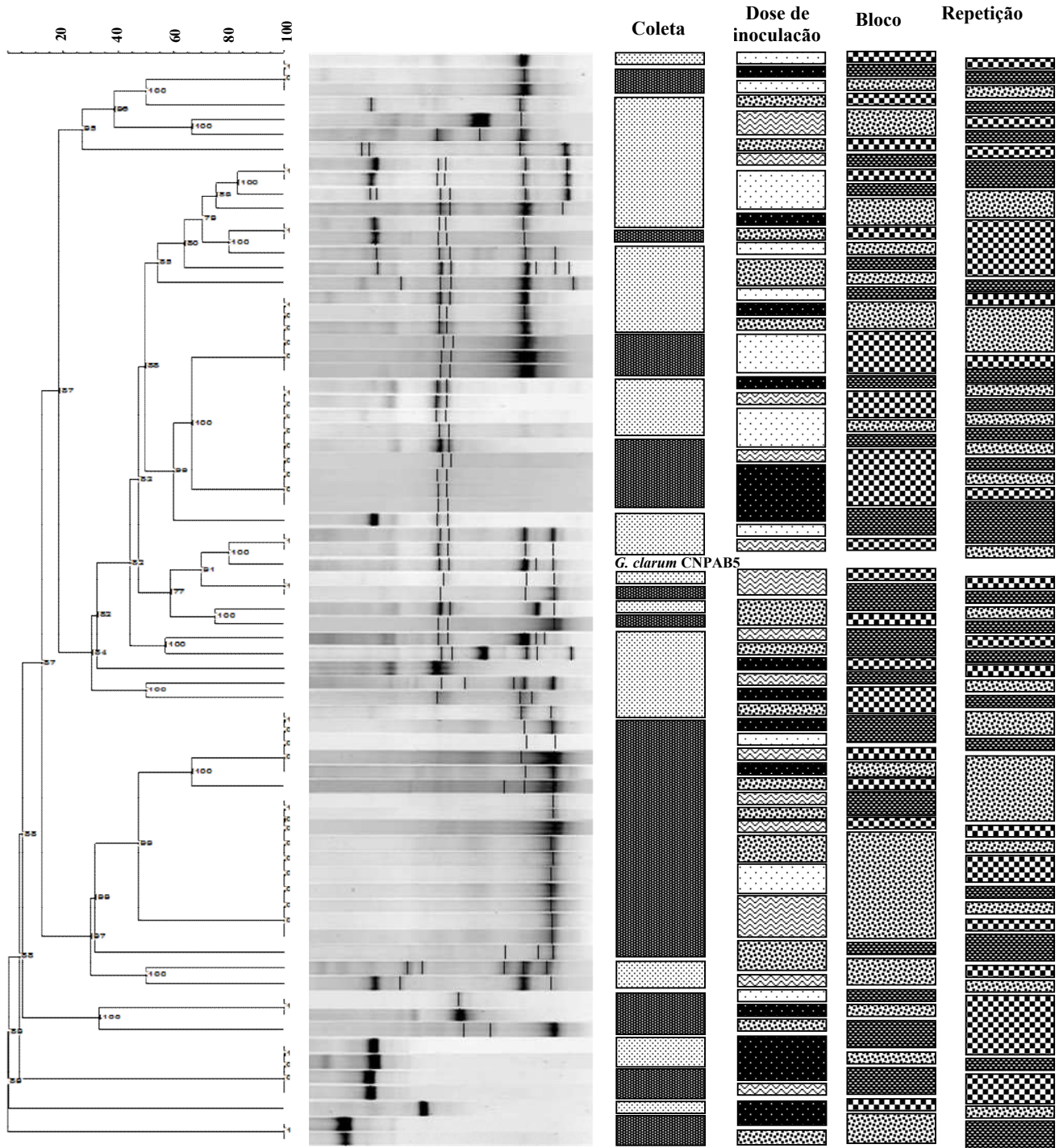


Figura 8. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente as 2 coletas de plantas de crotalária submetidas a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

Na primeira coleta do milho, observou-se um elevado número de bandas relacionadas a outras espécies do gênero *Glomus*, além do *Glomus clarum* (Figura 7 – Anexo A). A indicação da presença de outros representantes desse gênero, além do FMA inoculado, se deve, possivelmente, a estratégia de vida de algumas espécies desse gênero, por exemplo, *G. proliferum*, *G. caledonium* e *G. intraradices*, que colonizam rapidamente o hospedeiro (DE SOUZA et al, 2005). Conforme observado nos estudos realizados por SANTOS e colaboradores (2000), SANTOS (2008) e GOMIDE e colaboradores (2009), *G. clarum* apresenta alta capacidade infectiva e agressividade em colonizar o hospedeiro, o que evidencia boa capacidade competitiva. Considerando que *G. clarum* tenha maior capacidade competitiva que outros membros de *Glomus*, com o passar do tempo, poderá levar a exclusão dos outros fungos desse gênero, uma vez que a competição é maior entre espécies próximas (ODUM, 1988). Isso pode ser evidenciado para algumas amostras da segunda coleta do milho, realizada aos 95 DAP, onde o número de bandas de outros FMA reduziu drasticamente para todos os tratamentos, predominando o perfil de *G. clarum* (Figura 7 – Anexo B). É muito importante frisar, que, mesmo com várias amostras apresentando bandas correspondentes ao FMA inoculado, em virtude da competição com outras espécies próximas, o perfil de bandas obtido diretamente de esporos do FMA inoculado pode não ser completamente detectado no DGGE das raízes. Um resultado a ser destacado foi a presença de uma espécie de *Glomus* que, para algumas amostras, predominou sobre as outras espécies, inclusive *G. clarum*, mostrando boa capacidade competitiva (Figura 7).

Já na crotalária, houve predominância de outras espécies sobre o *G. clarum*, visto que para a maioria das amostras não foi detectada sua banda principal. O sinal detectado pelo DGGE reflete o número relativo de moléculas de DNA alvo de uma dada espécie presente na amostra. Assim, em uma amostra ambiental, pode ocorrer competição entre sequências alvo de espécies amplificadas pelo mesmo par de iniciadores. Portanto, no caso dos FMA que possuem polimorfismo de cópias do rDNA, em competição com outras espécies próximas, poderá ocorrer a não detecção daqueles ribotipos menos frequentes no seu genoma, refletidos por sinais mais fracos no DGGE, em relação aos ribotipos mais frequentes, geralmente representados por bandas mais fortes. Resumindo, mesmo que as amostras apresentem algumas bandas que estejam em posições semelhantes ao obtido do perfil de esporos de *G. clarum*, se essas bandas não estiverem refletindo as bandas mais fortes, possivelmente se trata de outra espécie de FMA. Outro resultado a ser destacado, para a crotalária, foi o fato de que a redução drástica do número de bandas, da primeira para a segunda coleta, é caracterizada a presença de bandas únicas em várias amostras inoculadas, que apresentaram múltiplas bandas na primeira coleta (Tabela 7 e Figura 8).

Apesar de recentes trabalhos relacionarem diretamente o número de bandas de um perfil de DGGE a riqueza de espécies (YAO et al, 2010, ZHANG et al 2010), os resultados obtidos no presente estudo não permitem afirmar se houve uma diminuição ou aumento na riqueza de espécies - além disso as alterações observadas no padrão de bandas seriam indicativo de alterações na estrutura da comunidade, porém não houve consistência dos tratamentos possivelmente devido a alta variabilidade espacial apresentada pelos FMA.

A amostragem realizada em diferentes épocas de coleta possibilitou inferir sobre a variação temporal de FMA colonizando as raízes avaliadas, bem como verificar a partir de qual época o sinal molecular do FMA inoculado se fez presente. A análise de três plantas por parcela possibilitou avaliar a diversidade espacial dos FMA, evidenciada pela grande heterogeneidade dentro dos tratamentos, inclusive amostras pertencentes a um mesmo bloco (Figuras 7, 8, 9 e 10). Variabilidade em função do espaço e do tempo em populações de FMA já havia sido observada por HUSBAND e colaboradores (2002) que determinaram a diversidade e identidade dos FMA colonizando raízes de mudas de espécies endêmicas de uma floresta tropical no Panamá e acessaram a sua distribuição entre locais e épocas de

coleta. Os autores verificaram que a população dos FMA apresentou significativa variabilidade espacial, além de fortes mudanças ao longo do tempo. Ao comparar as comunidades de FMA que colonizavam raízes de plantas herbáceas que coexistem naturalmente, através de RFLP e sequenciamento, VANDENKOORNHUYSE e colaboradores (2002) verificaram que a comunidade de FMA diferia geneticamente entre as plantas hospedeiras, indicando especificidade, e sofria alterações ao longo do tempo, evidenciando variação temporal nas comunidades de FMA. MUMMEY & RILLIG (2008) caracterizaram espacialmente a diversidade molecular de FMA em pequena escala em uma pastagem sob clima temperado. A variabilidade da composição da comunidade dos FMA foi analisada por T-RFLP e a abundância através do comprimento da hifa extraradicular. Foi observado que o comprimento da hifa radicular variou muito entre amostras, apresentando estruturação espacial em escalas menores que 30 cm. A composição dos FMA também apresentou alta correlação espacial, sugerindo estrutura em escala menor que 50 cm. Os autores concluíram que a diversidade e abundância dos FMA podem ser espacialmente estruturadas em escalas inferiores a 1m e esses resultados tem um importante impacto direto sobre a amostragem representativa de populações de FMA a campo.

Como em qualquer estudo de diversidade de amostras ambientais, o procedimento de amostragem adotado é crucial e frequentemente um fator limitante na detecção de microrganismos específicos devido ao seu caráter-não representativo. No presente estudo, a distância entre as 3 plantas avaliadas foi de 1,5 m, possibilitando a avaliação da variabilidade espacial dos FMA dentro de cada parcela. Uma estratégia que poderia representar essa diversidade, de forma ainda mais real, seria aumentar o número de plantas avaliadas de 3 para 5, por exemplo. No entanto, isso aumentaria muito o número de amostras, ocasionando maiores custos e tempo, além de não ser garantia de que seria mais eficiente. Outra abordagem que poderia ter sido utilizada seria a amostragem de um maior número de plantas, formando uma amostra composta, que representaria a média da parcela. No entanto, essa abordagem não possibilitaria a avaliação da diversidade espacial dos FMA. Outra desvantagem estaria relacionada a uma limitação da PCR, que não detecta populações raras, ou seja, a análise de uma amostra composta poderia não representar a estrutura da população de FMA de forma completa. Em contrapartida, como no presente estudo foram utilizadas diferentes doses de inoculação, essa abordagem poderia representar melhor o perfil apresentado por cada uma dessas doses, uma vez que a análise de plantas de forma individual pode não refletir o perfil geral da parcela, além de ter maior custo, considerando que o número de amostras analisadas seria maior.

O fato dos perfis de DGGE obtidos não serem característicos de cada tratamento, possivelmente, em virtude da forma de amostragem e da variabilidade espacial dos FMA, não permite afirmar que a inoculação com *G. clarum* alterou a comunidade de FMA nativa. Um aspecto importante a ser considerado, foi a detecção de esporos de *G. clarum* nas parcelas onde não houve inoculação (SOUZA, 2010), o que pode ter ocasionado os perfis de DGGE com elevada similaridade com tratamentos inoculados, dificultando a avaliação do efeito da inoculação sobre as populações nativas do gênero *Glomus*.

No estudo realizado por MUMMEY e colaboradores (2009) foi verificado que a inoculação com FMA pode afetar a riqueza e a diversidade das comunidades de FMA residentes nas raízes, após plantio em solo misturado com o inóculo. A identidade do inoculante influencia a riqueza dos ribotipos detectados nas raízes, com os tratamentos inoculados com as espécies de *Glomus* apresentando o menor número de ribotipos, às vezes a níveis não detectáveis. Já nos tratamentos inoculados com as espécies de *Gigaspora*, o número de ribotipos foi similar ao tratamento que não recebeu inoculação. Essa diferença pode ser explicada pela estratégia de colonização dos membros de Gigasporaceae e Glomaceae. Nesse caso a inoculação com Gigasporaceae foi menos impactante na

comunidade de FMA nativas do que Glomaceae, provavelmente por possuir a maior parte da sua biomassa fora das raízes, competindo menos com as espécies nativas, dominadas por espécies de *Glomus* (MUMMEY et al, 2009).

A análise da batata-doce, cultivada em rotação ao milho e a crotalária, foi baseada na construção de dendrogramas que comparavam os padrões de DGGE dessa cultura, com os padrões da segunda coleta das plantas do primeiro ciclo do experimento (Figuras 9 e 10). Essa abordagem foi adotada de modo a identificar alterações nos FMA detectados no milho e crotalária, além de verificar a persistência do FMA inoculado após o plantio da nova cultura.

O perfil de DGGE obtido tanto do milho quanto da crotalária sofreu grandes alterações com o plantio da batata-doce em rotação (Figuras 9 e 10). Na batata-doce cultivada em rotação a crotalária (Figura 9 – Anexo E), somente algumas amostras – essas inoculadas com 1800 esporos – não tiveram seu padrão de bandas do DGGE alterado em relação ao cultivo anterior. Um aspecto interessante foi a não detecção das bandas únicas características nas duas coletas realizadas durante o cultivo da crotalária, prevalecendo o perfil de bandas de *G. clarum* na maioria das amostras, em detrimento das outras espécies de FMA detectadas na segunda coleta da crotalária. Na batata-doce cultivada em sucessão ao milho (Figura 10 e Anexo F), somente uma amostra – inoculada com 300 esporos – não teve seu padrão de bandas do DGGE alterado em relação ao cultivo anterior. Um fato a ser destacado foi que a maioria das amostras apresentou bandas muito intensas concentradas na porção inferior dos géis de acrilamida, que possivelmente correspondiam à banda principal obtido a partir de esporos de *G. clarum*.

Legenda:

Cultura: [padrão de pontos] - Batata-doce [padrão de quadrados] - Crotalária

Dose de inoculação: [padrão de pontos] - Sem inoculação [padrão de ondas] - 300 esporos [padrão de pontos] - 900 esporos [padrão de pontos] - 1800 esporos

Bloco e Repetição: [padrão de pontos] - 1 [padrão de quadrados] - 2 [padrão de pontos] - 3

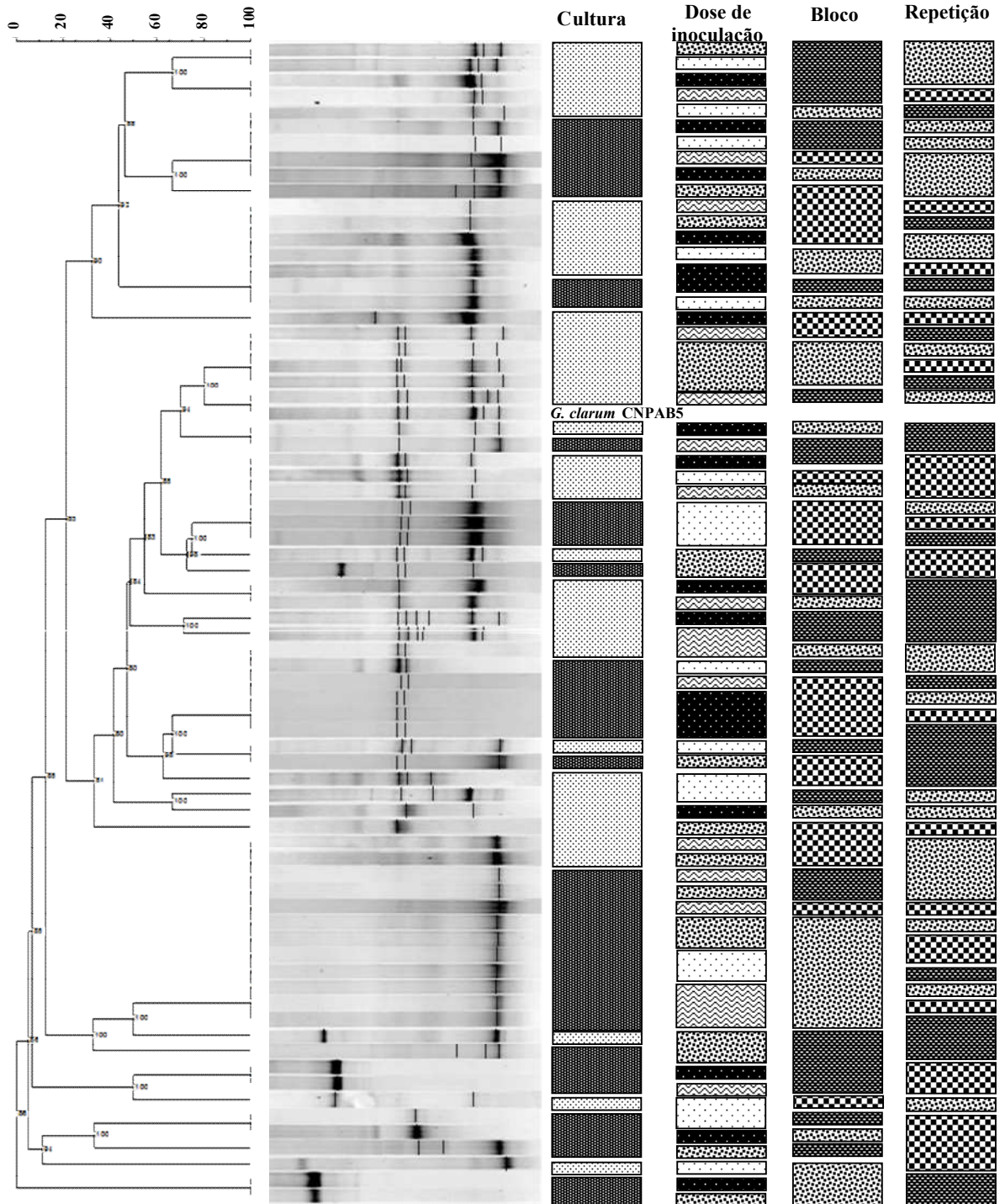


Figura 9. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referentes a 2ª coleta da crotalária e batata-doce cultivada em rotação. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

Legenda:

Cultura: [padrão de pontos] - Batata-doce [padrão de quadrados] - Milho

Dose de inoculação: [padrão sólido] - Sem inoculação [padrão ondulado] - 300 esporos [padrão de pontos] - 900 esporos [padrão de pontos] - 1800 esporos

Bloco e Repetição: [padrão de quadrados] - 1 [padrão de quadrados] - 2 [padrão de pontos] - 3

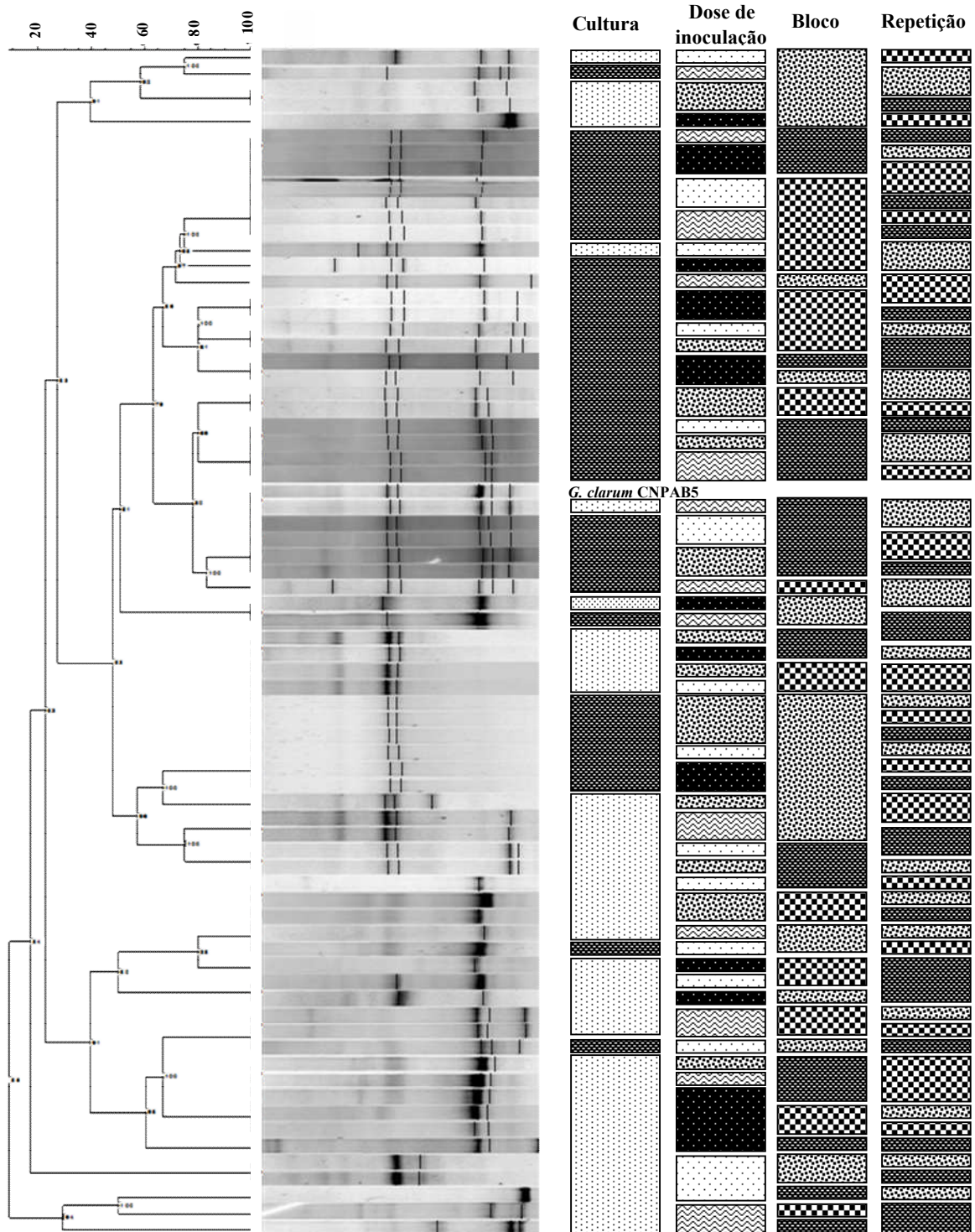


Figura 10. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referentes a 2ª coleta do milho e batata-doce cultivada em rotação. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

A alteração do padrão de DGGE na batata-doce, em relação ao milho e crotalária, ocorreu independentemente da inoculação, podendo indicar que a planta exerceu maior influência sobre a comunidade de FMA que a inoculação, uma vez que é possível que as comunidades de FMA tenham sua diversidade e estrutura influenciada pelas plantas. O estudo realizado por MUMMEY & RILLIG (2006) evidenciou o efeito de plantas sobre comunidades de FMA. Os autores utilizaram T-RFLP para examinar a estrutura de comunidades de FMA em uma área dominada por *Centaurea maculosa*, considerada uma espécie invasora, e áreas adjacentes com vegetação nativa. Os resultados indicaram significativa alteração da comunidade de FMA após o estabelecimento da espécie invasora, com redução da diversidade. A diversidade da hospedeira também pode influenciar as comunidades de FMA. JOHNSON e colaboradores (2003) observaram que a diversidade de FMA foi maior em um microssítio, com uma comunidade de plantas hospedeiras, do que em um microssítio de monocultura e que a diversidade ocorreu, também, entre plantas micotróficas e não micotróficas.

Mesmo com o desenho experimental do experimento de campo não permitindo inferir sobre o efeito da perturbação do solo sobre a estrutura da comunidade dos FMA, esse tipo de perturbação pode exercer influência sobre a estrutura da comunidade dos FMA. Não necessariamente a introdução de um FMA afeta a população dos FMA nativos no solo, conforme demonstrado por ANTUNES e colaboradores (2009), que estudaram os efeitos da inoculação de *G. intraradices* em solo perturbado e não perturbado e verificaram que, contrastando com a inoculação, a perturbação do solo teve um impacto negativo sobre os FMA que estavam colonizando as raízes de milho. Um trabalho recente realizado por SCHNOOR e colaboradores (2010) também evidenciou que distúrbios causados no solo levam a alteração da população de FMA. Estes autores verificaram que a perturbação no solo reduziu a riqueza e alterou a comunidade de FMA, não sendo encontrada nenhuma sobreposição das espécies após a perturbação. Os autores concluíram que a perturbação impõe uma força maior sobre a estruturação das comunidades de FMA do que o hospedeiro, em pastagens semi-naturais.

De acordo com os resultados obtidos a partir dos perfis de DGGE, não podemos indicar que o FMA inoculado colonizou o hospedeiro, uma vez que os padrões apresentados por cada tratamento não os diferenciaram. Essa técnica permitiu somente detectar alterações temporais e espaciais das comunidades dos FMA, não sendo adequada para a detecção e acompanhamento do FMA inoculado, além de detectar alterações na população de FMA na batata-doce cultivada em rotação, indicando que o plantio de uma nova cultura, afeta a comunidade dos FMA presentes na cultura anterior.

Para confirmar a identidade dos FMA presentes nas raízes avaliadas foi realizada clonagem e sequenciamento. Nesse sentido, o DNA das plantas de milho, crotalária e batata-doce, que receberam a maior dose de inoculação, foi amplificado com os iniciadores NS5 / ITS-4, seguido de *nested*-PCR com os iniciadores *Glomus* A / ITS-2. A utilização de iniciadores universais no primeiro PCR, aumentou a quantidade de DNA alvo para o *nested*-PCR, onde foi utilizado um iniciador específico para *Glomus*, garantindo que somente espécies desse gênero presentes nas raízes analisadas fossem detectadas. O produto de PCR foi clonado e os clones sequenciados, seguindo as mesmas condições utilizadas para os clones que continham as variantes do rDNA de *G. clarum* CNPAB5. As sequências dos clones das raízes de plantas inoculadas foram relacionadas à *G. clarum* quando comparadas com sequências no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa BlastN, com exceção de um clone que apresentou sequência relacionada a *Glomus irregulare* (Tabela 8). O resultado do Blast confirma a presença do *G. clarum*, porém, como somente raízes inoculadas com 1800 esporos foram avaliadas, não é possível afirmar que essa presença de *G. clarum* deveu-se a inoculação, principalmente quando se analisa os perfis de DGGE gerados, que não

diferenciaram os tratamentos, aliado ao fato de que esporos de *G. clarum* foram encontrados no solo onde não ocorreu inoculação (SOUZA, 2010).

Tabela 8. Análise do BLAST de sequências obtidas das bibliotecas de raízes de milho, crotalária e batata-doce, inoculadas com 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5, utilizando os iniciadores *Glomus* A / ITS-2.⁽¹⁾

Código clones ⁽²⁾	Sequência mais similar	Acesso	Similaridade (%) ⁽³⁾⁽⁴⁾	Cobertura (%) ⁽⁴⁾
B1cl16 / B1cl24 B1cl36 / B2cl1 B2cl18 / B2cl43 B3cl9 / B3cl16 B3cl28 / B4cl11 B4cl25 / B4cl26	<i>G. clarum</i>	FN423697	93 – 98	82 – 99
B1cl21	<i>G. irregulare</i>	FJ009617	88	100

1. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> no dia 24/08/2010.

2. B se refere a biblioteca das raízes, onde B1:Milho, B2: Crotalária; B3: Batata-doce, cultivada em sucessão ao milho; B4: batata-doce cultivada em sucessão a crotalária. CI se refere ao número da colônia onde se obtiveram os clones.

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

4. Quando aparecem 2 valores separados por um – significa que a faixa de variação entre os clones.

4.5 Colonização Micorrízica Intrarradicular

A colonização micorrízica, avaliada aos 35 e 95 DAP para o primeiro ciclo e aos 80 DAP para o segundo ciclo do experimento, encontra-se na tabela 9. Independente da época de coleta, cultura avaliada e dose de inoculação, todas as plantas apresentaram colonização elevada com valores superiores a 40% para praticamente todos os tratamentos, principalmente na batata-doce cultivada em rotação ao milho e a crotalária.

Foi observada resposta a inoculação para o milho e a crotalária, uma vez que os tratamentos inoculados foram superiores ao controle, com exceção da segunda coleta da leguminosa (Tabela 9). Quando se compara os tratamentos dentro de cada cultura, verifica-se que, para o milho, o tratamento inoculado com 300 esporos proporcionou maior colonização, porém esse só diferiu estatisticamente dos outros inoculados na segunda coleta, sendo o único que aumentou entre coletas. Para o tratamento controle e o inoculado com 900 esporos a colonização micorrízica diminuiu da primeira para a segunda coleta, enquanto o tratamento com a maior dose de inoculação não diferiu significativamente entre coletas (Tabela 9). Já na crotalária, para a primeira coleta, só foi observada resposta a inoculação a partir de 900 esporos. Um aspecto interessante foi que o único tratamento que apresentou elevação da primeira para a segunda coleta foi o controle, que passou a ser o tratamento com maior taxa de colonização, enquanto o inoculado com 1800 esporos apresentou a menor taxa (Tabela 9). Quando cada coleta é analisada como um todo, ou seja, comparando a média geral dos tratamentos, não houve diferença significativa entre elas, para ambas as culturas (Tabela 9).

Tabela 9. Colonização micorrízica intrarradicular em plantas de milho, crotalária e batata-doce cultivada em rotação ⁽¹⁾.

Tratamentos *	1º Ciclo		2º Ciclo
	Milho		Batata-doce
	1ª Coleta	2ª Coleta	Colonização%
	Colonização%	Colonização%	
T1	42 a	38,16 a	55,33 c
T2	48,16 b	51 d	48,66 a
T3	46,66 b	44 b	51,33 b
T4	47 b	45,7 c	50 ab
Média Geral	45,95 A X	44,71 A X	51,33 B Y
	Crotalária		Batata-doce
T1	42 a	46,3 b	45,33 a
T2	43 a	42,6 a	47,66 b
T3	45,66 b	44 a	47,66 b
T4	47 b	43,6 a	53,33 c
Média Geral	44,41 A X	44,16 A X	48,5 B X

a – d – Compara entre colunas os tratamentos dentro de cada cultura;

A – B – Compara as médias gerais das culturas por coleta e com a cultura em rotação;

X – Y – Compara entre colunas as médias gerais coletas de uma cultura com outra;

* **T1, T2, T3 e T4**, representa o tratamento não inoculado e inoculado com 300, 900 e 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB / m linear, respectivamente.

Uma possível explicação para os altos índices de colonização no tratamento controle pode estar relacionado com a presença dos esporos de *G. clarum* e dos fungos nativos existentes na área experimental (SOUZA 2010), indicando que esses microrganismos indígenas são capazes de promover a colonização de raízes dessa leguminosa, como também demonstrado por ESPINDOLA (1996), que estudou a influência da adubação verde sobre a simbiose micorrízica e a produção de batata doce.

A avaliação da colonização micorrízica em 2 épocas durante o cultivo do hospedeiro, reside no fato de que, em geral, diferenças no potencial de inóculo de solos ou inoculantes, sobre a taxa de colonização radicular, são detectados no início do ciclo de crescimento das plantas. Nesta fase, solos que apresentem maior potencial de inóculo proporcionam uma colonização primária mais intensa. Posteriormente, com o desenvolvimento da colonização secundária estas diferenças tendem a se igualar (WALKER & SMITH, 1984; FRANSON & BETHLENFALVAY, 1989). Apesar disso, avaliando a colonização micorrízica nas plantas de milho e crotalária, observa-se que não necessariamente as maiores dose de inoculante, ou seja, as que possuem maiores potenciais de inóculo, promoveram uma colonização mais intensa e que houve um aumento da diferença entre os tratamentos na segunda coleta, principalmente no milho.

A colonização micorrízica na batata-doce aumentou em relação ao cultivo anterior, sendo a rotação com a gramínea a que proporcionou as maiores taxas de colonização. No entanto, para a batata-doce cultivada em rotação com o milho, não foram detectados efeitos relacionados à inoculação, uma vez que o maior nível de colonização foi obtido nas plantas cultivadas em parcelas que não receberam inoculação no cultivo anterior. Já para a batata-doce em rotação com a crotalária, a colonização aumentou de acordo com a dose de inoculação recebida pela leguminosa. O aumento da colonização a batata-doce pode estar

relacionado ao estímulo que a rotação com milho e crotalária possam ter dado ao número de propágulos infectivos de FMA, como observado para a mandioca cultivada após sorgo e crotalária, além de outras culturas (DE SOUZA et al, 1999).

Mesmo a rotação com o milho proporcionando maiores taxas de colonização na batata-doce, quando comparada a rotação com a crotalária, esse última proporcionou produtividades de biomassa fresca e seca de batata doce superiores aquelas alcançadas após o cultivo do milho (SOUZA, 2010), indicando que uma taxa de colonização intrarradicular maior não necessariamente implica em maior produtividade. Mesmo com o controle da planta hospedeira sobre a taxa de colonização micorrízica, essa parece não ter a capacidade de controlar a colonização por fungos não eficientes. Assim a taxa de colonização indica somente que a condição edafoclimática e fisiológica da planta eram favoráveis à formação de micorrizas, mas não indica o benefício (MOREIRA & SIQUEIRA 2006; SMITH & READ 2008). Uma possível explicação da superação da leguminosa em relação à gramínea seria a elevada capacidade no aporte de N e na ciclagem de P e K, disponibilizando estes nutrientes para cultura subsequente.

Outro aspecto importante observado em relação a taxa de colonização, foi que essa não tem relação com o número de bandas detectadas no DGGE. Isso pode ser exemplificado pela primeira coleta do milho, onde, apesar do tratamento não inoculado ter apresentado o menor número de bandas no DGGE e taxa de colonização intrarradicular, a maior taxa de colonização se deu no tratamento que recebeu a menor dose de inoculante e que apresentou número de bandas inferior aos tratamentos inoculados com 900 e 1800 esporos. Outro exemplo é a batata-doce cultivada em rotação com o milho, onde o tratamento que apresentou o maior número de bandas foi o inoculado com 300 esporos, e em contrapartida apresentou a menor taxa de colonização.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de técnicas de ecologia molecular microbiana para estudos relativos aos FMA tem se mostrado extremamente pertinente, uma vez que permitem estudar a diversidade de FMA em amostras de campo, sendo desnecessárias etapas de cultivo, além de possibilitar a discriminação de espécies, devido a heterogeneidade entre cópias do rDNA dos FMA. Esse polimorfismo entre cópias do rDNA foi utilizado para discriminação de espécies do gênero *Glomus*, inclusive a nível de isolados. Os iniciadores utilizados nesse estudo permitiram a amplificação específica e eficiente das espécies de *Glomus* A e B, e o DGGE possibilitou uma boa separação das espécies avaliadas, mostrando ser eficiente para avaliação da diversidade deste importante gênero. Em relação ao experimento de campo, mesmo com a não estruturação do padrão de bandas em relação às doses de inoculação, além da impossibilidade de detectar o FMA inoculado pela técnica proposta, foi demonstrado, apesar da necessidade de maiores estudos, que o DGGE pode ser uma ferramenta a ser utilizada para detectar alterações temporais e espaciais na estrutura de comunidades de FMA do gênero *Glomus*, podendo ser aplicável a outros gêneros. Também foram detectadas alterações na estrutura das comunidades do gênero *Glomus*, com o plantio da batata-doce em sucessão ao milho e a crotalária, independente da dose de inoculação, o que pode ser um indício que a planta exerceu maior influência sobre a comunidade de FMA que a inoculação. Em relação a detecção e acompanhamento do FMA inoculado essa técnica de *fingerprint* não se mostrou adequada, uma vez que o padrão do *G. clarum* não foi claramente identificado nas amostras, e não houve separação dos tratamentos inoculados com diferentes doses de inóculo. A comparação das sequências de raízes inoculadas com 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB com sequências depositadas no GenBank confirmou a presença de *G. clarum*, porém, como o sequenciamento foi realizado somente nas raízes inoculados com 1800 esporos, aliado ao fato de que *G. clarum* também foi detectado no solo onde não ocorreu inoculação, não podemos afirmar que o FMA inoculado colonizou e persistiu no hospedeiro.

6 CONCLUSÕES

- Os iniciadores grupo-específicos (*Glomus* A e *Glomus* B) utilizados possibilitaram a amplificação específica e eficiente das espécies de *Glomus* A e B;
- O DGGE testado possibilitou uma boa separação das espécies avaliadas a partir de esporos, mostrando ser promissor para avaliação da diversidade do gênero *Glomus*;
- O polimorfismo da região V9 entre cópias do rDNA dos FMA se mostrou útil na discriminação de espécies do gênero *Glomus*, e a região V9 mais a ITS, possibilitou que essa fosse ao nível de isolados, com exceção das estirpes de *G. etunicatum* testadas;
- O DGGE é um método eficiente para detectar alterações temporais e espaciais na estrutura de comunidades de FMA do gênero *Glomus*;
- O número de bandas detectadas no DGGE não tem relação com a colonização intrarradicular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGUACIL, M. M., ROLDÁN, A., TORRES, M. P. Assessing the diversity of AM fungi in arid gypsophilous plant communities. **Environmental Microbiology**, v.11, p.2649–2659, 2009.
- ALMEIDA, D. L. de, SANTOS, G. de A., DE-POLLI, H., CUNHA, L. H., FREIRE, L. R., AMARAL SOBRINHO, N. M. B. do, PEREIRA, N. N. C., EIRA, P. A. da, BLOISE, R. M., SALEK, R. C. **Manual de adubação para o Estado do Rio de Janeiro**. Itaguaí: UFRRJ, Coleção Universidade Rural. Ciências Agrárias, v.2, 179p, 1988.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Review**, v.24, p.555-565, 2000.
- ANTUNES, P.M., KOCH, A.M., DUNFIELD, K.E., HART, M.M., DOWNING, A., RILLIG, M.C., KLIRONOMOS, J.N. Influence of commercial inoculation with *Glomus* intraradices on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. **Plant and Soil**, v. 317, p. 257-266, 2009.
- AVIO, L., CRISTANI, C., STRANI, P., GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p.242-253, 2009.
- BALOTA, E. L., LOPES, E.S., HUNGRIA, M., DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.627-639, 1997.
- BEARDEN, B. N., PETERSEN, L. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. **Plant and Soil**, v.218, p.173-183, 2000.
- BERBARA, R. L. L., DE SOUZA, F. A., FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Eds). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG, SBCS, 432p. 2006.
- BOA SORTE, P. M. F. **Uso da técnica do DGGE para monitorar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar**. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2008.
- BORGES, A. J. S., TRINDADE, A. V., MATOS, A. P., PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maça pela inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 35-41, 2007.
- BRESSAN, W., VASCONCELLOS, C. A., PURCINO, A. A. C. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 315-323, 2001.

BRUNDRETT, M. C., ABBOTT, L. K., JASPER, D. A. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. **Mycorrhiza**, v.8, p.305-314, 1999a.

BRUNDRETT, M. C., JASPER, D. A., ASHWATH, N.. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia II. The effect of nutrient levels and host species on the isolation of fungi. **Mycorrhiza**, v.8, p.315-321, 1999b.

CAVALCANTE, U. M. T., MAIA, L. C., MELO, A. M. M., SANTOS, V. F. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.5, p. 643-649, 2002.

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: VAN DER HEIJDEN, M. G. A., SANDERS, I. R. (Eds). **Mycorrhizal Ecology**, p.201-224. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 2002.

COLOZZI-FILHO, A.C., SIQUEIRA, J. O., SAGGIN JUNIOR, O. J., GUIMARAES, P. T. G., OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-trasplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1397-1406, 1994.

COSTA, C. M. C., MAIA, L. C., CAVALCANTE, U. M. T., NOGUEIRA, R. J. M. C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de 2 genótipos de aceloreira (*Malpighia emarginata*, D. C). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, nº6, p.893-901, 2001.

CRESTE, S., NETO, A. T., FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p.299-306, 2001.

DANIELL, T.J., HUSBAND, R., FITTER, A.H., YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. **FEMS Microbiology Ecology**. 36, p.203-209, 2001.

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., J. O. Siqueira., BRUSSARD, L. (Eds.). **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras, MG: Editora Ufla, v. 1, p. 483-536, 2008.

DE SOUZA, F. A. Sistema reprodutivo e troca de material genético em fungos micorrízicos arbusculares. In: 5 CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, RECIFE. **MICOLOGIA: AVANCOS NO CONHECIMENTO**. RECIFE : UFPE, v.1, p.112-121, 2007.

DE SOUZA, F. A., TRUFEM, S. F., ALMEIDA, D. J., SILVA, E. M. R., GUERRA, J. G. M. Efeito de pré-cultivos sobre o potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares e produção da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1913-1923, 1999.

DE SOUZA, F. A., BERBARA, R. L. L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v. 91, p.343-350, 1999.

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. S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L., EDS. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras, Editora UFLA. p.537-583, 2008.

DE SOUZA, F.A., DECLERCK, S., SMIT, E., KOWALCHUK, G. A. Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). **Mycological Research**, v.109, p.697–706, 2005.

DE SOUZA, F.A., KOWALCHUK, G., LEEFLANG, P., VEEN, J. A van., SMIT, E. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1413-1424, 2004.

DECLERCK, S., CRANENBROUCK, S., DALPÉ Y., SEGUIN, S., GRANDMOUGIN F.A., FONTAINE, J., SANCHOLLE, M. *Glomus proliferum* sp nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. **Mycologia**, v.92, p.1178-1187, 2000.

ESPINDOLA, J.A.A. **Influência da Adubação Verde sobre a Simbiose Micorrízica e a Produção de Batata – Doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)**. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1996.

FELSKE, A., OSBORN, M. DNA *fingerprint* of microbial communities. In: FELSKE, A., OSBORN, M. (Eds). **Molecular Microbial Ecology**, 381p, 2005.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa, 220p, 1998.

FITTER, A. H. Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions. **New Phytologist**, v.99, p.257–265, 1985.

FITTER, A. H., GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant and Soil**, v.159, p.123-132, 1994.

FRANSON, R.L., BETHLENFALVAY, G.J. Infection unit method of vesicular-arbuscular mycorrhizal propagule determination. **Soil Science Society of American Journal**, v.53, p.754-756, 1989.

FREITAS, M. S. M., MARTINS, M. A., VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.9, p.887-894, 2004.

FRITZ, M., JAKOBSEN, I., LYGKJÆR, M. F., THORDAL-CHRISTENSEN, H., PONS-KÜHNEMANN, J. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. **Mycorrhiza**, v.16, p.413–419, 2006.

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

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

GIOVANNETTI, M., SBRANA, C., STRANI, P., AGNOLUCCI, M., RINAUDO, V., AVIO, L. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographical areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.616–624, 2003.

GOMIDE, P. H. O., SANTOS, J. G. D., SIQUEIRA, J. O., SOARES, C. R. F. S. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de espécies hospedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1483-1490, 2009.

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

HECKMAN, D. S., GEISER, D. M., EIDELL, B. R., STAUFFER, R. L., KARDOS, N. L., HEDGES, S. B. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, v.293, p.1129–1133, 2001.

HEMPEL, S., Renker, C., Buscot, F. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. **Environmental Microbiology**, v9, p.1930–1938, 2007.

HIJRI, I., ZUZANA, S., KOROVÁ, Y., OEHL, F., INEICHEN, K., MÄDER, P., WIEMKEN, A., REDECKER, D. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. **Molecular Ecology**, v.15, p.2277–2289, 2006.

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

JACQUOT, E., VAN TUINEN, D., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V. Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi *in planta* and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. **Plant and Soil**, v.226, p.179–188, 2000.

JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. p. 535-542. In VARMA, A. & HOCK, B. (eds.) **Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology**, 2nd ed. Springer, Berlin, 1999.

JOHNSON, D., VANDENKOORNHUYSE, P.J., LEAKE, J.R., GILBERT, L., BOOTH, R.E., GRIME, P., YOUNG, J.P.W., READ, D.J. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. **New Phytologist**, v.161, p.503-505, 2003.

KJOLLER, R., ROSENDAHL, S. Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas **Mycological Research**, v.105, p.1027-1032, 2001.

KLIRONOMOS, J. N., HART, M. M. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, v.12, p.181-184, 2002.

KOCH, A. M., CROLL, D., SANDERS, I. R. Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. **Ecology Letters**, v. 9, p.103–110, 2006.

KOWALCHUK, G.A., SOUZA, F .A., VAN VEEN, J. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v.11, p.571-81, 2002.

LAMBAIS, M.R., CURY, J.C., MALUCHE-BARETA, C.R. , BULL, R.C. Diversidade microbiana do solo: definindo novos paradigmas. **Tópicos Ciência do Solo**. v.4, p.43-84, 2005.

LANFRANCO, L., BIANCIOTTO, V., LUMINI, E., SOUZA, M., MORTON, J.B., BONFANTE, P . A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytologist**, v.152, p.169-79, 2001.

LEAL, P. L, MARTINS, M. A, RODRIGUES, L. A., SCHIAVO, J. A. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira micorrizadas em diferentes recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, p. 84-87, 2005.

LI, T., LI, L., SHA, T., ZHANG, H., ZHAO, Z. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with two dominant xerophytes in a valley-type savanna, southwest China. **Applied Soil Ecology**, v.44, p.61–66, 2010.

LIANG, Z., DRIJBER, R. A., LEE, D. J., DWIEKAT, I. M., HARRIS, S. D., WEDIN, D. A., A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.956–966, 2008.

LIU, Y., HE, L., NA, L., THORUNN, H., FENG, H. Arbuscular mycorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p.81–92, 2009.

MA, W.K., SICILIANO S.D., GERMIDA, J.J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.1589-1597, 2005.

MARTINS, M. A, GONÇALVES, G. F, SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, nº.7, v.35, 2000.

MOREIRA, F.S, SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. atual.e ampl. Lavras: UFLA, 726p, 2006.

MUELLER-DOMBOIS, D & ELLEMBERG, H. Aims and methods of vegetation ecology. New York, **John Wiley**, 574p, 1974.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.62, p.36-43, 1990.

MULLIS, K. B., FERRÉ, F., GIBBS, R. A. **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhauser. 1994.

MUMMEY, D. L., RILLIG, M. C. Spatial characterization of arbuscular mycorrhizal fungal molecular diversity at the submetre scale in a temperate grassland. **FEMS Microbiology Ecology**, v.64, p.260–270, 2008.

MUMMEY, D. L., RILLIG, M. C. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. **Plant Soil**, v.288, p.81–90, 2006.

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

MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.73, p.127–141, 1998.

MUYZER, G., WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

MYERS, R. M., FISCHER, S. G., LERMAN, L. S., MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131–3145, 1985.

NOVAIS, C. B., SOUZA, F. A., SIQUEIRA, J. O. Caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em bancos de germoplasma. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.8, p.806-896, 2010.

NOVAIS, R.F., SMYTH, T.J. **Fósforo em Solo e Planta em Condições Tropicais**. 1ed. Viçosa: UFV, 399p, 1999.

NUNES, M. S. **Fungos micorrízicos arbusculares em porta-enxertos de citros**. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Escola de Agronomia. Universidade Federal da Bahia. 2004

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

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara, 434p, 1988.

- OLIVEIRA, C. A., SÁ, N. M. H., GOMES, E. A., MARRIEL, I. E., SCOTTI, M. R., GUIMARÃES, C. T., SCHAFFERT, R. E., ALVES, V. M. C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, v.41, p.249-258, 2009.
- ÖPIK, M., MOORA, ZOBEL, M., SAKS, U., WHEATLEY, WRIGHT, R., DANIEEL, T. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous Forest. **New Phytologist**, v.179, p.867–876, 2008.
- PAULA, M. A., SIQUEIRA, J.O., OLIVEIRA, L. H., OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de população de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.12, p.25-31, 1988.
- PIANKA, E.R. On r- and k- selection. **The American Naturalist**, Vol. 104, nº. 940, p.592-597, 1970
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, v.10, p.73-80, 2000.
- REDECKER, D., HIJRI, I., WIEMKEN, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. **Folia Geobotanica**, Praha, v.38, n.2, p.113-124, 2003.
- REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L. E. Glomalean Fungi from the Ordovician. **Science**, v.289, p.1920-1930, 2000.
- REMY, W., TAYLOR, T. N., HASS, H., KERP, H. Four hundred-million-yearold vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.91, p.11841–11843, 1994.
- RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**. p.365-372, 2004.
- ROSADO, A. S., DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: **Genética e Melhoramento de Microrganismos**. Mello, I. S. (ed.).Ed.USP, São Paulo, 2002.
- RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, v.13, p.309–317, 2003.
- RUSSOMANNO, O. M. R., KRUPPA, P. C., MINHONI, M. T. A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares do desenvolvimento de plantas de alecrim e manjeriço. **Arquivos Instituto de Biologia**, São Paulo, v.75, nº.1, p.37-43, 2008.
- RYSZKA, P., BŁASZKOWSKI, J., JURKIEWICZ, A., TURNAU, K. Arbuscular mycorrhiza of *Arnica montana* under field conditions—conventional and molecular studies. **Mycorrhiza Published online**, February 2010.

- SANDERS, I.R., ALT, M., GROPE, K., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**, v.130, p.419-27, 1995.
- SANTOS, A.S., SOUZA, F. A. de., BERBARA, R. L. L., GUERRA, J. G. M. Estabelecimento e capacidade infectiva de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em solo sob erosão. **Acta Botanica Brasilica**, v.14, p.127-139, 2000
- SANTOS, J. C., FINLAY, R. D., TEHLER, A. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. **New Phytologist**, v. 172, p.159-168, 2006.
- SANTOS, J. G. D. **Riqueza de fungos micorrízicos arbusculares no solo e no crescimento inicial de espécies arbóreas nativas**. 80p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.
- SATO, K., SUYAMA, Y., SAITO, M., SUGAWARA, K. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. **Grassland Science**, v51, p.179–181, 2005.
- SCHIAVO, J.A., MARTINS, M.A. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*, em substrato agro-industrial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.519-523, 2002.
- SCHNOOR, T. K., LEKBERG, Y., ROSENDAHL, S., OLSSON, P. A. Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal fungal communities in semi-natural grassland. **Mycorrhiza**, Published Online June 2010.
- SCHÜßLER, A., SCHWARZOTT, D., WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycology Research**, v.105, p.1413-1421, 2001.
- SHEPHERD, M., NGUYEN, L., JONES, M. E., DOLAND F. N., CARPENTER, L. A method for assessing arbuscular mycorrhizal fungi group distribution in tree roots by intergenic transcribed sequence variation. **Plant Soil**, v.290, p.259–268, 2007.
- SIEVERDING, E., FRIEDRICHSEN, J., SUDEN, W. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. 371p, 1991.
- SILVA, M.M., COLOZZI-FILHO, A. Emprego de Técnicas Moleculares na Taxonomia e em Estudos sobre Ecologia e Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares. In: SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.S. (Eds) **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, cap. 8, p.127-152, 2007.
- SILVEIRA, S. V., SOUZA, P. V. D., KOLLER, O. C. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento do abacateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1597-1604, 2002.

SIQUEIRA, J.O. & KLAUBERG FILHO, O. Micorrizas arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva. In: NOVAIS, R.F., ALVAREZ V.H. & SCHAEFER, C.E. (Eds). **Tópicos em Ciência do Solo**. v.1, Viçosa:SBSCS, p.235-264, 2000.

SIQUEIRA, J.O., LAMBAIS, M.R., STURMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Lavras, MG. nº25, p.12–21, 2002.

SMITH, S. E.. & READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis** (Third Edition), New York, 787p, 2008.

SONJAK, S., BEGUIRISTAIN, T., LEYVAL, C., REGVAR, M. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. **Plant Soil**, p.314:25–34, 2009.

SOUSA, C. F., SOARES, A. C. F., COIMBRA, J. L., GARRIDO, M. S., MACHADO, G. S. Fungos micorrízicos arbusculares no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro. **Revista Caatinga**, v.23, nº 1, p.15-20, 2010.

SOUZA, J. R. **Influência dos cultivos de milho e *Crotalaria juncea* inoculados com fungo micorrízico arbuscular (FMA) no desempenho agrônômico de batata-doce em sucessão**. 52p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

STÜRMER, S.F., SIQUEIRA, J.O. Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Ecossistemas Brasileiros. In: MOREIRA, F. S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L., EDS. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras, Editora UFLA. p.537-583, 2008.

VAN DE VOORDE, T. F. J., VAN DER PUTTEN, W. H., GAMPER, H. A., HOL, W. H. G., MARTIJN, T. Bezemer Comparing arbuscular mycorrhizal communities of individual plants in a grassland biodiversity experiment. **New Phytologist**, v.186, p.746–754, 2010.

VAN DER HEIJDEN, M. A., STREITWOLF-ENGEL, R., RIEDL, 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, 2006.

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

VANDENKOORNHUYSE, P., HUSBAND, R., DANIELL, T. J., WATSON, I. J., DUCK, J., M. FITTER A. H., YOUNG J. P. W. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. **Molecular Ecology**, v.11, p.1555–1564, 2002.

WALKER, C., SCHÜßLER, A. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. **Mycological Research**, v.108, p.981-982, 2004.

WALKER, N. A., SMITH, S.E. The quantitative study of mycorrhizal infection. II. The relation of rate of infection and speed of fungal growth to propagule density, the mean length of infection unit and the limiting value of the fraction of root infected. **New Phytologist**, v.96, p.55-69, 1984.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S ., TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INIS, M. A., GELFAND, D., SNINSKY, J., WHITE, T. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, California, 1990.

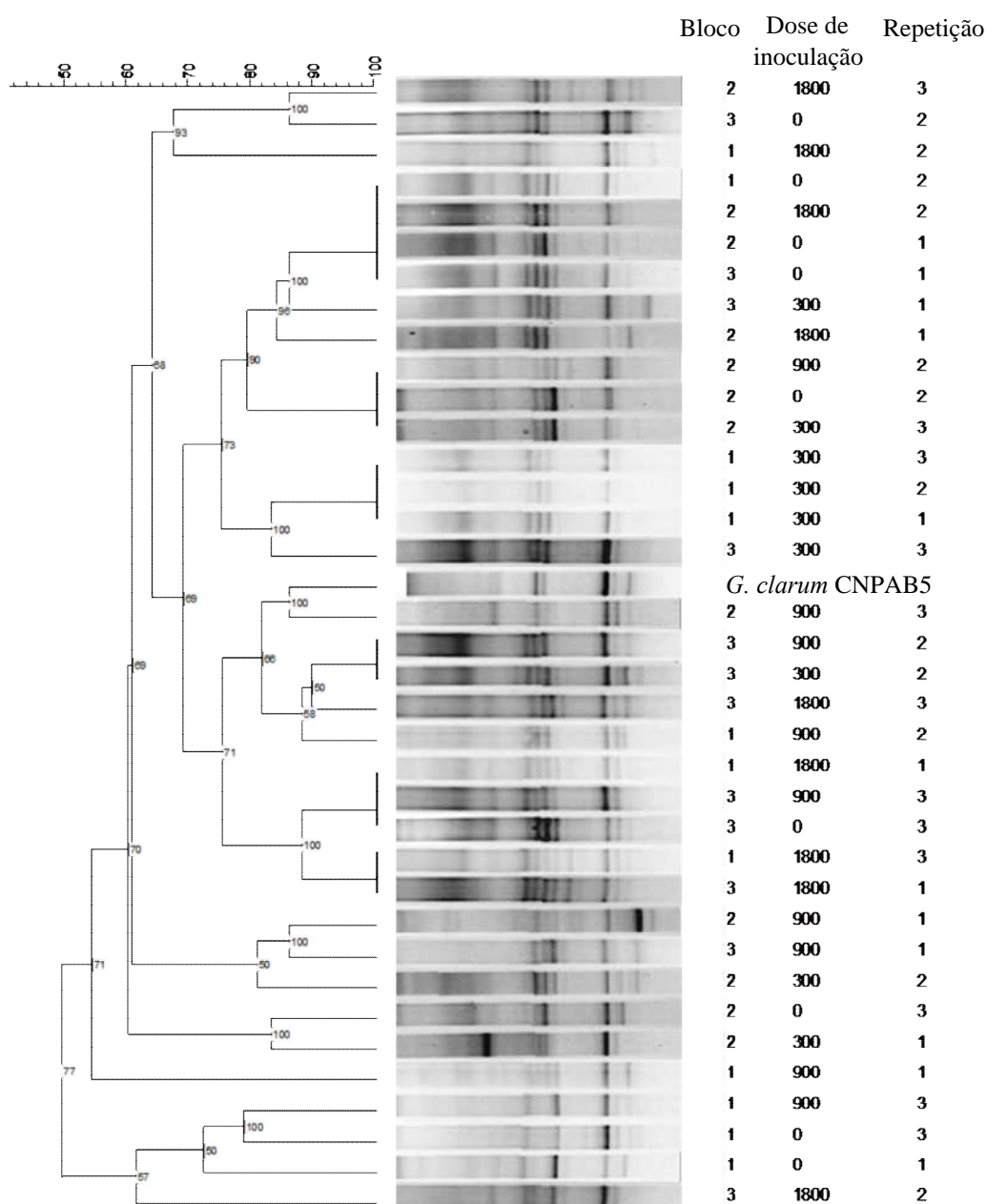
WRIGHT, S.F., & UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, p.97-107, 1998.

YAO, Q., GAO, J-L., ZHU, H-H., LONK, L-K., XING, Q-X., CHEN, J-Z. valuation of the potential of trap plants to detect arbuscular mycorrhizal fungi using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.56, p.205–211, 2010.

ZHANG, H., TANG., CHEN., TIAN., XUE., FENG, Y. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of *Caragana korshinkii* and *Hippophae rhamnoides* in Zhifanggou watershed. **Plant Soil**, v,326, p.415–424, 2010.

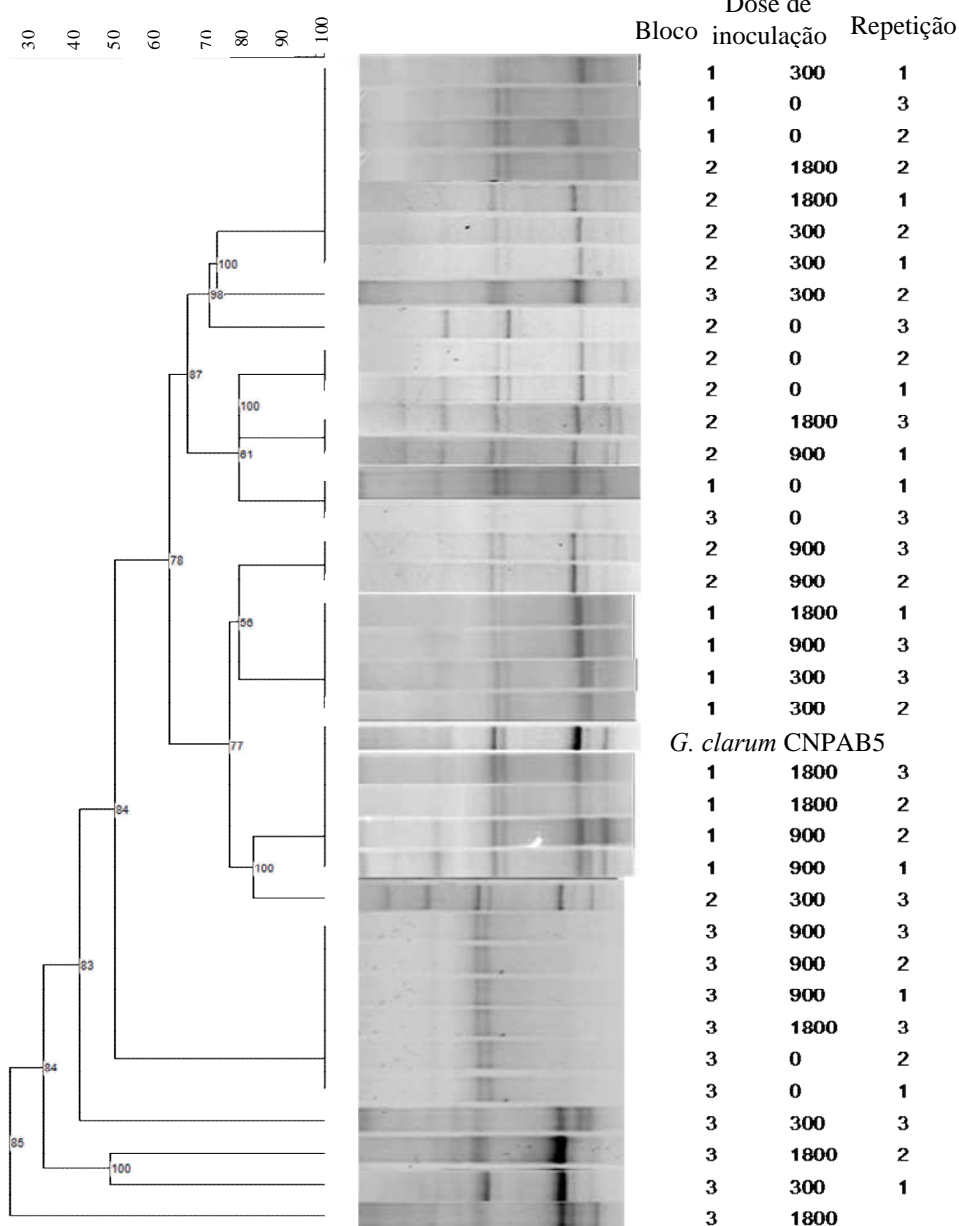
8 ANEXOS

ANEXO A



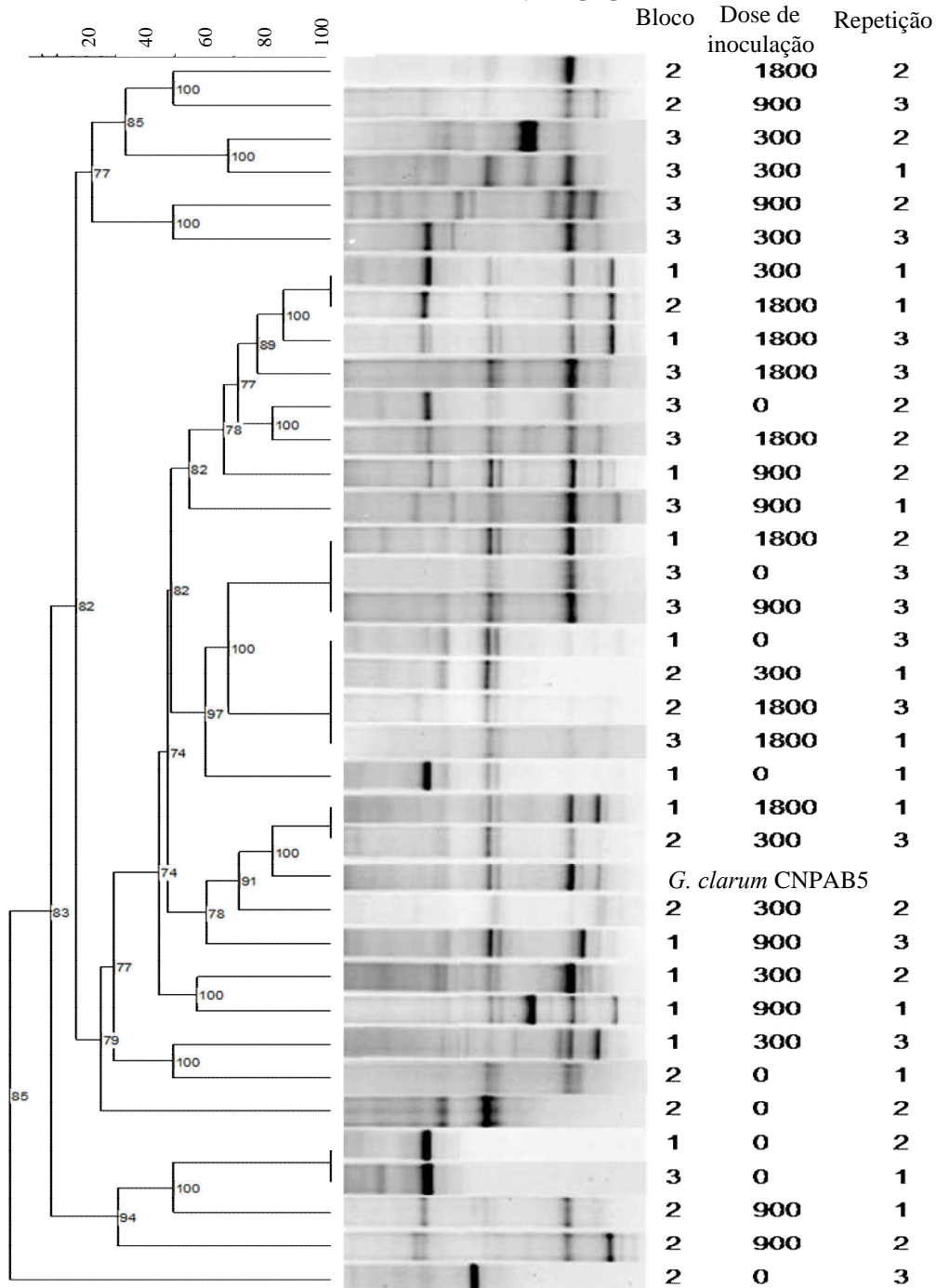
Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente a 1ª coleta do milho submetido a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

ANEXO B



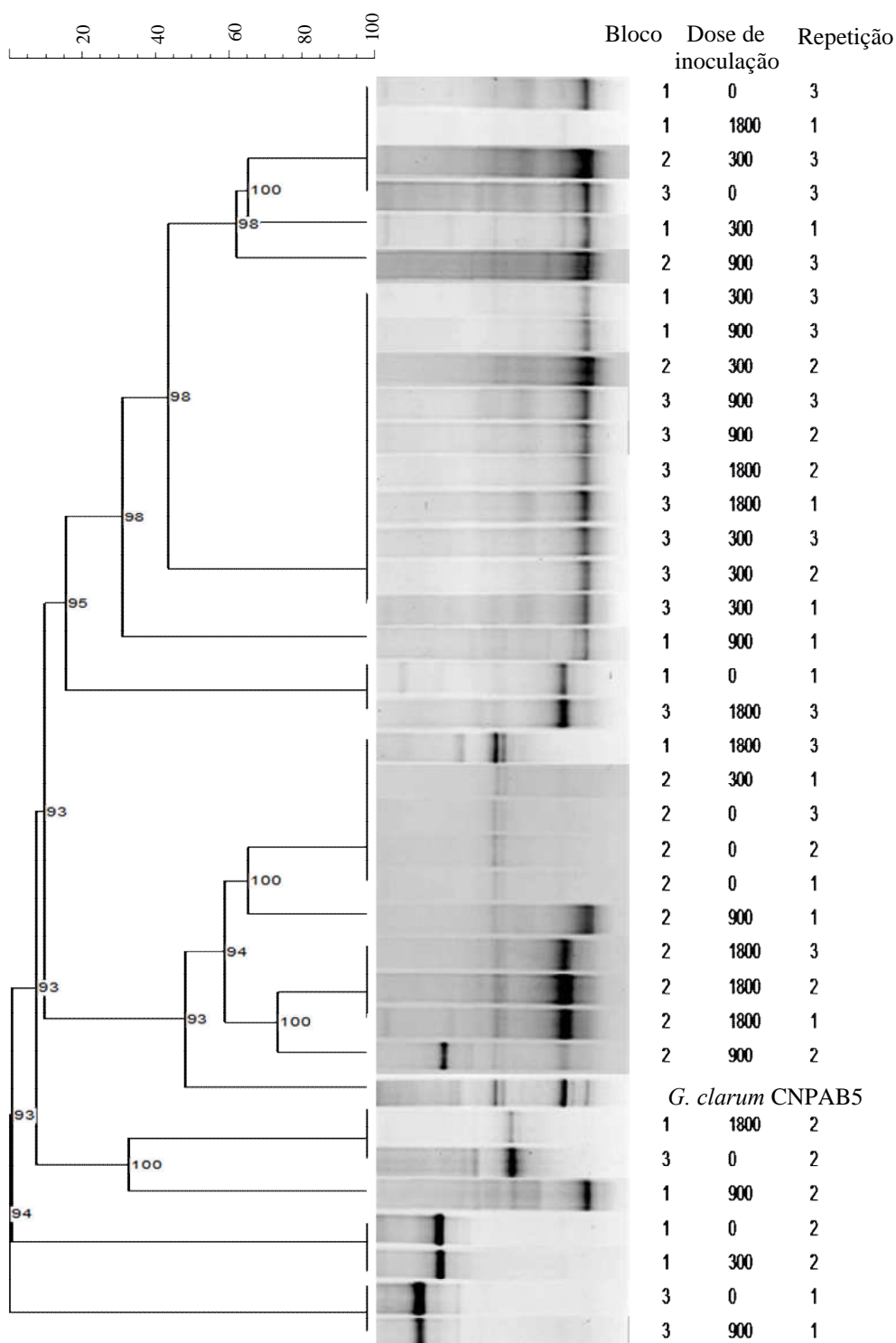
Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente a 2ª coleta milho submetido a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

ANEXO C



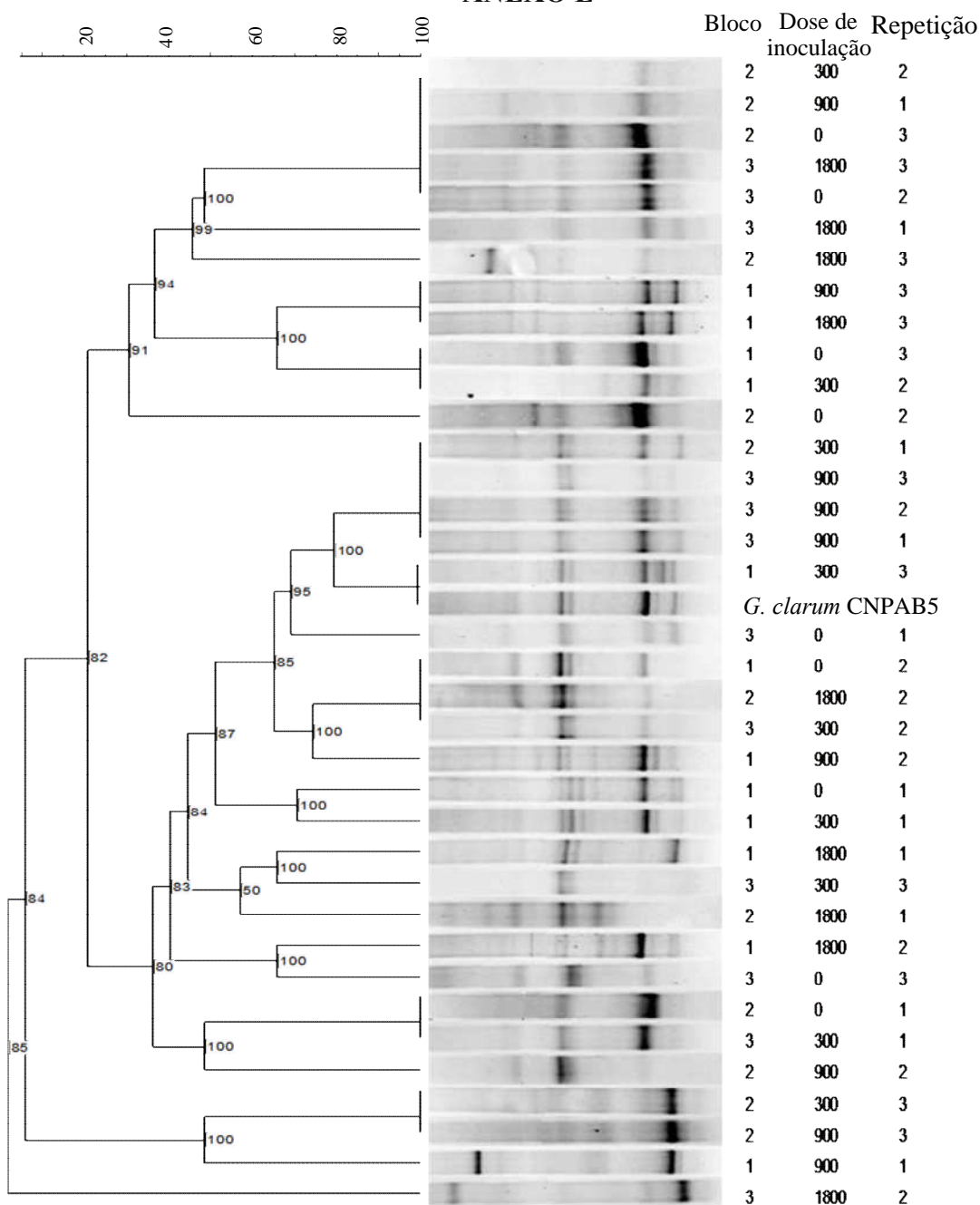
Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente a 1ª coleta de crotalária submetida a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

ANEXO D



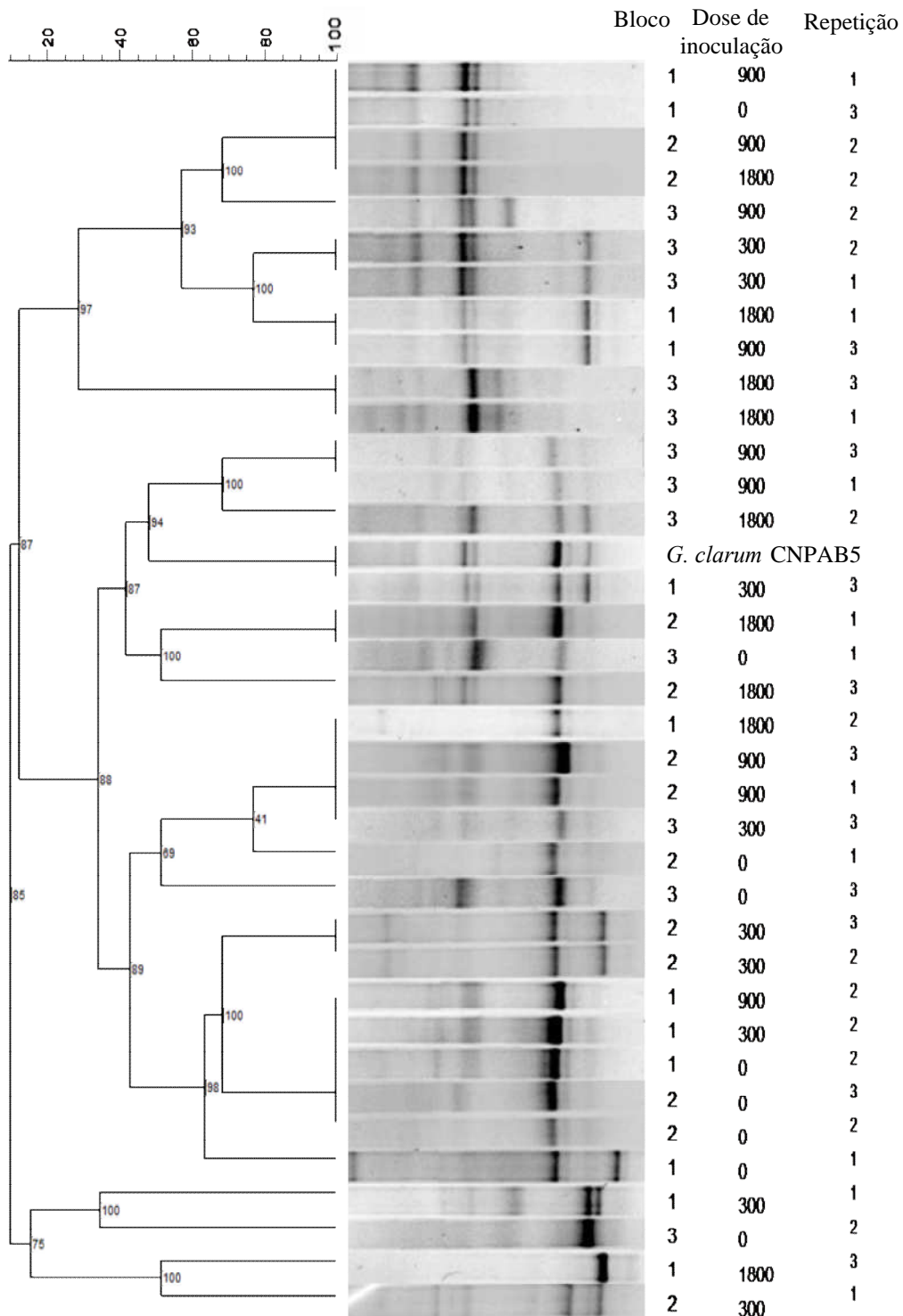
Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente a 2ª coleta de crotalária submetida a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

ANEXO E



Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente batata-doce cultivada em sucessão a crotalária submetidas a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

ANEXO F



Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard-UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE referente a batata-doce cultivada em sucessão ao milho submetida a diferentes doses de inoculação com *G. clarum* CNPAB5. A escala indica a similaridade entre perfis de bandas. Números indicam o coeficiente cofenético de correlação.

Tabela 9. Análise de variância da taxa de colonização micorrízica em plantas de milho, crotalária e batata-doce

FV	Gl	SQ	MS	Fvalue	Pr>F
Bloco	2	8.926	4.463	4.24	0.0204
Cultura	3	326.8	108.93	103.55	□.0001
Coleta	1	6.75	6.75	6.42	0.0148
Cultura * Coleta	1	2.9	2.9	2.76	0.1036
Dose (Coleta)	6	133.8	22.3	21.2	□.0001
Dose (Cultura * Coleta)	12	427.31	35.6	33.85	□.0001
Erro	46	48.39	1.05		
Total Corrigido	71	954.876			

Tabela 10. Contrastes pelo teste Tukey em plantas de milho e batata-doce cultivada em rotação.

Contraste ⁽¹⁾	Valor do Contraste	Probabilidade ⁽²⁾
(M Col 1 - NI / M Col 1 - 300 esp)	6,16	□.0001*
(M Col 1 - NI / M Col 1 - 900 esp)	4,66	□.0001*
(M Col 1 - NI / M Col 1 - 1800 esp)	5	□.0001*
(M Col 1 - 300 esp / M Col 1 - 900 esp)	1,5	0.0799
(M Col 1 - 300 esp / M Col 1 - 1800 esp)	1,16	0.1703
(M Col 1 - 900 esp / M Col 1 - 1800 esp)	0,34	0.6925
(M Col 2 - NI / M Col 2 - 300 esp)	12,84	□.0001*
(M Col 2 - NI / M Col 2 - 900 esp)	5,84	□.0001*
(M Col 2 - NI / M Col 2 - 1800 esp)	7,54	□.0001*
(M Col 2 - 300 esp / M Col 2 - 900 esp)	7	□.0001*
(M Col 2 - 300 esp / M Col 2 - 1800 esp)	5,3	□.0001*
(M Col 2 - 900 esp / M Col 2 - 1800 esp)	1,7	0.0482*
(M Col 1 - NI / M Col 2 - NI)	3,84	□.0001*
(M Col 1 - 300 esp / M Col 2 - 300 esp)	2,84	0.0015*
(M Col 1 - 900 esp / M Col 2 - 900 esp)	2,66	0.0026*
(M Col 1 - 1800 esp / M Col 2 - 1800 esp)	1,3	0.1274
(BDM NI / BDM 300 esp)	6,67	□.0001*
(BDM NI / BDM 900 esp)	4	□.0001*
(BDM NI / BDM 1800 esp)	5,33	□.0001*
(BDM 300 esp / BDM 900 esp)	2,67	0.0026*
(BDM 300 esp / BDM 1800 esp)	1,34	0.1182
(BDM 900 esp / BDM 1800 esp)	1	0.1182
(M Col 2 - NI / BDM - NI)	17,17	□.0001*
(M Col 2 - 300 esp / BDM - 300 esp)	2,34	0.0077*
(M Col 2 - 900 esp / BDM - 900 esp)	7,33	□.0001*
(M Col 2 - 1800 esp / BDM - 1800 esp)	4,3	□.0001*

1- X Col Y – Z, onde X se refere a cultura (M – Milho; BDM – Batata-doce em rotação ao milho), Y se refere a coleta (Col 1 ou 2 – Coleta 1 ou 2) e Z a dose de inoculação (NI – Não inoculado. 300, 900 ou 1800 esp – inoculado com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5, respectivamente).

2 - * Significativo a 5% no teste Tukey.

Tabela 11. Contrastes pelo teste Tukey em plantas de crotalária e batata-doce cultivada em rotação.

Contraste (1)	Valor do Contraste	Probabilidade (2)
(C Col 1 - NI / C Col 1 - 300 esp)	0,97	0.2543
(C Col 1 - NI / C Col 1 - 900 esp)	3,53	□ .0001*
(C Col 1 - NI / C Col 1 - 1800 esp)	4,97	□ .0001*
(C Col 1 - 300 esp / C Col 1 - 900 esp)	2,56	0.0036*
(C Col 1 - 300 esp / C Col 1 - 1800 esp)	4	□ .0001*
(C Col 1 - 900 esp / C Col 1 - 1800 esp)	1,44	0.0937
(C Col 2 - NI / C Col 2 - 300 esp)	3,57	0.0001*
(C Col 2 - NI / C Col 2 - 900 esp)	2,23	0.0105*
(C Col 2 - NI / C Col 2 - 1800 esp)	2,57	0.0036*
(C Col 2 - 300 esp / C Col 2 - 900 esp)	1,34	0.1182
(C Col 2 - 300 esp / C Col 2 - 1800 esp)	1	0.2386
(C Col 2 - 900 esp / C Col 2 - 1800 esp)	0,34	0.6925
(C Col 1 - NI / C Col 2 - NI)	4,2	□ .0001*
(C Col 1 - 300 esp / C Col 2 - 300 esp)	0,34	0.6925
(C Col 1 - 900 esp / C Col 2 - 900 esp)	1,56	0.0678
(C Col 1 - 1800 esp / C Col 2 - 1800 esp)	3,34	0.0002
(BDC NI / BDC 300 esp)	2,43	0.0056*
(BDC NI / BDC 900 esp)	2,13	0.0143*
(BDC NI / BDC 1800 esp)	8	□ .0001*
(BDC 300 esp / BDC 900 esp)	0,3	0.7218
(BDC 300 esp / BDC 1800 esp)	5,57	□ .0001*
(BDC 900 esp / BDC 1800 esp)	5,87	□ .0001*
(C Col 2 - NI / BDC - NI)	0,9	0.2881
(C Col 2 - 300 esp / BDC - 300 esp)	5,1	□ .0001*
(C Col 2 - 900 esp / BDC - 900 esp)	3,46	0.0001*
(C Col 2 - 1800 esp / BDC - 1800 esp)	9,67	□ .0001*

1- X Col Y – Z, onde X se refere a cultura (C – Crotalária; BDC – Batata-doce em rotação a crotalária), Y se refere a coleta (Col 1 ou 2 – Coleta 1 ou 2) e Z a dose de inoculação (NI – Não inoculado. 300, 900 ou 1800 esp – inoculado com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5, respectivamente).

2 - * Significativo a 5% no teste Tukey.

Tabela 12. Contrastes pelo teste Tukey comparando plantas de milho e crotalária.

Contraste ⁽¹⁾	Valor do Contraste	Probabilidade ⁽²⁾
(M Col 1 - NI / C Col 1 - NI)	0,03	0.9684
(M Col 1 - 300 esp / C Col 1 - 300 esp)	5,16	□.0001*
(M Col 1 - 900 esp / C Col 1 - 900 esp)	1,1	0.1955
(M Col 1 - 1800 esp / C Col 1 - 1800 esp)	0	1.000
(M Col 2 - NI / C Col 2 - NI)	8,07	□.0001*
(M Col 2 - 300 esp / C Col 2 - 300 esp)	8,34	□.000*
(M Col 2 - 900 esp / C Col 2 - 900 esp)	0	1.000
(M Col 2 - 1800 esp / C Col 2 - 1800 esp)	2,04	0.019*

1- X Col Y – Z, onde X se refere a cultura (C – Crotalária; M - Milho), Y se refere a coleta (Col 1 ou 2 – Coleta 1 ou 2) e Z a dose de inoculação (NI – Não inoculado. 300, 900 ou 1800 esp – inoculado com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5, respectivamente).

2 - * Significativo a 5% no teste Tukey.

Tabela 13. Contrastes pelo teste Tukey comparando a batata-doce em cultivada em rotação ao milho e a crotalária.

Contraste (1)	Valor do Contraste	Probabilidade (2)
(BDM - NI / BDC - NI)	10	□.0001*
(BDM - 300 esp / BDC - 300 esp)	0,9	0.2881
(BDM - 900 esp / BDC - 900 esp)	3,87	□.0001*
(BDM - 1800 esp / BDC - 1800 esp)	3,33	0.0002*

1- X – Z, onde X se refere a cultura (BDC – Batata-doce cultivada em rotação a crotalária; BDM – Batata-doce cultivada em rotação ao milho) e Z a dose de inoculação (NI – Não inoculado. 300, 900 ou 1800 esp – inoculado com 300, 900 ou 1800 esporos de *G. clarum* CNPAB5, respectivamente).

2 - * Significativo a 5% no teste Tukey.