

**BRUNO COUTINHO MOREIRA**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES  
EM RIZOSFERA DE PINHÃO- MANSO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

**BRUNO COUTINHO MOREIRA**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES  
EM RIZOSFERA DE PINHÃO- MANSO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2011.

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

Dr<sup>a</sup>. Luciana Nogueira Londe

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Mara Soares Bazzolli  
(Coorientadora)

---

Prof. Sidney Luiz Stürmer  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Orientadora)

*Aos meus maiores mestres, José Engrácio Moreira e  
Maria Auxiliadora Soares Coutinho Moreira,  
que em suas funções de pais me ensinaram  
o verdadeiro sentido da vida. O Amor.*

*À Michele de Cássia Sabino,  
pelo amor e dedicação que me  
fortalecem diariamente.*

*Aos meus irmãos Poliana  
e Raul, eternos  
companheiros.*

*Dedico*

*Contudo, seja qual for o grau a que chegamos,  
o que importa é prosseguir  
decididamente.*

*Filipenses 3, 16.*

## **Agradecimentos**

A Deus, que em sua infinita misericórdia, esteve sempre ao meu lado, dando-me forças para prosseguir.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela amizade, confiança, dedicação, paciência, incentivo, carinho e pelos momentos de conversa que tanto me confortaram.

Aos professores Denise Mara Soares Bazzolli e Sidney Luiz Stürmer pela Coorientação, zelo, incentivo, amizade e respeito depositados em mim para realização deste trabalho.

Ao Professor Marcos Rogério Tótola e à Dr<sup>a</sup> Luciana Nogueira Londe, por participarem da banca de defesa desta dissertação, pelas sugestões e atenção depositadas.

Aos meus pais, José e Maria Auxiliadora, por dedicarem suas vidas em função da minha. Muito obrigado.

À minha noiva Michele, pelo amor, carinho, paciência e por estar sempre ao meu lado, dividindo comigo todos os momentos bons e ruins.

Aos meus irmãos Poliana e Raul e a todos os meus familiares, que nunca desceram a “arquibancada” e deixaram de torcer por mim. Agradeço imensamente toda esta confiança.

A todos os amigos que contribuem para que as adversidades da vida se tornem insignificantes após bons momentos de conversa.

Ao André Carvalho, Marliane e Lydice, pela paciência, amizade, confiança e ensinamentos, durante todo este período de trabalho em conjunto.

Aos companheiros Paulo Miguel, Monalessa Fábria, Thammy Livia, Livia Colombo e Cássia Tótola, que iniciaram comigo esta jornada e pelo apoio mútuo de cada dia.

À Ana Lúcia, Jadson e Marcelo, pela ajuda na condução deste trabalho.

Aos Amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas e do Departamento de Microbiologia, em especial Prof. Maurício, Muriel, Zé Maria, Adalberto, Andrezão, Ana Lúcia, Mateus, Luciano, Victor, Crislene, Cíntia, Laélia, Melissa, Sabrina, Tiago Leite, Tomás, Samantha, Carla Godinho, Carla Dias, André, Matheus “Cogumelo”, Gilberto, Daniela, Sirlaine, Denise, Jaque, Regina e Júlio, que fazem com que este ambiente se torne um local agradável de trabalhar.

Ao Professor Walterley da Rocha Soares, pela amizade e conselhos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e oportunidades.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pelo auxílio e convivência.

Aos estudantes da FURB, Universidade Regional de Blumenau, que me receberam com muito carinho.

Aos funcionários da Epamig/ Unidade Regional Norte de Minas (URENM) em Nova Porteirinha/MG, que muito me auxiliaram na realização de coletas em campo, para realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram na condução deste trabalho. O meu muito Obrigado.

## **Biografia**

BRUNO COUTINHO MOREIRA, filho de José Engrácio Moreira e Maria Auxiliadora Soares Coutinho Moreira, nasceu em Viçosa-MG, no dia 28 de junho de 1984.

Iniciou sua vida acadêmica na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004, obtendo título de Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2009.

Em maio de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de sua dissertação no dia 21 de fevereiro de 2011.

## Índice

	Página
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. O biodiesel.....	3
2.2. O pinhão-manso.....	5
2.3. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs).....	8
2.4. Avaliação da diversidade de FMAs em plantios de pinhão-manso.....	11
3. Material e Métodos.....	14
3.1. Locais de realização das análises.....	14
3.2. Áreas amostradas.....	14
3.3. Amostragem de solo e sistema radicular.....	15
3.4. Número de esporos e caracterização morfológica de FMAs.....	17
3.5. Avaliação da colonização micorrízica.....	17
3.6. Análises estatísticas.....	18
3.7. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	18
3.7.1. Extração de DNA do solo e dos marcadores de referência .....	18
3.7.2. Amplificação da sequência de DNA correspondente ao gene rDNA 18S utilizando a estratégia de <i>Nested</i> PCR.....	19
3.7.3. Espécies de FMAs utilizados como marcadores de referência.....	21
3.7.4. Análise dos produtos do PCR por DGGE.....	21
3.8. Seleção e sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos pela técnica de <i>Nested</i> PCR.....	22
4. Resultados e Discussão.....	24
4.1. Abundância de esporos e colonização micorrízica.....	24
4.2. Diversidade de FMAs por características morfológicas.....	28

4.3. Diversidade de FMAs avaliadas por ferramentas moleculares.....	32
4.3.1. Análise das espécies de FMAs marcadoras de referência por PCR-DGGE.....	33
4.3.2. Análise da estrutura da comunidade de FMAs nas amostras de solo por PCR-DGGE.....	36
4.3.3. Identificação das espécies de FMAs pelo sequenciamento das bandas eluídas do gel do DGGE.....	41
4.4. Considerações finais sobre a diversidade de FMAs em plantios de pinhão-manso.....	48
5. Conclusões.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	51

## Resumo

MOREIRA, Bruno Coutinho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de pinhão-manso**. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Sidney Luiz Stürmer.

A cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é considerada uma importante fonte de matéria-prima para produção do biodiesel. Esta espécie possui uma alta adaptabilidade ecológica, permitindo seu crescimento em uma grande variedade de condições ambientais, podendo ter um bom desenvolvimento tanto em regiões tropicais secas quanto em zonas equatoriais úmidas. Regiões onde a cultura do pinhão-manso está sendo implantada apresentam um elevado número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as plantas apresentam relações benéficas nas associações com estes fungos. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento das espécies de FMAs em associação com diferentes acessos de pinhão-manso, bem como comparar a diversidade desses fungos quando esta cultura é submetida a diferentes condições edafoclimáticas, utilizando métodos clássicos de identificação para estes micro-organismos, complementados com avaliações moleculares. Neste contexto, um total de 19 espécies de FMAs foi identificado na rizosfera das plantas de pinhão-manso, além dos indivíduos apresentados somente em nível de gênero. Houve diferenças na ocorrência destas espécies entre as áreas de Viçosa, Canaã e Nova Porteirinha, bem como entre os diferentes acessos cultivados nesta última área. Em todas as áreas, o número de esporos de FMAs variou de 89 a 728 por 100 cm<sup>3</sup> de solo e a porcentagem de colonização micorrízica variou entre 50,67 a 72 %. As espécies do gênero

*Glomus* foram as mais abundantes. Indivíduos de pinhão-mansão de mesma procedência, plantadas em regiões distantes, mas, com condições edafoclimáticas semelhantes, possuem populações de FMAs similares. Os acessos diferentes apresentaram uma variação na população de FMAs no solo rizosférico em uma mesma área. A soma das metodologias morfológicas e moleculares apresentou informações mais completas a respeito da diversidade de FMAs presentes na rizosfera de pinhão-mansão. Estes resultados representam os primeiros relatos sobre a composição das espécies de FMAs em povoamentos de pinhão-mansão em diferentes áreas geográficas de estudo.

## Abstract

MOREIRA, Bruno Coutinho, M. Sc., Federal University of Viçosa, February 2011. **Arbuscular mycorrhizal fungi in pinhão-mansô rhizosphere.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Sidney Luiz Stürmer.

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an important source of raw material for biodiesel production. This species has high ecological adaptability and can grow in a wide variety of environmental conditions, presenting good development in both dry tropical regions and humid equatorial zones. In the regions where physic nut is being cultivated a large number of spores of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) has been found and the plants have beneficial relationships in association with these fungi. The objective of this work was to survey the AMF species in association with different accesses of physic nut, as well as to compare the diversity of these fungi when physic nut is subjected to different edaphoclimatic conditions, using classical methods of identification for these microorganisms, complemented with molecular techniques. In this context, a total of 19 AMF species were identified in the rhizosphere of physic nut, besides individuals identified only at the genus level. Differences in the occurrence of AMF species among the areas of Viçosa, Canaã and Nova Porteirinha, as well among the different accesses cultivated in this last area were observed. In all areas, the numbers of AMF spores ranged from 89 to 728 per 100 cm<sup>3</sup> of soil and the mycorrhizal colonization percentage ranged from 50,67 to 72 %. The species of the genus *Glomus* were the most abundant. Individuals of physic nut of the same origin, grown in remote regions but with similar

edaphoclimatic conditions, present similar AMF species. However, the different accesses showed a variation in AMF population in the rhizospheric soil from the same area. The sum of morphological and molecular methods showed a more complete set of information on the diversity of AMF in the rizosphere of physic nut. These results represent the first reports related to the composition of AMF species in physic nut plantations in different geographical areas.

## 1. Introdução

A produção do biodiesel é uma ferramenta importante na busca por fontes de energias alternativas e ambientalmente aceitáveis, com potencial para substituição de derivados de combustíveis fósseis. Para que esta substituição seja real, a introdução do biodiesel deve-se apresentar tecnicamente viável, economicamente competitiva e ambientalmente correta.

As características encontradas nas plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L. – Família Euphorbiaceae), tais como o bom crescimento e desenvolvimento em regiões com baixos índices de fertilidade natural, resistência a condições mais acentuadas de déficits hídricos e bom rendimento do teor de óleos nas sementes, bem como da qualidade desse óleo, fazem com que esta cultura se torne uma possível opção em programas de incentivo para produção de biodiesel. O pinhão-manso pode ser implantado em grande escala, bem como, em áreas marginais de pequenas propriedades rurais, não competindo com glebas férteis destinadas a plantações de gêneros alimentícios, tornando-se uma fonte de renda extra para o setor de agricultura familiar.

No entanto, a escassez de informações a respeito das características agronômicas da espécie ainda dificulta a exploração da cultura de modo a se obter o máximo de seu potencial produtivo.

Assim como praticamente todas as plantas de interesse comercial, o crescimento das plantas de pinhão-manso é positivamente influenciado pela associação micorrízica estabelecida com os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Esta associação pode ser responsável, em grande parte, pela maior tolerância da planta a condições ambientais mais extremas. Contudo, pouco se conhece sobre as interações entre os FMAs e o pinhão-manso, bem como os efeitos da associação no crescimento e desenvolvimento desta espécie. Tal conhecimento pode ser utilizado em um programa de manejo da cultura, com a intenção de favorecer um maior crescimento das plantas, aumentando, assim, a sua produtividade.

Uma das primeiras etapas para se viabilizar a utilização das associações micorrízicas e adaptabilidade comercial é conhecer as comunidades de FMAs associados com esta planta em condições de campo. Assim, um estudo de ocorrência das espécies de FMAs mais comumente encontradas associadas a estas plantas e sua relação com as características locais nos quais a lavoura está implantada é justificável, quando se procura identificar isolados fúngicos que contribuam para o desenvolvimento e crescimento dessa espécie.

Considerando-se que as características genéticas das plantas e as condições edafoclimáticas podem influenciar a diversidade e o potencial de inóculo de FMAs em culturas de pinhão-manso, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das espécies de FMAs em associação com diferentes acessos de pinhão-manso, bem como comparar a diversidade desses fungos em diferentes condições edafoclimáticas onde esta cultura é encontrada, utilizando-se método clássico de identificação para estes micro-organismos (por características morfológicas) complementados com avaliações moleculares dessas comunidades.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. O biodiesel**

A necessidade atual de reduzir a dependência de utilização de combustíveis fósseis para obtenção de energia tem intensificado as pesquisas no âmbito de desenvolver tecnologias para aquisição de energia renovável obtida de várias fontes como: energia solar, eólica, geotérmicas, energia térmica oceânica, hidráulicas dentre outras (SHARMA & SINGH, 2009), além da utilização de óleos e gorduras para a produção de biodiesel.

O biodiesel é definido como ésteres monoalquil de ácidos graxos de cadeia longa (APOSTOLAKOU *et al.*, 2009), provenientes tanto de óleos vegetais (DEMIRBAS, 2007), que podem ser extraídos de várias plantas oleaginosas como: mamona, dendê, girassol, babaçu, macaúba, amendoim, soja, pinhão-manso dentre outras (PNPB, 2010), quanto de derivados de gordura animal (DEMIRBAS, 2007). Considerado uma fonte de energia renovável, o biodiesel constitui-se de um combustível biodegradável, utilizado na redução da utilização de combustíveis fósseis e obtido por

diferentes processos como craqueamento, esterificação ou transesterificação (PNPB, 2010).

A denominação de biodiesel é devido ao fato deste ser um componente derivado de produtos biológicos e possuírem desempenho semelhante ao petrodiesel (SHARMA & SINGH, 2009). De acordo com os mesmos autores, este biocombustível pode, também, ser chamado de combustível limpo, por possuir conteúdo de enxofre muitas vezes menor que o apresentado pelo petrodiesel, além de que sua queima resulta em menor quantidade de monóxido de carbono emitido à atmosfera quando comparado à queima de hidrocarbonetos provenientes dos derivados do petróleo. Para que haja a substituição ao petrodiesel, a introdução do biodiesel deve-se apresentar tecnicamente viável, economicamente competitivo e ambientalmente correto (DEMIRBAS, 2007).

Diante deste contexto, Januan e Ellis (2009) enfatizaram como vantagens para produção do biodiesel sua ampla gama de fontes para extração de óleos, o que favorece a exploração das mais diversas áreas agrícolas nos países produtores com diferentes condições edafoclimáticas. Além disto, estes autores ressaltam a importância da maior taxa de degradação do biodiesel, causando menor impacto ambiental sobre a liberação acidental destes compostos no ambiente. Apostolakou *et al.* (2009) acrescentaram, ainda, como vantagens da produção de biodiesel, que sua queima emite 78 % menos dióxido de carbono à atmosfera, além de ser um produto biodegradável, não tóxico e mais seguro.

Atualmente, os biocombustíveis são introduzidos como mistura no diesel derivado do petróleo, principalmente em países como Alemanha e França, nas proporções de 5, 20, e 100 %, mais conhecidos como B5, B20 e B100, respectivamente, indicando as relações na misturas do biodiesel com o petrodiesel (JANUAN & ELLIS, 2009). O biodiesel já é usado em diversos países além dos já citados, como: Estados Unidos, Malásia, Indonésia, Brasil, Itália e outros países europeus (SHARMA & SINGH, 2009). No Brasil, de acordo com a lei N° 11.097 de 13 de janeiro de 2005, instituiu-se que a partir do ano de 2008 haverá, obrigatoriamente, a adição de 2 % de biodiesel (B2) no diesel produzido a partir de combustíveis fósseis e 5 % (B5) é a meta para 2013 (BRASIL, 2005).

O uso do Biodiesel em 2008 resultou em uma economia para o Brasil em cerca de US\$ 976 milhões devido a não importação de 1,1 bilhões de litros de diesel, conferindo efeitos diretos nas economias regionais do país, tanto nos setores agrícolas, quanto nas indústrias de bens e serviços, com introdução de renda e empregos nestas regiões (ANP, 2010). De acordo com dados obtidos no Ministério do Desenvolvimento Agrário, cerca de 600 mil postos de trabalho no setor agrícola já foram gerados com a produção de biodiesel, e com a ampliação do mercado para este produto milhares de famílias serão beneficiadas com o plantio de oleaginosas, principalmente as que vivem em regiões semiáridas do país (ANP, 2010).

Como incentivo para dinamizar a agricultura familiar, o Governo Federal instituiu a cobrança diferenciada de impostos na produção de matéria prima para produção de biodiesel, principalmente para os pequenos produtores das regiões norte e nordeste, bastando apenas o produtor possuir o Selo Social, para garantir os benefícios assegurados por lei (LEITE & LEAL, 2007).

A cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é apontada como uma importante fonte para produção do biodiesel (BEHERA *et al.*, 2010). As perspectivas sobre a cultura do pinhão-manso no semiárido nordestino têm se intensificado, uma vez que a planta se adapta bem às condições locais, como a alta insolação e por apresentar resistência a seca (ARRUDA *et al.*, 2004). Estas características reforçam possibilidade de implantação desta cultura em programas para produção de biodiesel direcionado à agricultura familiar, além de possuir bom rendimento para a indústria (ARRUDA *et al.*, 2004).

## 2.2. O pinhão-manso

*Jatropha curcas* L., popularmente conhecida como pinhão-manso é uma planta nativa da América tropical, com ampla dispersão por regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia (SCHMOOK & SERALTA-PERAZA, 1997; OPENSHAW, 2000). É uma espécie com características arbustivas,

perene, que pode atingir em torno de cinco a sete metros de altura (ACHTEN *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2009), sendo uma representante da família das euforbiáceas (OPENSHAW, 2000; DRUMOND *et al.*, 2009; BEHERA *et al.*, 2010) com vida média de 50 anos (ACHTEN *et al.*, 2008).

Esta espécie possui uma alta adaptabilidade ecológica permitindo seu crescimento em uma grande variedade de condições ambientais (HELLER, 1996), podendo ter um bom desenvolvimento tanto em regiões tropicais secas, quanto em zonas equatoriais úmidas (DRUMOND *et al.*, 2009), suportando uma ampla variação no regime pluviométrico local que pode oscilar entre 200 a 1500 mm por ano (OPENSHAW, 2000) ou ainda, 3000 mm por ano (ACHTEN *et al.*, 2008). Além disto, esta planta tem a capacidade de crescer em solos áridos e pedregosos, suportando longos períodos de secas e é encontrada desde o nível do mar até uma faixa de 1.200 m de altitude (DRUMOND *et al.*, 2009).

Em locais onde a competição com outras espécies de plantas por água, luz e nutrientes é limitada, como acontece em regiões de clima semiárido, o pinhão-mansão pode sobreviver e crescer bem nestas condições extremas (MAES *et al.*, 2009). No entanto, em condições ambientais mais úmidas a planta apresenta um melhor desempenho no seu desenvolvimento (BEHERA *et al.*, 2010), provavelmente pela maior facilidade de obtenção de nutrientes.

Várias características presentes no pinhão-mansão favorecem sua implantação como planta promissora para produção de biodiesel. Esta planta possui crescimento e desenvolvimento satisfatórios em solos marginais, o que possibilita a recuperação deste solo, e se desenvolve bem sob condições de salinidades mais acentuadas (JONGSCHAAP *et al.*, 2007). Além disto, pinhão-mansão é tolerante à seca, possui um baixo requerimento nutricional, apresenta sementes com elevado conteúdo de óleos de alta qualidade, requer menor quantidade de mão-de-obra para sua implantação, não compete com gêneros alimentícios e apresenta, geralmente, bons níveis de tolerância ou resistência a pragas e doenças (JONGSCHAAP *et al.*, 2007). Muitas destas características foram também citadas por outros autores (OPENSHAW, 2000; ARRUDA *et al.*, 2004; ACHTEN *et al.*, 2008;

BEHERA *et al.*, 2010), o que reforça a necessidade de observações mais detalhadas sobre o potencial desta cultura.

Por apresentar estas características, o pinhão-manso representa um bom potencial econômico, pois pode se tornar uma fonte de renda extra para os agricultores, que não necessitariam utilizar suas terras férteis, sendo estas direcionadas para outras culturas com finalidades alimentícias (JANUAN & ELLIS, 2009). Desta forma, esta cultura poderia ser explorada por muitos dos agricultores de regiões mais carentes do Brasil, habitantes do semiárido nordestino e norte de Minas Gerais, que apresentam dificuldades em sustentar altos investimentos em culturas muito exigentes em tratamentos culturais, o que oneraria o custo de produção.

Em relação à qualidade do óleo, avaliações realizadas para verificação do potencial produtivo do óleo extraído do pinhão-manso para produção de biodiesel apresentaram teor médio de 42 % de óleo nas sementes, suportando uma variação de 3 % devido a características genéticas (MELO *et al.*, 2006). A pesquisa apresentou também resultados satisfatórios para testes de qualidade deste óleo referente à massa específica, viscosidade cinemática, ponto de fulgor e índice de acidez seguindo como parâmetro os padrões estabelecidos pela ANP (Agência Nacional do Petróleo), o que corrobora para o incentivo do uso do pinhão-manso na produção de biodiesel (MELO *et al.*, 2006).

No entanto, existe pouca informação disponível sobre ecossistemas ou condições culturais nos quais pinhão-manso ocorre (BEHERA *et al.*, 2010), o que sugere que, para esta cultura atingir níveis mais expressivos de produtividades em escala que possa atender efetivamente ao mercado de biocombustível, há a necessidade de serem realizados mais estudos com a finalidade de alcançar este patamar, visto que é uma cultura até então pouco compreendida (LEITE & LEAL, 2007).

Estudos realizados por Carvalho (2008) demonstraram que em solos onde a cultura do pinhão-manso está implantada pode se encontrar alto número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) o que representa uma relação benéfica para ambos. De acordo com o mesmo autor, as plantas de pinhão-manso apresentam níveis consideráveis de dependência da associação simbiótica com os FMAs o que contribui para

sobrevivência e seu desenvolvimento no campo, principalmente em condições adversas. Esta dependência do pinhão-manso por FMAs faz com que parte das exigências nutricionais da planta sejam supridas, principalmente pela absorção de fósforo (P), o que favorece o desenvolvimento das plantas, já que estas respondem positivamente à absorção deste nutriente (CARVALHO, 2008).

A interação simbiótica entre pinhão-manso e FMAs demonstra que esta planta é positivamente influenciada pela associação micorrízica (OPENSHAW, 2000; ACHTEN *et al.*, 2008; CARVALHO, 2008), no entanto, ainda é limitada a quantidade de informações relacionadas aos níveis de benefícios que esta associação pode trazer para esta espécie, além de não se conhecer a diversidade dos FMAs que se associam ao pinhão-manso e sua relação com as mais diferentes condições edafoclimáticas presentes em regiões nas quais esta planta é cultivada.

### **2.3. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)**

A associação mutualista simbiótica conhecida como Micorriza Arbuscular (MA), que ocorre entre certos fungos de solo e a maioria das plantas terrestres, está presente na natureza a mais de 400 milhões de anos e é, atualmente, formada com aproximadamente 80% destas plantas, incluindo a maioria das espécies agrícolas, hortícolas e florestais (POZO & AZCÓN-AGUILAR, 2007). Por co-evoluírem com as plantas terrestres, os FMAs podem apresentar intensa influência, de maneira direta ou indireta, sobre a vida neste ambiente (SCHÜBLER *et al.*, 2001).

Esta associação simbiótica formada pelos FMAs com as plantas terrestres é a mais frequentemente encontrada na natureza, que apresenta como vantagens adaptativas, dentre outras, a de promover o crescimento das plantas em solos de baixa concentração de fósforo (P) (SMITH, *et al.*, 2010) e pode ocorrer destes de regiões árticas até tropicais (REDDY *et al.*, 2005).

Os FMAs estão agrupados dentro do filo Glomeromycota, distribuídos em quatro ordens (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Glomerales* e *Paraglomales*), totalizando 13 gêneros: *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Geosiphon*, *Glomus*, *Otospora*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Racocetra*, e *Scutellospora*, apresentando, cerca de 228 espécies já descritas ([www.lrz.de/~schuessler/amphylo](http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo), 2010).

A principal base fisiológica para esta simbiose é possuir a característica de bidirecionalidade na transferência de substâncias entre os FMAs e as plantas colonizadas (SMITH, *et al.*, 2010), nos quais os fungos, através de suas hifas externas, absorvem maior quantidade de nutrientes do solo como P, Zn e Cu e os direciona para a planta (HOOKER, *et al.*, 1999, SMITH, *et al.*, 2010). Em troca, a planta fornece para os FMAs carbono orgânico proveniente da fotossíntese (SMITH *et al.*, 2010), os quais representa sua única fonte de carbono para seu crescimento, diferenciação e reprodução. Por possuir esta característica os FMAs são simbiontes obrigatórios e não podem sobreviver sem a obtenção deste carbono advindo da planta (AZCÓN-AGUILAR, *et al.*, 1997, SMITH, *et al.*, 2010).

Os FMAs são de grande interesse agrônômico em decorrência dos efeitos benéficos da associação com diversas plantas. Aumento no crescimento das plantas mediante o incremento na absorção de nutrientes resulta em plantas mais nutridas e vigorosas, e maior resistência às condições ambientais adversas (HOOKER, *et al.*, 1999). A forma e distribuição das raízes no solo e a arquitetura desta estrutura são de fundamental importância na sua função de obter maior quantidade de água e nutrientes, sendo estas características potencializadas pela associação micorrízica (LOCATELLI, *et al.*, 2002). Uma série de mecanismos pelos quais os FMAs contribuem para a proteção da planta contra patógenos vem sendo descritas: melhoria no estado nutricional da planta, o que resulta em indivíduos mais vigorosos e assim se tornam mais resistentes ou tolerantes ao ataque de patógenos; compensação de danos causados às raízes pelos fitopatógenos pela maior absorção de nutrientes; competição por sítios de colonização no sistema radicular; mudanças anatômicas ou morfológicas do

sistema radicular e ativação do sistema de defesa da planta (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996).

Algumas evidências sugerem a combinação destes mecanismos como efeitos bioprotetores nos âmbitos tanto locais quanto sistêmicos (ALEJO-ITURVIDE *et al.*, 2008). Além disto, estes mecanismos de defesa podem ser efetivos contra múltiplos patógenos, pois, quando ativados, podem proteger as plantas por longos períodos (POZO, *et al.*, 2002). É de extrema importância, também, no aspecto econômico, uma vez que poderá reduzir os custos produtivos com diminuições de aplicações com defensivos agrícolas.

Além de melhorar o estado nutricional da planta e conferir resistência contra fitopatógenos, a associação micorrízica pode conferir resistência a estresses hídricos e possibilitar maior tolerância às condições de secas (AUGÉ, 2001), uma vez que o volume de solo explorado pelos FMAs é extremamente maior quando comparada a um sistema radicular que não apresenta esta associação.

Estes benefícios adquiridos pela planta em associação com os FMAs podem contribuir consideravelmente para o bom crescimento e desenvolvimento de uma cultura que cresce em solos marginais, sujeitos a depleção de nutrientes e estresses causados por fitopatógenos ou condições secas, como acontece com o pinhão-manso em solos localizados em regiões do semiárido brasileiro.

Além disto, outra possível contribuição da associação dos FMAs para as plantas de pinhão-manso é o incremento na percentagem de óleo na semente. Estudos realizados por Freitas *et al.* (2004) demonstraram que a micorrização possibilitou o incremento de 88 % de óleos essenciais em plantas de *Mentha arvensis*. Este exemplo reforça ainda mais a necessidade de realização de estudos, visando compreender melhor a relação entre FMAs e o pinhão-manso.

Assim, é de grande importância caracterizar a diversidade de FMAs mais comuns em plantações de pinhão-manso e identificar as espécies que melhor contribuem para o desenvolvimento desta planta em diferentes condições edafoclimáticas, visando obter benefícios mais expressivos advindos desta associação.

## 2.4. Avaliação da diversidade de FMAs em plantios de pinhão-manso

Os FMAs constituem um importante componente da microbiota da rizosfera em ecossistemas naturais (VERMA *et al.*, 2008), sendo que sua comunidade pode sofrer intensas alterações influenciadas por vários fatores, dentre os quais se encontram: condições ambientais, planta hospedeira e práticas agrícolas (McGONIGLE & MILLER, 1996).

A distribuição geográfica dos FMAs é também influenciada pelos fatores edafoclimáticos que podem influenciar as comunidades indígenas em uma determinada área. Para se entender melhor as variações que as comunidades de FMAs sofrem, sua quantificação e determinação são de extrema importância (VERMA *et al.*, 2008). Sabendo-se da multifuncionalidade e importância da diversidade destes FMAs no funcionamento dos ecossistemas, grandes esforços têm sido realizados para se identificarem as espécies que colonizam plantas em ecossistemas naturais (RODRÍGUES-ECHEVERRÍA & FREITAS, 2006).

Para uma descrição completa da comunidade de FMAs em um determinado solo são necessárias as avaliações da densidade de FMAs presentes sob a forma de esporos, hifas no solo, hifas intrarradiculares e vesículas, bem como informações relativas à abundância de cada espécie em cada componente analisado (DOUDS Jr. & MILLNER, 1999). Esta caracterização completa das comunidades de FMAs pode se tornar laboriosa pelas técnicas normalmente utilizadas.

O método que se utiliza tradicionalmente para a identificação taxonômica das espécies de FMAs é a comparação entre as características morfológicas dos seus esporos extraídos do solo (MOREIRA *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2005). Tais características incluem tamanho, cor e peculiaridades da parede dos esporos de cada espécie de FMA (SCHENCK & PEREZ, 1990; MORTON & BENTIVENGA, 1994). Contudo, alterações ocorridas nestes esporos decorrentes das interações com o ambiente e com a esporulação diferenciada entre as próprias espécies de FMAs dificultam a identificação destas espécies coletados em campo (RODRÍGUES-

ECHEVERRÍA & FREITAS, 2006). Além disso, uma avaliação unicamente relacionada à morfologia dos esporos oferece uma interpretação incompleta sobre a estrutura da comunidade destes fungos no ambiente (MA *et al.*, 2005).

Mais recentemente, a utilização de técnicas de biologia molecular tem progredido substancialmente nas informações sobre os FMAs, principalmente na obtenção da identificação destas espécies (KRAMADIBRATA *et al.*, 2000). As técnicas que analisam diretamente a comunidade de FMAs nos solos não requerem, normalmente, passos associados ao cultivo e produção de esporos destes fungos em cultura armadilha (KOWALCHUK *et al.*, 2002). Neste contexto, a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) tem sido empregada em análises da comunidade de FMAs, permitindo acessos a estes fungos nos sistemas radiculares das plantas, em amostras de solo ou mesmo em um banco de esporos, sendo um método já testado em alguns isolados de espécies de FMAs com habilidade de distinguir entre as diferentes espécies (KOWALCHUK *et al.*, 2002). Contudo, associações entre a identificação molecular e variabilidade genética das espécies de FMAs já identificadas pelas características morfológicas são, ainda, pouco conhecidas (NOVAIS *et al.*, 2010).

Para estudos moleculares com FMAs, as regiões mais utilizadas para ampliações do DNA com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) são: espaçadores transcricionais internos (ITS), os quais são regiões entre os genes que codificam para rRNA (NOVAIS *et al.*, 2010) e os genes que codificam o rRNA 18S destes organismos (ÖPIK *et al.*, 2003). Em ambos os locais, sequências específicas de nucleotídeos no DNA têm sido utilizadas para análises filogenéticas neste grupo de micro-organismos (ÖPIK *et al.*, 2003; NOVAIS *et al.*, 2010).

A biologia molecular tem contribuído muito para esclarecer a filogenia dos FMAs em nível de gênero ou em níveis superiores. No entanto, pouco ainda contribui para a identificação em nível de espécie (BERBARA *et al.*, 2006).

Para pinhão-mansão, apesar de já ser identificada e observada certa relação de dependência desta planta com a associação micorrízica

(CARVALHO, 2008), até o momento não foi realizado um levantamento das espécies de FMAs que mais frequentemente estão associadas com esta espécie e sua correlação com o ambiente no qual a planta é cultivada.

Verifica-se, portanto, que as micorrizas devem ser levadas em consideração quando se pretende maximizar a produtividade de uma determinada área de maneira mais sustentável, principalmente se for empregado um manejo adequado, entendendo o perfil característico da associação micorrízica com a planta cultivada (VERMA *et al.*, 2008). Isto demonstra a importância de se conhecerem as espécies dos FMAs que mais influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas de pinhão-manso para se estabelecer as técnicas de manejo que melhor favoreçam esta associação, com o intuito de proporcionar uma condição de maior sustentabilidade da lavoura, principalmente em regiões onde as condições de fertilidade natural e pluviométrica não favorecem o bom desenvolvimento da planta.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Locais de realização das análises**

O presente trabalho foi executado nos laboratórios de Associações Micorrízicas e de Genética Molecular de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG e no Laboratório de Micorrizas do Departamento de Ciências Naturais, da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau/SC.

#### **3.2. Áreas amostradas**

Amostras de solo e sistema radicular de plantas de pinhão-mansão foram coletadas na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), Unidade Regional Norte de Minas (URENM) em Nova Porteirinha/MG e em lavouras comerciais nas cidades de Viçosa/MG e Canaã/MG.

A lavoura de pinhão-manso, localizada na Epamig, está implantada em área com solos de classificação textural franco arenosa. A região possui temperatura média anual em torno de 24,5 °C, apresentando índice pluviométrico médio anual de 876 mm, com chuvas concentradas nos meses de novembro a março (ALMG, 2010). Já as lavouras situadas nas regiões de Viçosa e de Canaã apresentam solos com classificação textural argilo arenosa e franco argilo arenosa, respectivamente, com temperaturas médias anuais de 19,4 °C e índice pluviométrico médio anual de 1221,4 mm (ALMG, 2010).

### **3.3. Amostragem de solo e de sistema radicular**

Na estação experimental da Epamig (Nova Porteirinha/MG), foram selecionados 44 acessos (Tabela 1), dos quais 3 plantas por acesso foram amostradas. Na cidade de Canaã/MG foram selecionadas, ao acaso, 6 de 12 plantas remanescentes de uma lavoura comercial, e na lavoura de Viçosa/MG foram selecionadas ao acaso 9 plantas.

As amostras de solo, contendo sistema radicular, foram coletadas com o auxílio de um anel cilíndrico de 5 cm de diâmetro a uma profundidade de 0 a 20 cm no solo, para se obter volume padronizado das amostras coletadas. Duas subamostras de solo e de sistema radicular por planta, sob a projeção da copa, foram coletadas para obter-se uma amostra composta.

O sistema radicular foi coletado manualmente nos mesmos pontos de amostragem dos solos, contudo procurando explorar maior volume de solo por ponto amostrado até se obter um volume de raiz de pinhão-manso suficiente para posterior avaliação do percentual de colonização micorrízica.

Amostras compostas foram preparadas pela homogeneização de cerca de 100 cm<sup>3</sup> de solo coletados em cada ponto das respectivas áreas e enviadas para o Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda para realização das análises físico-químicas.

Tabela 1 - Acessos de pinhão-manso, do campo experimental da Epamig em Nova Porteirinha (MG), provenientes de diferentes regiões presentes no banco de germoplasma.

<b>ACESSO</b>	<b>Região de origem</b>
MA 01	Colonização Matinha-Janaúba
MA 02	Colonização Matinha-Janaúba
MA 03	Colonização Matinha-Janaúba
MA 04	Colonização Matinha-Janaúba
MA 06	Colonização Matinha-Janaúba
MA 10	Colonização Matinha-Janaúba
MA 12	Colonização Matinha-Janaúba
MA 13	Colonização Matinha-Janaúba
MA 14	Colonização Matinha-Janaúba
MA 15	Colonização Matinha-Janaúba
MA 18	Colonização Matinha-Janaúba
MA 19	Colonização Matinha-Janaúba
MA 21	Colonização Matinha-Janaúba
MA 22	Colonização Matinha-Janaúba
PA 01	Colonização Paciência-Janaúba
PA 03	Colonização Paciência-Janaúba
PA 04	Colonização Paciência-Janaúba
PA 05	Colonização Paciência-Janaúba
PA 06	Colonização Paciência-Janaúba
PA 07	Colonização Paciência-Janaúba
PA 08	Colonização Paciência-Janaúba
PA 09	Colonização Paciência-Janaúba
PA 10	Colonização Paciência-Janaúba
PA 11	Colonização Paciência-Janaúba
PA 14	Colonização Paciência-Janaúba
PA 15	Colonização Paciência-Janaúba
PA 16	Colonização Paciência-Janaúba
PA 17	Colonização Paciência-Janaúba
PA 18	Colonização Paciência-Janaúba
BR 01	Colonização Barbosa-Janaúba
BR 06	Colonização Barbosa-Janaúba
BR 12	Colonização Barbosa-Janaúba
BA 01	Colonização Banavit-Janaúba
BA 02	Colonização Banavit-Janaúba
BA 03	Colonização Banavit-Janaúba
BA 04	Colonização Banavit-Janaúba
BA 06	Colonização Banavit-Janaúba
BA 09	Colonização Banavit-Janaúba
BA 11	Colonização Banavit-Janaúba
BA 14	Colonização Banavit-Janaúba
BA 15	Colonização Banavit-Janaúba
BA 16	Colonização Banavit-Janaúba
BA 17	Colonização Banavit-Janaúba
SE 04	Sub-estação-Janaúba

### 3.4. Número de esporos e caracterização morfológica de FMAs

Esporos de FMAs foram extraídos do solo utilizando-se 100 cm<sup>3</sup> de cada amostra composta referente a uma planta, pela técnica de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicholson, 1963), seguida por centrifugação em água e depois em solução de sacarose 45 %. Posteriormente, foram realizadas a quantificação e a separação dos esporos por características morfológicas, sob lupa binocular estereoscópica.

Para a identificação das espécies de FMAs a partir das características morfológicas, esporos foram separados de acordo com seus morfotipos e montados em lâminas com polivinil-lacto-glicerol (PVLG) puro e PVLG misturados com Melzer (1:1 v/v). A identificação foi realizada seguindo as descrições das culturas de referência presentes no *International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi*- INVAM (2010) e pelo site [www.lrz.de/~schuessler/amphylo](http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo) (2010).

### 3.5. Avaliação da colonização micorrízica

Para avaliação da colonização micorrízica, raízes de pinhão-mansão foram submersas, primeiramente, em FAA (formol: álcool: ácido acético 0,5:9:0,5), para conservação das estruturas fúngicas e das raízes. Em seguida, as raízes foram descoradas com solução de KOH 10 % (p:v) por 12 horas, lavadas em água corrente e, posteriormente, imersas em HCl 1 % (v:v) por 5 minutos, seguindo-se de coloração em azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v), a 70 °C. Após a coloração, as raízes foram estocadas em lactoglicerol (BRUNDRETT *et al.*, 1996). A colonização radicular por FMAs foi quantificada pelo método da contagem em placa quadriculada (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980).

### 3.6. Análises estatísticas

Cada tratamento composto pelo agrupamento de 3 plantas coletadas em Viçosa e Canaã, bem como pelas 3 repetições de cada acesso obtido em Nova Porteirinha, foi avaliado quanto ao número de esporos e à percentagem de colonização e calculadas as médias e o desvio padrão entre os parâmetros avaliados. Dado o elevado número de amostras coletadas em Nova Porteirinha foi realizado o cálculo da frequência com que cada espécie foi encontrada na área, com a seguinte fórmula:  $\text{Freq} = (\text{n}^\circ \text{ de acessos que a espécie foi encontrada} / \text{n}^\circ \text{ total de acessos}) * 100$ .

### 3.7. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Foram realizadas análises por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes rDNA 18S de FMAs presentes em cada amostra analisada. A metodologia utilizada foi a descrita por Liang *et al.* (2008), com modificações.

#### 3.7.1. Extração de DNA do solo e dos marcadores de referência

Aproximadamente 9 g de solo foram depositados em recipientes tipo cadinho, formando uma amostra composta representando cada tratamento. O solo foi macerado com auxílio de pistilo até se atingir a característica de pó, a fim de se obter partículas desagregadas e o rompimento dos esporos dos FMAs. Destas amostras compostas apenas 1 g foi utilizado para extração do DNA total do solo para cada tratamento.

Para a extração do DNA do solo foi utilizado o *kit UltraClean™ Soil DNA Isolation* (MO BIO Laboratories, Solana beach, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8 %), seguindo-se de coloração com brometo de etídio e visualização sob luz UV, para verificação

da presença de bandas indicativas da presença de DNA genômico do solo utilizado e também analisadas por espectrofotometria.

O DNA total dos marcadores de referência foi extraído da mesma forma como realizado para as amostras de campo. A única diferença foi a concentração dos esporos de FMAs contidos em 50 cm<sup>3</sup> de solo ou todo conteúdo de esporos presentes em uma placa de *Petri* da cultura *in vitro*, do fungo *Glomus clarum*, a fim de, concentrar os esporos e garantir quantidades de DNA suficientes para serem usados como parâmetros nos estudos subsequentes.

### 3.7.2. Amplificação da sequência de DNA correspondente ao gene rDNA 18S utilizando a estratégia de *Nested PCR*

As reações de PCR foram realizadas em tubos de PCR de paredes finas com volume de 0,5 mL, utilizando-se a enzima Go Taq® Flex DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) em um volume de 50 µL de tampão (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; pH 8,4) de acordo com as recomendações do fabricante. Os controles negativos consistiram de 1 µL de água MilliQ, em substituição à amostra de DNA, para se checar a presença de possíveis contaminantes. Todo o material utilizado no preparo das reações foi previamente esterilizado.

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos correspondentes ao rDNA 18S na primeira rodada foram: AM1 (5'- GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3') (HELGASON *et al.*, 1998), em combinação com o *primer* universal para eucariotos NS31 (5'- TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') (SIMON *et al.*, 1992).

As amostras de DNA utilizadas para amplificação da região desejada consistiram de 5 µL do DNA extraído dos esporos de FMAs utilizados como marcadores e do DNA extraído do solo. A mistura de reação para realização do PCR foi composta de 200 µM de cada um dos quatro desoxinucleosídeos trifosfatados, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada *primer* e 1,25 U de Go Taq DNA polimerase. Foi adicionada, também uma alíquota de 0,8 µL (0,8 µg µL<sup>-1</sup>) de albumina bovina acetilada (BSA, Promega) para cada reação, com a

finalidade de potencializar a ação da polimerase. As ampliações do PCR foram conduzidas em um termociclador (Mastercycler epgradient, Eppendorf), utilizando-se as seguintes etapas: um primeiro ciclo de 1 min a 94 °C, 1 min a 66 °C e 1 min e 30s a 72 °C, seguido de mais 30 ciclos de 30s a 94 °C, 1 min a 66 °C e 1 min e 30s a 72 °C e para finalizar com a extensão final de 10 min a 72 °C. Para a confirmação da presença do produto amplificado, alíquotas dos produtos das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8 % p/v), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV.

A amplificação do fragmento de DNA que corresponde ao rDNA 18S dos FMAs, a partir destes dois primeiros *primers* descritos (AM1 e NS31), resultou em fragmentos de DNA de aproximadamente 580 pb. Com a finalidade de se obter um fragmento de DNA menor para realização da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), e melhor observação das bandas no gel, foi realizada uma segunda rodada de reações de PCR (*Nested* PCR).

O produto da reação do primeiro PCR foi diluído 10 vezes em água MilliQ estéril. Para as amostras com maior concentração de DNA (marcadores e amostras de Viçosa/MG e Canaã/MG), uma alíquota de 1 µL desta diluição foi utilizada como amostra para o *Nested* PCR, enquanto que para as demais amostras com menor concentração de DNA (amostras de Nova Porteirinha/MG), a alíquota de DNA utilizada foi de 7 µL. Em ambos os casos, foram utilizados os *primers* NS31-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') (KOWALCHUK *et al.*, 2002) e Glo1 (5'-GCCTGCTTTAAACTCTA) (CORNEJO *et al.*, 2004), empregando-se a mesma reação de mistura utilizada na primeira rodada de PCR. Foi realizada a desnaturação inicial do DNA da amostra por 5 min a 94 °C, seguidos por 35 ciclos com desnaturação por 45s a 94 °C, pareamento por 45s a 52 °C e extensão por 1 min a 72 °C e para a extensão final dos fragmentos a 72 °C por 30 min. Para a confirmação da presença dos produtos, 5 µL da reação de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1,5 % p/v) corados com brometo de etídio, e visualizados sob luz UV no sistema de

fotodocumentação Eagle Eye (II Still Video System (Stratagene – Califórnia USA).

Na verificação dos produtos do *Nested* PCR, algumas amostras apresentaram bandas inespecíficas, as quais foram excluídas das amostras com a excisão das bandas desejadas do gel, purificadas com *Kit* específico (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System, Promega) e reamplificadas com o mesmo procedimento para a segunda PCR, a fim de homogeneizar todas as amostras para a realização do DGGE. Posteriormente os produtos obtidos a partir da segunda rodada de realização do PCR foram armazenados a -20 °C para subsequente análise por DGGE.

### **3.7.3. Espécies de FMAs utilizadas como marcadores de referência**

Para realizar a comparação entre as bandas encontradas nos géis, foram preparados marcadores de referencia de DGGE a partir das espécies *Glomus clarum* da coleção *in vitro* do Laboratório de Associações Micorrízicas (UFV) e das espécies *Acaulospora koskei* |SCT406A|, *Acaulospora tuberculata* |SCT250B|, *Gigaspora albida* |PRN201A|, *Gigaspora decipiens* |SCT304A| e *Scutellospora heterogama* |PNB102A| obtidas da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, SC.

A preparação dos marcadores foi realizada da mesma forma descrita para as amostras de campo e um volume de 15 µL deste preparado foi utilizado como marcador para análise de DGGE.

### **3.7.4. Análise dos produtos de PCR por DGGE**

Dos produtos obtidos pela técnica de *Nested* PCR a partir dos *primers* Glo1 e NS31-GC foram recolhidos uma alíquota de 10 µL das amostras de Viçosa e Canaã e 20 µL das amostras de Nova Porteira para

serem analisados por DGGE (Modelo *Dcode*<sup>TM</sup> System – BIO-Rad Califórnia, USA).

O gel utilizado continha poliacrilamida (37,5:1 acrilamida: bisacrilamida) a 8% (p/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris/Ácido acético/ EDTA, pH 8,0). Um gradiente desnaturante linear formado com o auxílio do Formador de Gradiente Hoefer SG50 (Amersham Biosciences) e pela mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida, para obter um gradiente final variando de 35 % para 55 % foi usado para todas as análises, onde a condição de 100 % de agentes desnaturantes era composta de uréia 7 mol L<sup>-1</sup> (Sigma, Cat#U5378) e formamida a 40 % (v/v) (Sigma, Cat#F9037) e a outra solução sem a presença destes agentes.

O reservatório utilizado para eletroforese foi acomodado sobre um agitador para distribuição uniforme do calor durante o procedimento da eletroforese. Toda análise do DGGE foi realizada em tampão TAE 1X a uma temperatura constante de 60 °C a 80 V por um período de 10 minutos, seguidos de 60 V por 20 horas. Os géis foram corados, após o término da eletroforese, por 30 a 40 minutos em solução 1X de SYBR GOLD ® (Sigma-Aldrich), conforme as recomendações do fabricante. As imagens dos géis foram observadas sob luz UV e posteriormente, capturadas e digitalizadas pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye (II Still Video System (Stratagene – Califórnia USA).

As imagens obtidas dos géis foram analisadas com o auxílio do programa Bionumerics, para estudos sobre o perfil das populações de FMAs nestes solos e gerar o dendrograma representando a distância e o padrão de bandas correspondentes ao gene 18S rDNA de FMAs.

### **3.8. Seleção e sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos pela técnica de *Nested* PCR**

Após a realização da técnica de DGGE, as bandas mais frequentes e que apresentaram maior intensidade nos géis foram selecionadas e seus fragmentos de DNA coletados com o auxílio de ponteiras estéreis e

transferidos para microtubos de 0,5 mL contendo 30  $\mu$ L de água milliQ estéril, para reamplificação destes fragmentos pela técnica de PCR.

Esta nova reação de PCR foi realizada de maneira idêntica à utilizada no *Nested* PCR, incluindo a utilização dos mesmos *primers* (NS31 e Glo1, exceto pela exclusão do grampo GC). Posteriormente, estes fragmentos de DNA foram sequenciados e analisados com o auxílio da ferramenta BLASTn, do NCBI. Os fragmentos selecionados foram submetidos ao sequenciamento utilizando-se o *primer* Glo1, com o procedimento realizado pela empresa Macrogen, Inc. (Korea). Os resultados foram analisados a partir da comparação com outras sequências depositadas nos bancos de dados através da ferramenta BLASTn (NCBI) para a identificação de algumas espécies de FMAs aumentando a diversidade de FMAs encontradas nas amostras estudadas.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Abundância de esporos e colonização micorrízica

As médias do número de esporos de FMAs quantificados nas áreas de Viçosa, Canaã e em todos os acessos coletados em Nova Porteirinha apresentaram amplitude 640,67 esporos com coeficiente de variação calculado de 53,54 % (tabela 2). Grandes variações no número de esporos nas repetições de um mesmo tratamento indicam que os mesmos distribuem-se de forma não-uniforme no solo. Já é relatado que alguns fatores podem influenciar a distribuição desigual de FMAs e de seus esporos no solo, a exemplo de exsudados radiculares de diferentes plantas e fertilidade do solo (MARTÍNEZ-GARCIA *et al.*, 2011), além de propriedades físico- químicas dos solos (VERMA, *et al.*, 2008).

As percentagens de colonização micorrízica identificadas no sistema radicular de pinhão-manso, apresentaram diferenças entre as amostras coletadas nas áreas de Viçosa e Canaã, assim como encontrado entre os acessos coletados em Nova Porteirinha (tabela 2), porém, apresentando um conjunto de dados mais homogêneos com o coeficiente de variação de 12,69 %.

Tabela 2-Número de esporos no solo sob a copa das plantas e colonização micorrízica em pinhão-manso nas áreas coletadas em Viçosa, Canaã e Nova Porteirinha.

Amostras	Média do Número de Esporos (100 mL)	Média da Colonização Micorrízica (%)
Viçosa	258,22 ± 153,66	58,88 ± 7,06
Canaã	624,67 ± 93,7	59,63 ± 14,12
N. P. Acesso 01	124 ± 4	62,33 ± 11,02
N. P. Acesso 02	321,33 ± 153,48	64,67 ± 11,72
N. P. Acesso 03	393,33 ± 90	57,33 ± 2,52
N. P. Acesso 04	205,33 ± 48,88	66,00 ± 8,89
N. P. Acesso 05	574 ± 426,38	62,67 ± 3,21
N. P. Acesso 06	146 ± 72,19	61,67 ± 5,77
N. P. Acesso 07	728 ± 577,43	70,00 ± 8,19
N. P. Acesso 08	188 ± 50,12	50,67 ± 11,02
N. P. Acesso 09	248 ± 98,31	56,00 ± 6
N. P. Acesso 10	329,33 ± 159,82	61,67 ± 7,09
N. P. Acesso 11	190,67 ± 46,36	62,67 ± 4,04
N. P. Acesso 12	205,33 ± 40,07	55,33 ± 3,79
N. P. Acesso 14	281,33 ± 156,68	52,33 ± 7,37
N. P. Acesso 15	244 ± 137,58	54,33 ± 3,51
N. P. Acesso 16	281,67 ± 17,56	67,67 ± 8,08
N. P. Acesso 17	269,33 ± 91,77	59,00 ± 12,12
N. P. Acesso 18	302,67 ± 20,53	65,33 ± 5,51
N. P. Acesso 19	205,33 ± 66,25	61,67 ± 12,01
N. P. Acesso 20	329,33 ± 20,13	72,00 ± 5,57
N. P. Acesso 21	89,33 ± 48,06	58,67 ± 3,06
N. P. Acesso 22	471 ± 204,72	75,67 ± 7,51
N. P. Acesso 23	317,33 ± 86,29	63,00 ± 8
N. P. Acesso 24	421,67 ± 248,76	63,00 ± 7,21
N. P. Acesso 25	190 ± 82	57,67 ± 8,74
N. P. Acesso 26	650,33 ± 390,95	62,33 ± 12,10
N. P. Acesso 27	87,33 ± 14,19	59,33 ± 4,51
N. P. Acesso 28	194,33 ± 6,03	55,33 ± 1,53
N. P. Acesso 29	260,67 ± 47,5	53,00 ± 3,46
N. P. Acesso 30	214,67 ± 14,05	54,33 ± 1,15
N. P. Acesso 31	249,33 ± 207,47	66,33 ± 3,79
N. P. Acesso 32	308 ± 100,48	65,00 ± 6,24
N. P. Acesso 34	213,67 ± 124,52	50,67 ± 6,43
N. P. Acesso 35	278,67 ± 72,92	51,33 ± 4,62
N. P. Acesso 36	172 ± 12,00	55,00 ± 7,81
N. P. Acesso 37	197,33 ± 68,04	53,33 ± 6,11
N. P. Acesso 38	222,67 ± 20,53	51,67 ± 1,53
N. P. Acesso 40	174,67 ± 32,58	56,33 ± 7,57
N. P. Acesso 42	220,33 ± 15,04	57,00 ± 4,00
N. P. Acesso 43	234,67 ± 195,15	54,00 ± 6,00
N. P. Acesso 44	148 ± 52,46	60,67 ± 11,59
N. P. Acesso 45	253,33 ± 15,14	62,67 ± 3,51
N. P. Acesso 46	361,33 ± 122,14	59,33 ± 3,79
N. P. Acesso 47	312 ± 165,55	70,00 ± 7,55
N. P. Acesso 48	315,67 ± 24,70	62,67 ± 4,51

Coeficiente de Variação (C.V.): 53,41 % e 12,69 % para número de esporos e percentagem de colonização micorrízica, respectivamente e seus desvios padrão para cada amostra.

Os valores de colonização micorrízica nos acessos de pinhão-mansão variaram de 51 a 75 %. Todas as plantas analisadas apresentaram estruturas típicas da colonização micorrízica e em todos os solos amostrados foram observados esporos de FMAs morfológicamente distintos (Figura 1).

A variação da percentagem na colonização micorrízica pode estar relacionada à diversidade de espécies de FMAs presentes próximos ao sistema radicular da planta (BERBARA *et al.*, 2006). Isto significa que pouca variação na porcentagem de colonização não implica em menor eficácia na relação fungo/planta, visto que a eficiência da associação pode estar intimamente relacionada com o isolado fúngico e o cultivar da planta, como relatado, por exemplo, para oliveiras (PORRAS-SORIANO *et al.*, 2009), e mesmo pela compatibilidade simbiótica fungo-planta (POUYU-ROJAS *et al.*, 2006).

A comparação entre a porcentagem de colonização por FMAs em plantas presentes em diferentes ecossistemas sugere que várias espécies que crescem em regiões com climas tipicamente de semiárido ou árido, podem ser mais dependentes da associação micorrízica (TAO & ZHIWEI, 2005). Tal dependência micorrízica para a planta de pinhão-mansão já havia sido sugerida por Carvalho (2008).

Fatores climáticos e de solo influenciam também a colonização micorrízica e o número de esporos, mas a sua intensidade varia com a espécie de FMA (MUTHUKUMAR & UDAIYAN, 2002). Neste sentido, os resultados das análises físico-químicas do solo apresentaram características distintas entre as áreas estudadas (Tabela 3). No entanto, tais características pouco influenciaram na composição do número de esporos de FMA nas áreas ou na percentagem de colonização micorrízica nas plantas.

Os fatores do solo que exerceram influência sobre a comunidade de FMAs foram o teor de P no solo que apresentou um coeficiente de correlação de Pearson de -0,9894 a 5 % de significância e a saturação por base (SB) com coeficiente de correlação de 0,9619 a 10 % de probabilidade, ambos relacionados ao número de esporos no solo.

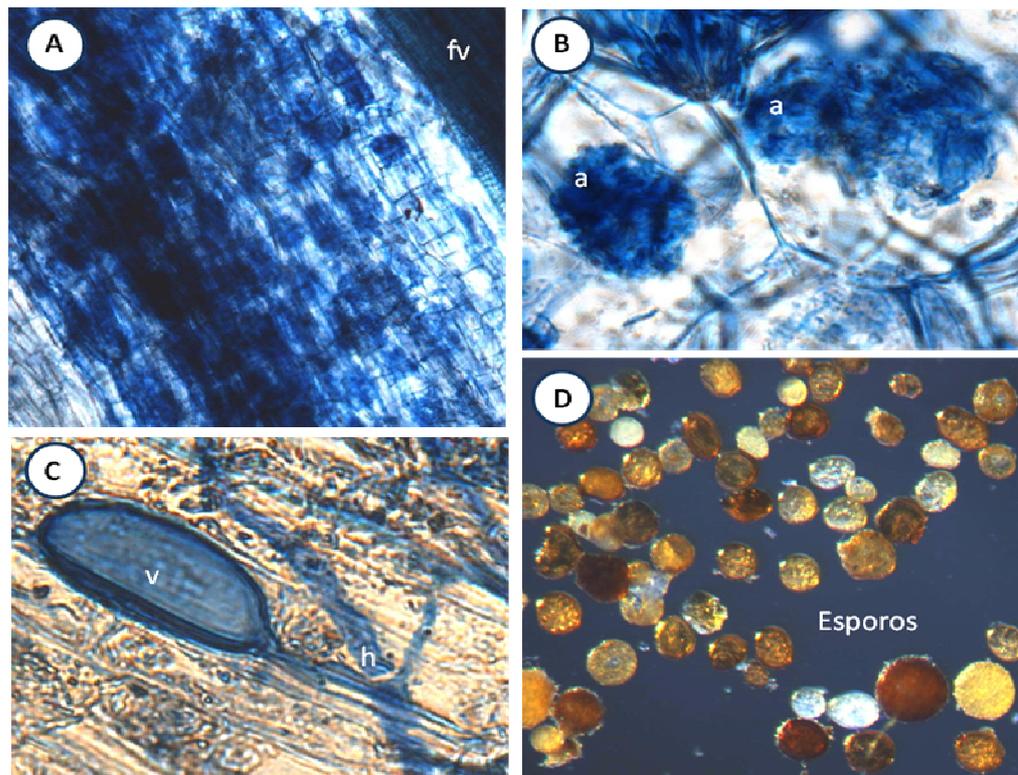


Figura 1. Estruturas típicas de fungos micorrízicos arbusculares encontradas no sistema radicular de pinhão-mansão. (A) visão geral do córtex radicular micorrizado -fv- região dos feixes vasculares; (B) Arbúsculo -a- no interior da célula; (C) Vesícula -v- entre as células do córtex; (D) Esporos morfologicamente distintos coletados do solo sob a projeção da copa da planta.

Tabela 3- Características físico-químicas dos solos coletados das áreas de Viçosa, Canaã e Nova Porteirinha.

Área	pH	P	K	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Al <sup>+3</sup>	H+Al	SB	CTC(t)
	H <sub>2</sub> O	---mg/dm <sup>3</sup> ---							
		-----cmolc/dm <sup>3</sup> -----							
<b>Canaã/MG</b>	4,40	45,70	65,00	3,00	0,40	0,40	5,78	3,57	3,97
<b>Nova Porteirinha/MG</b>	6,65	30,00	290,00	3,10	1,80	0	1,49	5,64	5,64
<b>Viçosa/MG</b>	5,20	19,60	158,00	4,00	1,20	0,10	2,81	5,60	5,70
	CTC(T)	V	m	MO	P-rem	Argila	Silte	Areia	
	cmolc/dm <sup>3</sup>	-----%-----		dag/Kg	mg/L	-----%-----			
<b>Canaã/MG</b>	9,35	38,00	10,00	3,70	33,20	36	10	54	
<b>Nova Porteirinha/MG</b>	7,13	79,00	0	0,80	50,9	12	22	66	
<b>Viçosa/MG</b>	8,41	67,00	2,00	2,90	29,60	33	17	50	

SB: soma de bases. CTC<sub>(t)</sub>: capacidade de troca catiônica efetiva. CTC<sub>(T)</sub>: capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V: índice de saturação por bases. m: índice de saturação por alumínio. MO: matéria orgânica. P-rem. Fósforo remanescente.

Há relatos de correlações significativas entre fatores químicos do solo e influências sobre a dinâmica da micorrização em diferentes plantas como matéria orgânica e disponibilidade de P no solo em espécies arbóreas (VERMA, *et al.*, 2008), além de matéria orgânica e razão entre N:P em arbustos crescendo em ambientes semiáridos (MARTÍNEZ-GARCIA *et al.*, 2011).

A correlação negativa entre o número de esporos e o teor de P no solo pode apresentar efeitos indiretos, porém discretos, relacionados à colonização micorrízica, uma vez que houve baixa correlação entre a abundância de esporos e colonização micorrízica, como já demonstrado por Carvalho (2008). Contudo, outros trabalhos não apresentaram correlação entre estes fatores mesmo em ambientes áridos (UHLMANN *et al.*, 2006).

A variação na porcentagem de colonização micorrízica nestas plantas, dentro de uma mesma área, entre diferentes acessos sugere que pode haver compatibilidade genética diferenciada entre os acessos de pinhão-manso e os FMAs. Alguns relatos já demonstraram que a resposta da planta à micorrização depende, além da compatibilidade genética e funcional entre os organismos, de condições ambientais (BERBARA *et al.*, 2006).

#### **4.2. Diversidade de FMAs por características morfológicas**

A análise morfológica dos esporos de FMAs coletados no campo nas áreas de Viçosa, Canaã e Nova Porteirinha resultou na identificação de 27 espécies, sendo que a área de Nova Porteirinha apresentou o maior número de espécies e gêneros encontrados, 21 e 6, respectivamente (figura 2). Isto pode ser resultado do maior número de pontos amostrados nesta área, no entanto, as características locais, também, contribuem para favorecer um elevado número de espécies de FMAs.

As espécies do gênero *Glomus* foram mais abundantes em todas as áreas pesquisadas. Contudo, espécies de *Acaulospora* apresentaram significativa representatividade em Nova Porteirinha, onde foram encontrados com 7 das 8 espécies do gênero.

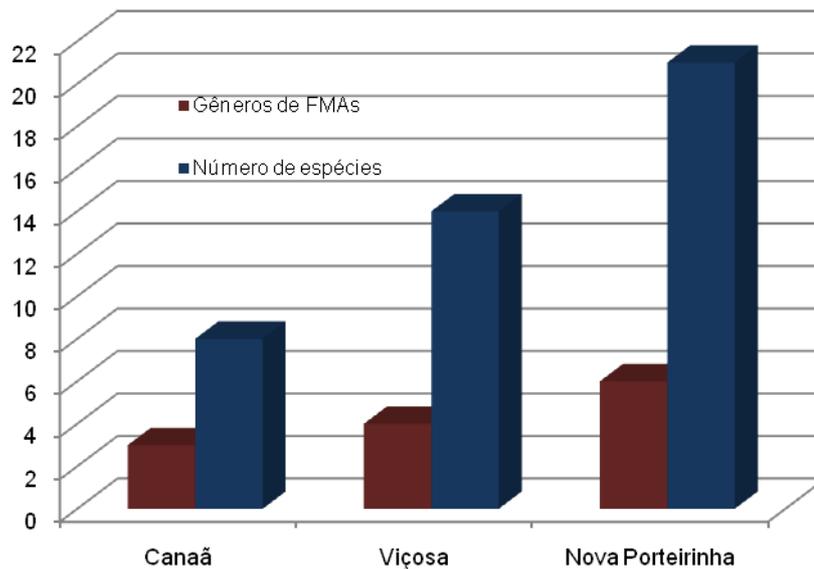


Figura 2. Número de gêneros e espécies de FMAs nas áreas de Canaã, Viçosa e Nova Porteirinha associados à cultura do pinhão-mansão.

Alterações ambientais diversas, como fertilidade do solo, são fatores indutores de distúrbios na comunidade de FMAs que promovem uma seleção natural em direção à prevalência de espécies com esporos de tamanho reduzido (BERBARA *et al.*, 2006). A predominância das espécies de *Glomus* em todas as três áreas estudadas pode estar relacionada à alta adaptabilidade deste gênero às variações de temperatura e solo, além de sua capacidade de sobreviver em uma escala de pH desde condições ácidas até alcalinas (HO, 1987) e apresentar melhor habilidade de se adaptar a distúrbios no solo (OEHL *et al.*, 2010).

Espécies de FMAs com esporos de tamanho reduzido tendem a ser mais adaptados a ecossistemas com temperatura média elevada e áridos, o que sugere que estes micro-organismos desempenham funções cruciais no desenvolvimento e sustentação da vegetação nestes locais (TAO & ZHIWEI, 2005).

Dos 27 diferentes representantes de FMAs que foram encontrados na rizosfera de pinhão-mansão, apenas 14 puderam ser identificados em nível

de espécie, e 13 foram identificados apenas em nível de gênero, contudo, com diferenças suficientes para afirmar que estes esporos não pertenciam às mesmas espécies. A incapacidade de se identificar alguns esporos em nível de espécies foi devida ao estado de degradação da maioria dos esporos coletados, com alterações destas estruturas inviabilizando a classificação morfológica das paredes dos esporos e germinativas.

A identificação das espécies de FMAs baseada na avaliação de esporos coletados no campo pode apresentar problemas, uma vez que a esporulação é dependente de características particulares de cada espécie e sua interação com o ambiente, além de que os esporos obtidos de uma amostra de campo podem se apresentar em processo de decomposição, o que dificulta a análise (RODRÍGUES-ECHEVERRÍA & FREITAS, 2006).

As espécies identificadas por meio das características morfológicas dos esporos presentes nas áreas de estudo estão representadas na tabela 4 com as respectivas áreas as quais foram coletadas.

A frequência com que cada espécie de FMA foi encontrada em Nova Porteirinha associada com os acessos avaliados, variou de 2,3 % (*Archaeospora trappei*, *Glomus etunicatum*, *Glomus* sp, *Glomus* sp 7 e *Glomus* sp 10) até 93 % (*Acaulospora morrowiae*) (tabela 4).

Além das diferentes frequências apresentadas entre as espécies de FMAs, o número destas espécies associados aos acessos também apresentou variação (Tabela 5). Entretanto, maior número de espécies encontradas por acesso não refletiu em maiores quantidades de esporos no solo ou em maiores percentagens de colonização micorrízica (tabela 2). No entanto, sabendo-se que a composição da vegetação pode afetar a diversidade de FMAs (JOHNSON *et al.*, 2003), sugere-se que materiais genéticos distintos de uma mesma espécie possam proporcionar efeitos semelhantes.

Esta variação entre os acessos de pinhão-manso quanto ao número de espécies pode ser atribuída à distribuição espacial desuniforme dos FMAs ou à influência dos exsudados radiculares, dos diferentes acessos avaliados na comunidade destes simbioses.

Tabela 4- Fungos Micorrízicos Arbusculares encontrados em rizosfera de pinhão-mansão nas áreas de (Vi.) Viçosa, (Ca.) Canaã e (N.P.) Nova Porteirinha e a frequência com que as espécies foram identificadas nos acessos avaliados em Nova Porteirinha.

Espécies de FMAs	Vi.	Ca.	N. P.	Frequência N. P. (%)
<i>Acaulospora delicata</i> (Walker, Pfeiffer & Bloss)	+	-	+	18,6
<i>Acaulospora excavata</i> (Ingleby & Walker)	-	-	+	9,3
<i>Acaulospora mellea</i> (Spain & Schenck)	-	+	+	74,4
<i>Acaulospora morrowiae</i> (Spain & Schenck)	-	-	+	93
<i>Acaulospora paulinae</i> (Blaszkowski)	+	-	-	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i> (Trappe)	+	-	+	25,6
<i>Acaulospora sp</i>	-	-	+	4,6
<i>Acaulospora walkeri</i> (Kramadibrata & Hedger)	-	-	+	9,3
<i>Archaeospora trappei</i> (Ames & Linderman) Morton & Redecker	-	-	+	2,3
<i>Glomus diaphanum</i> (Morton & Walker)	+	+	+	69,8
<i>Glomus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann)	+	-	+	2,3
<i>Glomus mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe	+	-	+	4,6
<i>Glomus sp</i>	-	-	+	2,3
<i>Glomus sp 1</i>	+	-	-	-
<i>Glomus sp 2</i>	+	+	+	72,1
<i>Glomus sp 3</i>	+	+	-	-
<i>Glomus sp 4</i>	+	-	-	-
<i>Glomus sp 5</i>	+	+	-	-
<i>Glomus sp 6</i>	-	+	+	7
<i>Glomus sp 7</i>	-	+	+	2,3
<i>Glomus sp 8</i>	-	-	+	34,9
<i>Glomus sp 9</i>	-	-	+	11,6
<i>Glomus sp 10</i>	-	-	+	2,3
<i>Glomus viscosum</i> (Nicol.)	+	-	-	-
<i>Pacispora sp</i>	-	-	+	72,1
<i>Paraglomus occultum</i> (Walker) Morton & Redecker	+	-	+	7
<i>Scutellospora pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	+	+	+	4,6

(+) presença da espécie na área; (-) ausência da espécie na área.

Tabela 5- Número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares presentes no solo sob a copa de pinhão-manso pertencentes ao banco de germoplasma da Epamig localizada no município de Nova Porteirinha/MG.

Acesso	Ac. 01	Ac. 02	Ac. 03	Ac. 04	Ac. 05	Ac. 06	Ac. 07	Ac. 08	Ac. 09	Ac. 10	Ac. 11
espécies/acesso	7	6	6	5	7	5	4	4	5	5	7
Acesso	Ac. 14	Ac. 15	Ac. 16	Ac. 17	Ac. 18	Ac. 19	Ac. 20	Ac. 21	Ac. 22	Ac. 23	Ac. 24
espécies/acesso	4	7	4	6	5	4	3	5	5	2	6
Acesso	Ac. 25	Ac. 26	Ac. 27	Ac. 28	Ac. 29	Ac. 30	Ac. 31	Ac. 32	Ac. 34	Ac. 35	Ac. 36
espécies/acesso	6	5	4	8	6	6	5	4	6	8	6
Acesso	Ac. 37	Ac. 38	Ac. 40	Ac. 42	Ac. 43	Ac. 44	Ac. 45	Ac. 46	Ac. 47	Ac. 48	
espécies/acesso	6	5	6	6	4	2	8	7	5	3	

(Ac) acesso

O fato de um acesso com menor número de espécies de FMAs na rizosfera da planta não apresentar redução quanto ao número de esporos e a percentagem de colonização micorrízica pode estar relacionado às características de FMAs considerados mais especialistas na colonização de plantas em comparação com as espécies mais generalistas (OEHL *et al.*, 2010) que, por sua vez, devem apresentar menor competitividade em relação à colonização das plantas. Para melhor correlacionar as espécies encontradas no solo com as localizadas nas raízes das plantas, bem como com a proporção com que cada uma está presente no sistema radicular, a identificação destes fungos dentro da raiz se torna necessária. Tal procedimento já foi realizado por outros autores (ÖPIK, *et al.*, 2003; RENKER *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-GARCIA *et al.*, 2011), mas até então não há relatos de trabalhos com este foco envolvendo plantas de pinhão-manso.

### 4.3. Diversidade de FMAs avaliadas por ferramentas moleculares

A extração de DNA do solo e dos esporos de FMAs utilizados como marcadores de referência foi realizada com sucesso. Na primeira reação de PCR utilizando-se o par de *primers* AM1/NS31, apenas foi possível a visualização de bandas em gel de agarose (0,8 %) correspondentes aos

FMA's utilizados como marcadores de referência, provavelmente, devido à maior concentração de DNA pertencente ao filo Glomeromycota, livres de outros contaminantes.

Contudo, a partir da diluição dos produtos desta primeira rodada de amplificações e a subsequente amplificação destes produtos com o par de *primers* Glo1/NS31-GC (*nested-PCR*), resultou na obtenção de produtos de PCR de tamanho esperado (cerca de 230 pb) em todas as amostras, como observado por Cornejo *et al.* (2004) e Liang *et al.* (2008). Os produtos da segunda amplificação foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

#### **4.3.1. Análise das espécies de FMA's marcadoras de referência por PCR-DGGE**

Os produtos obtidos por *nested-PCR* gerou um perfil de diversas bandas no gel de DGGE característico para cada espécie de referência analisada, em uma escala de gradiente de desnaturação variando de 36 a 50 % (figura 3). O resultado confirma o polimorfismo dos genes 18S rDNA destes micro-organismos (ÖPIK *et al.*, 2003; RENKER *et al.*, 2005). Comportamento semelhante foi observado por Liang *et al.* (2008) trabalhando com as espécies marcadoras *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* e *Scutellospora heterogama*. O perfil de múltiplas bandas apresentadas em todas as espécies representa um fator de dificuldade para se inferir sobre a identificação em nível de espécie destes micro-organismos em amostras de campo por comparação entre os perfis de migração das bandas no DGGE, uma vez que a posição de muitas bandas no gel de acrilamida é coincidente e várias espécies diferentes são encontradas em campo (figura 3).

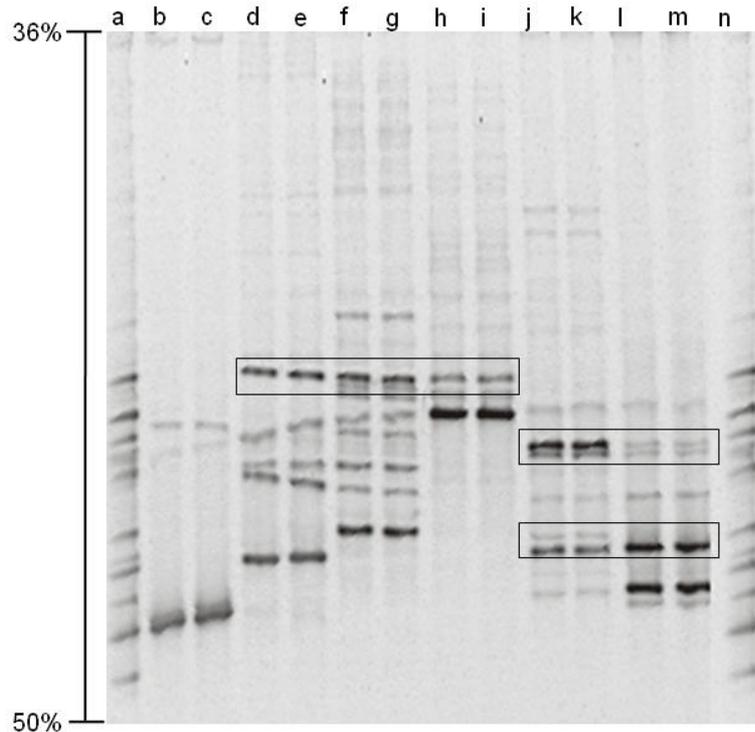


Figura 3. Perfil de bandas dos fragmentos correspondentes ao rDNA 18S das espécies de FMA utilizadas como marcadores de referência obtidos pela técnica de DGGE. Gel com gradiente desnaturante 36-50 %. Colunas a, n: mistura dos marcadores; colunas b, c: *Glomus clarum*; colunas d, e: *Gigaspora albida* | PRN201A |; colunas f, g: *Gigaspora decipiens* | SCT304A |; Colunas h, i: *Scutellospora heterogama* | PNB102A |; Colunas j, k: *Acaulospora koskei* | SCT406A |; Colunas l, m: *Acaulospora tuberculata* | SCT250B |. Os retângulos demonstram exemplos de algumas bandas com perfil de migração idêntico, mesmo pertencendo a espécies diferentes.

No entanto, o perfil de bandas diferiu entre as espécies marcadoras de referência, apresentando, no gel, uma distribuição características para cada espécie analisada. A reprodutibilidade para cada espécie indica que o gradiente foi corretamente formado e a metodologia utilizada obteve sucesso na separação dos fragmentos 18S do rDNA para FMAs.

Algumas bandas predominantes nos perfis das espécies utilizadas como referência foram eluídas e sequenciadas. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLASTn (NCBI) o que revelou se tratar das espécies identificadas por técnicas morfológicas, ou pelo menos a identificação da mesma família, o que pode ser reflexo que estes micro-

organismos apresentam um menor número de sequências depositadas no *GenBank* (tabela 6).

Tabela 6- Identidade das bandas selecionadas e eluídas do gel de DGGE das espécies-referência de fungos micorrízicos arbusculares.

Posição da banda no Gel	Correspondência mais próxima no <i>GenBank</i> (% de similaridade pelo BLAST)	código de acesso no <i>GenBank</i>
B3	<i>Glomus clarum</i> (99 %)	AJ852597.1
D5	<i>Gigaspora</i> sp (98 %)	EF447242.1
G5	<i>Gigaspora decipiens</i> (100 %)	AY641812.1
H2	<i>Scutellospora heterogama</i> (100 %)	NG_017177.1
K2	<i>Acaulospora</i> sp (96 %)	AY919854.1
M5	<i>Acaulosporaceae</i> (98 %)	GU198548.1

Os códigos B3, D5, G5, H2, K2, M5, indicam a coluna e a posição na mesma das bandas eluídas do gel apresentado na figura 3.

Na avaliação da separação das bandas dos fragmentos dos genes 18S rDNA para outras espécies estudadas, utilizando TTGE, Cornejo *et al.* (2004) também verificaram a presença no padrão de formação de múltiplas bandas para *Glomus viscosum*. Esse polimorfismo apresentado entre esporos da mesma espécie pode ocorrer, também, no interior de um único esporo (CLAPP *et al.*, 1999; SCHÜßLER *et al.*, 2001; RENKER, *et al.*, 2005), tal característica pode ser explicada pelo fato de que um esporo pode conter milhares de núcleos e eventualmente alguns podem sofrer algumas modificações nestes genes em questão (SANDERS & CROLL, 2010). De Souza *et al.* (2004) argumentaram que o polimorfismo entre as cópias de um mesmo gene no genoma pode ser uma opção para se diferenciar espécies estreitamente relacionadas. A utilização da técnica do PCR-DGGE aplicadas a estas regiões pode fornecer impressão digital molecular detalhada e adequada que pode ser usada na avaliação da pureza de espécies em coleções de cultura de FMAs (NOVAIS *et al.*, 2010).

Apesar da característica polimórfica dos genes rDNA 18S em FMAs a técnica de DGGE provê uma boa estimativa da estrutura da comunidade destes fungos no solo em estudos ecológicos (ÖPIK *et al.*, 2003).

#### **4.3.2. Análise da estrutura da comunidade de FMAs nas amostras de solo por PCR-DGGE**

A técnica de *nested* PCR utilizando-se o par de *primers* Glo1/NS31-GC resultou na obtenção de fragmentos de DNA correspondentes à sequência parcial do rDNA 18S em todas as amostras analisadas. Os perfis de separação das bandas destes fragmentos nos géis de DGGE são apresentados na figura 4.

O padrão diferenciado na distribuição das bandas foi observado nas amostras de cada região. Os posicionamentos das bandas obtidas das amostras de Viçosa foram diferentes entre si, da mesma forma como ocorrido com as amostras de Canaã. Esta característica pode estar relacionada à distribuição desigual dos FMAs, devido à maior heterogeneidade do solo, relacionadas à composição físico-química e relevos mais desuniformes.

Por sua vez, mesmo que as amostras obtidas em cada acesso de pinhão-mansão em Nova Porteirinha tenham apresentado diferenças quanto à presença ou ausência de algumas espécies de FMAs previamente identificadas na avaliação morfológica, o padrão de distribuição das bandas nos géis de DGGE, foi bastante homogêneo, com a presença de bandas dominantes na mesma posição (figura 4). Vale, no entanto, ressaltar que para identificação morfológica foram utilizados 100 cm<sup>3</sup> de solo, enquanto que para análises moleculares utilizou-se apenas 1g, o que certamente dificultaria a identificação de espécies de FMAs menos abundantes.

Um fator que pode influenciar a análise da comunidade de FMAs com a visualização das bandas nos géis do DGGE para cada amostra analisada é a especificidade do *primer* AM1 que é específico para as ordens Glomerales e Diversisporales e não específico para Archaeosporales e Paraglomerales (MA, *et al.*, 2005). Isto contribui para subestimar a avaliação da diversidade de FMAs nos campos avaliados, uma vez que representantes destas ordens foram identificados por análises morfológicas em nossos estudos. Uma série de *primers* está sendo desenhada para resolver estes problemas, no entanto, eles ainda não foram exaustivamente testados por

muitos pesquisadores para aumentar sua confiabilidade quanto ao grau de especificidade para os FMAs (GASPAROTTO *et al.*, 2010).

Apesar de algumas variáveis interferirem nas análises moleculares de comunidades microbianas do solo é possível realizar uma comparação entre a composição das comunidades destes micro-organismos nas áreas em estudo com o auxílio do programa Bionumeric, que realiza análises de agrupamento comparando quantidade, intensidade e posicionamento das bandas nos géis (figura 5).

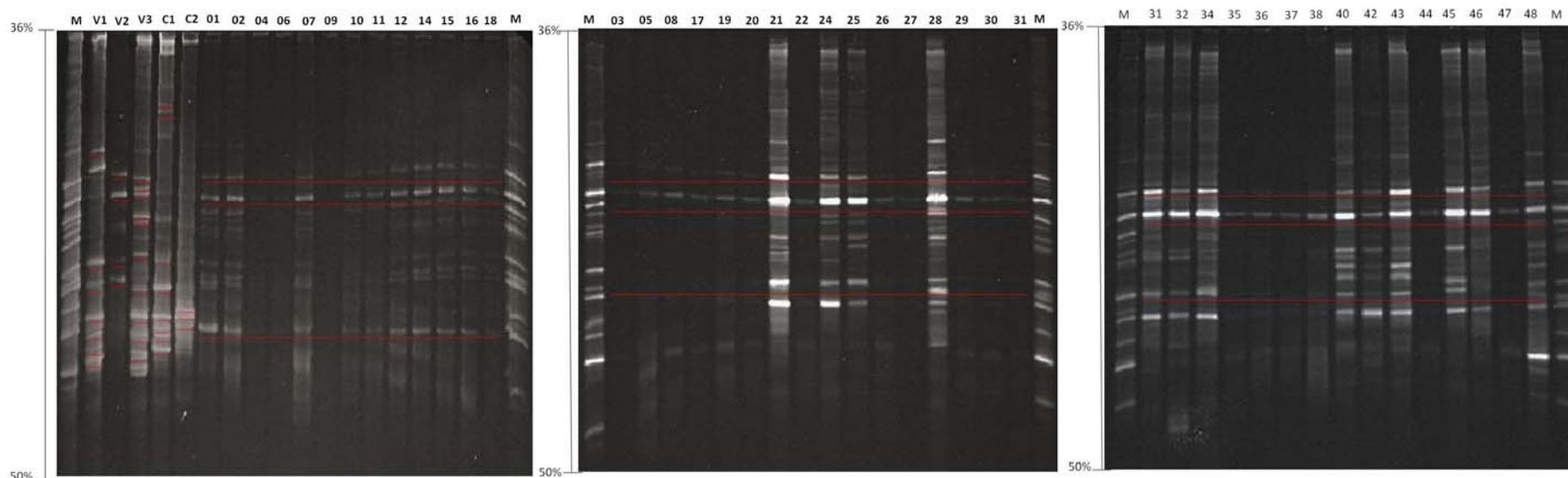


Figura 4- Perfis de bandas dos fragmentos dos genes 18S do rDNA de FMAs encontrados no solo das áreas coletadas de Viçosa, Canaã e nos solos dos diferentes acessos do Banco de Germoplasma da Epamig, Nova Porteirinha, obtidos pela técnica de DGGE. Gel com gradiente desnaturante 36-50%. M: Mistura dos marcadores de referência. V: amostras coletadas em Viçosa. C: amostras coletadas em Canaã. 01 a 48 números de identificação de cada acesso coletado em Nova Porteirinha/MG. As bandas sublinhadas pelas linhas vermelhas indicam as bandas que foram eluídas, amplificadas em PCR, sequenciadas e analisadas pelo BLASTn.

O agrupamento realizado demonstrou que as populações de FMAs apresentam maior semelhança entre os acessos que foram obtidos nas mesmas regiões ou regiões próximas, o que demonstra que, em uma mesma área, plantas de pinhão-manso com características genéticas distintas, podem ser um fator que influencia diretamente a população de FMAs no solo rizosférico. Da mesma forma, as amostras Canaã 01 e 02 e as de Viçosa 01 e 03 formaram um agrupamento mais próximo, indicando que o material genético de mesma procedência ocorrendo em regiões razoavelmente distantes, porém, com condições edafoclimáticas semelhantes, resulta em comunidades de FMAs análogas na rizosfera de pinhão-manso.

Contudo, para realização destas análises, o preparo das amostras é de fundamental importância, por haver a possibilidade de ocasionar a diluição do número de esporos de FMAs, em razão de sua distribuição desigual nos solos (SMITH & READ, 1997). Tal fato pode ter ocorrido com a amostra Viçosa 02, que não agrupou com as demais amostras da mesma área.

Como o perfil de bandas foi gerado por material coletado diretamente da rizosfera e os esporos de FMAs formam múltiplas bandas no gel do DGGE, o número de FMAs encontrados no campo, representados pelas bandas do gel, pode ser representativo de menos da metade destes micro-organismos presentes na área (MA *et al.*, 2005). Além disso, como fragmentos de rDNA de populações menos abundantes podem apresentar mesmas posições no do gel que fungos de populações maiores, o que pode mascarar a presença de algumas populações de FMAs nestas áreas (KOWALCHUK *et al.*, 2002).

No entanto, esta estratégia permite rápidas comparações entre as comunidades de FMAs de diversas regiões e a análise de múltiplas amostras ao mesmo tempo, sem a necessidade de cultivo destes fungos em plantas hospedeiras, tornando-se uma boa ferramenta para estudos ecológicos destes micro-organismos (KOWALCHUK *et al.*, 2002). Além disso, quando comparada com outros métodos moleculares, a técnica de PCR-DGGE apresenta-se como uma metodologia rápida, fácil e menos onerosa (DE SOUZA *et al.*, 2004).

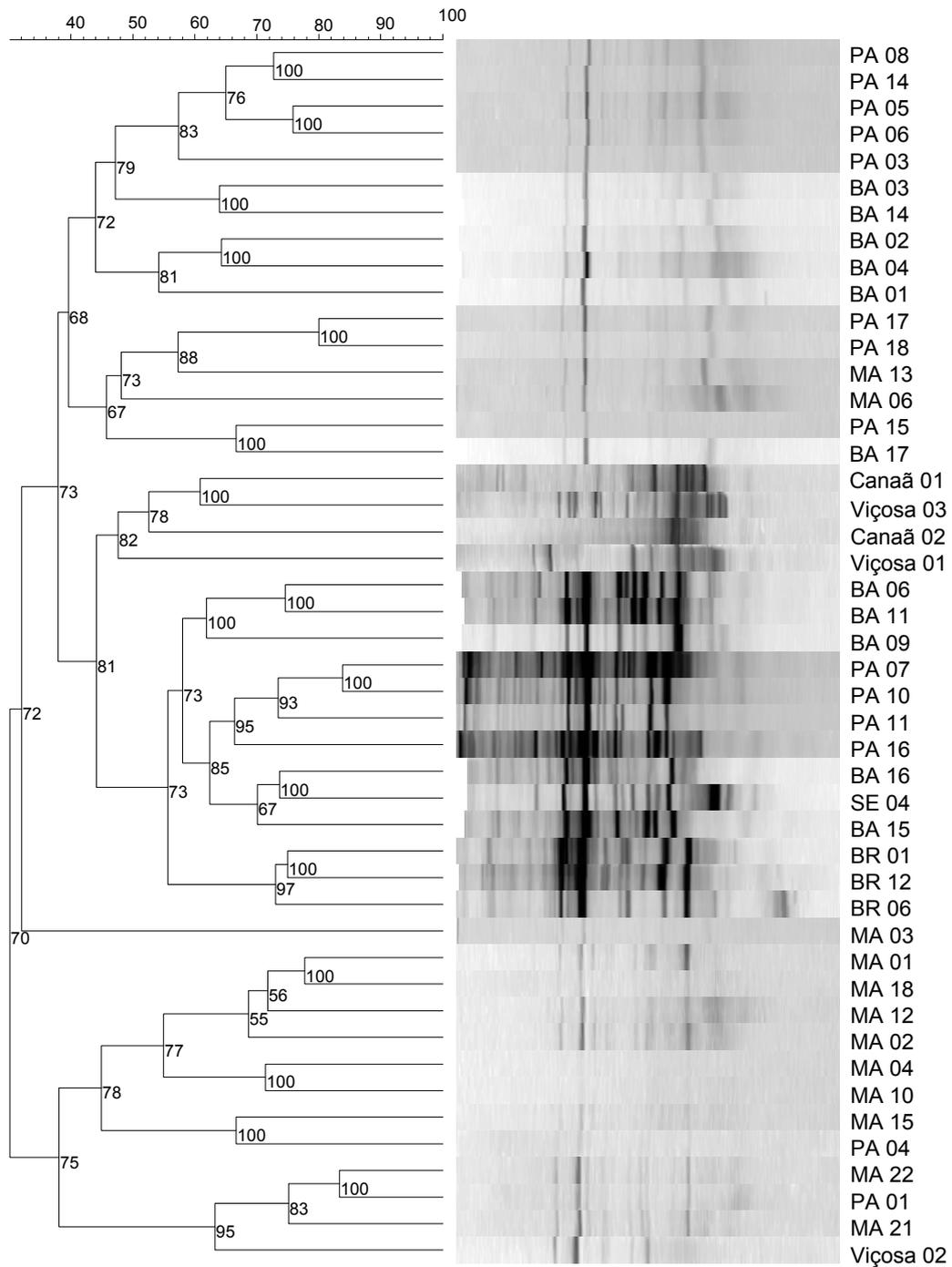


Figura 5- Dendrograma representando a distância e o padrão de bandas correspondentes ao gene 18S rDNA obtido pela técnica de PCR-DGGE das amostras de solo de Viçosa, Canaã e de todos os acessos de pinhão-manso coletados no Banco de Germoplasma da Epamig, Nova Porteirinha/MG. A escala mostra semelhanças entre o padrão de bandas. Os números indicam a correlação cofenética, que são estimativas da fidelidade de cada subgrupo no dendrograma.

#### 4.3.3. Identificação das espécies de FMAs pelo sequenciamento das bandas eluídas do gel do DGGE

A partir da análise da sequência feita pela ferramenta BLASTn foi verificado valores de identidade variando de 81 a 100%, sendo que, a maioria apresentou média superior a 93% (tabela 7).

Um amplo número de representantes de FMAs pôde ser identificado após o sequenciamento dos fragmentos dos genes 18S do rDNA (*Gigaspora decipiens* Hall & Abbott, *Gigaspora gigantea* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe, *Glomus clarum* Nicol. & Schenck, *Scutellospora dipapillosa* (Walker & Koske) Walker & Sanders e *Scutellospora heterogama* (Nicol. & Gerdemann) Walker & Sanders), além dos identificados, pelo menos, em nível de gênero, aumentando a riqueza de espécies, em combinação com a análise morfológica até então encontradas na rizosfera de plantas de pinhão-mansão.

As espécies identificadas pelas análises moleculares diferiram da maioria das espécies identificadas pela análise morfológica, exceto, pelas espécies de *Glomus* que em ambas as metodologias, muitos representantes foram identificados apenas em nível de gênero. Esta diferença pode ser atribuída ao sequenciamento de apenas algumas bandas do gel de DGGE, ao reduzido número de esporos de algumas espécies encontradas em campo, à diluição dos esporos no momento da formação dos tratamentos (SMITH & READ, 1997) ou, ainda, à baixa especificidade do *primer* AM1 para algumas espécies de FMAs (MA *et al.*, 2005).

Algumas dificuldades em relação à eluição das bandas se referem ao variado número de bandas produzidas por uma mesma espécie e à elevada quantidade das mesmas em géis corridos com amostras de campo, o que oneraria o custo com sequenciamento se todas fossem analisadas. Além disto, a difícil visualização das bandas mais fracas no gel de DGGE sob luz UV infere que o número de bandas que poderiam ser amostradas para sequenciamento é menor que o número de bandas capturadas pelo sistema de captura de imagem utilizado.

A amplificação dos fragmentos dos genes 18S rDNA de FMAs utilizando o *primer* AM1 foi satisfatório. No entanto, houve também a amplificação de representantes de outros grupos de fungos, como

*Apotolamprus cyanescens*, *Carinispora nypae*, *Hepatozoon sp.* e *Lophiotrema brunneosporum*. Já foi relatado que este *primer* pode, também, amplificar fragmentos de alguns ascomicetos e basidiomicetos (HELGASON *et al.*, 1998; DOUHAN *et al.*, 2005). No entanto, em nosso trabalho foi identificado um oomiceto (*Pythium cylindrosporum*) com este *primer*. Contudo, com a estratégia de *nested*-PCR, que combina a especificidade parcial para FMAs do *primer* AM1 com o poder de resolução no gel de DGGE com o par de *primers* NS31-GC/Glo1 (CORNEJO *et al.*, 2004), é possível verificar um perfil das espécies de FMAs presentes na rizosfera de pinhão-manso.

O sequenciamento de bandas de uma mesma amostra, contudo em posições diferentes no gel indicou a presença de mesmas espécies como no caso de V1-3 e V1-4; V1-5 e V1-6; V2-1 e V2-2 (tabela 7), confirmando o polimorfismo dos fragmentos dos genes 18S rDNA dentro de mesmas espécies de FMAs como já relatado por outros autores (ÖPIK *et al.*, 2003; CORNEJO *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2008).

Bandas eluídas da mesma posição no gel, das amostras obtidas em diferentes acessos coletados em Nova Porteirinha, representaram, na maioria das vezes, espécies de FMAs relacionadas entre si, principalmente em nível de gênero (por exemplo; bandas 1 com 1, 2 com 2 ou 3 com 3 de cada acesso) (tabela 8).

Curiosamente, esporos de *Acaulospora* foram detectados constantemente pela avaliação morfológica, sem, no entanto, ter sido encontrado qualquer sequência, pela análise molecular, que apresentasse identidade com este gênero. Esse fato também foi relatado por Kowalchuk *et al.* (2002), o que pode ser atribuído à escolha de somente algumas bandas a serem sequenciadas, uma vez que neste mesmo trabalho, espécies marcadoras de referência apresentaram sequências identificáveis para estes micro-organismos, pelo menos em níveis de família e gênero.

Ainda que nem todas as bandas tenham, sido sequenciadas, os perfis dos géis obtidos e as análises preliminares das sequências sugerem que comunidades de FMAs nas três regiões analisadas, com condições edafoclimáticas diferentes, são distintas.

Tabela 7- Identidade das bandas selecionadas, eluídas dos géis de DGGE e sequenciadas das amostras obtidas em Viçosa, Canaã e para cada acesso avaliado na área de Nova Porteirinha.

Identificação da banda	Correspondência mais próxima no <i>GenBank</i> (% de identidade pelo BLASTn)	código de acesso no <i>GenBank</i>
V1-1	Uncultured <i>Glomus</i> clone NES17#G16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (94 %)	GU353935.1
V1-5	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, clone 30_14.S-NT (95 %)	AM412085.1
V1-6	Uncultured <i>Glomus</i> clone HDALG14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	GQ336527.1
V1-7	Uncultured <i>Glomus</i> clone HDALG14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	GQ336527.1
V1-8	<i>Glomus</i> sp. CH3263078 partial 18S rRNA gene, isolate CH3263078 (94 %)	FR690122.1
V1-10	<i>Glomus</i> sp. CH3263078 partial 18S rRNA gene, isolate CH3263078 (96 %)	FR690122.1
V2-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
V2-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (99 %)	AJ852609.1
V2-4	<i>Gigaspora decipiens</i> isolate DGGE band AU102-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (100 %)	AY641812.1
V2-5	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (100 %)	EF447242.1
V3-1	Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE band 123 14.c2.1.1.14c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	HQ323622.1
V3-2	Uncultured <i>Glomus</i> clone T22L1SP 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF177648.1
V3-3	Uncultured <i>Glomus</i> clone T22L1SP 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (94 %)	EF177648.1
V3-4	Uncultured <i>Glomus</i> clone K179c6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (95 %)	DQ336464.1
V3-5	Uncultured <i>Gigasporaceae</i> clone FVDWSEP01EB9KY 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (92 %)	GU198545.1
V3-6	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, isolate PS41G (81 %)	FM955850.1
V3-7	Uncultured <i>Glomus</i> clone G1C4A1Z 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (92 %)	EF177562.1
V3-10	Uncultured <i>Glomus</i> clone G10_2L2SP 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (93 %)	EF177547.1
V3-11	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (94 %)	AJ852609.1
V3-12	Uncultured <i>Glomus</i> clone HDAMG10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (89 %)	GQ340787.1
C1-1	Uncultured <i>Glomus</i> clone DNA62_3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	HM440265.1
C1-2	<i>Carinispora nypae</i> strain BCC 36316 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (92 %)	GU479749.1
C1-5	Uncultured <i>Glomus</i> clone K230c5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (89 %)	DQ336521.1
C1-7	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, isolate PS41G (94 %)	FM955850.1
C1-8	Uncultured <i>Gigasporaceae</i> clone FVDWSEP01CE9TJ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (87 %)	GU198546.1
C1-9	<i>Lophiotrema brunneosporum</i> strain CBS 123095 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (89 %)	FJ795487.1
C1-10	Uncultured <i>Glomus</i> clone 14 group 5 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (93 %)	EF109875.1
C2-1	Uncultured <i>Gigasporaceae</i> clone FVDWSEP01EB9KY 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (91 %)	GU198545.1
C2-2	Uncultured <i>Glomus</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	DQ371697.1

Tabela 7- Continuação

Identificação da banda	Correspondência mais próxima no GenBank (% de identidade pelo BLASTn)	código de acesso no GenBank
Ac- 01-1	<i>Gigaspora gigantea</i> partial 18S rRNA gene, clone G-5 (90 %)	AM746154.1
Ac- 01-2	<i>Scutellospora heterogama</i> partial 18S rRNA gene, clone pWD163-2-6 (92 %)	AJ306434.1
Ac- 01-3	Uncultured <i>Glomus</i> clone NES01#D16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (90 %)	GU353768.1
Ac- 02-1	<i>Pythium cylindrosporium</i> isolate 275 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (94 %)	EU199112.1
Ac- 02-2	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (98 %)	NG_017177.1
Ac- 02-3	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, isolate PS41G (82 %)	FM955850.1
Ac- 03-1	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 03-2	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (99 %)	NG_017177.1
Ac- 03-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 05-1	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (99 %)	NG_017177.1
Ac- 05-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 05-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 07-2	?	?
Ac- 07-3	<i>Apotolamprus cyanescens</i> voucher Ara.cya.6.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	GQ341958.1
Ac- 08-1	Uncultured <i>Gigasporaceae</i> clone LES13#I21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	GU353712.1
Ac- 08-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 08-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (99 %)	EF447242.1
Ac- 09-2	<i>Scutellospora dipapillosa</i> rDNA for small subunit rRNA (87 %)	Z14013.1
Ac- 09-3	<i>Apotolamprus cyanescens</i> voucher Ara.cya.6.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	GQ341958.1
Ac- 10-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (94 %)	AJ852609.1
Ac- 10-3	Uncultured <i>Glomus</i> clone FVDWSEP01EPG8A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (85 %)	GU198598.1
Ac- 11-2	Uncultured <i>Glomus</i> clone NES34#D30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	GU353956.1
Ac- 11-3	<i>Glomus clarum</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE08 (93 %)	AJ852597.1
Ac- 12-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (99 %)	AJ852609.1
Ac- 12-3	<i>Glomus clarum</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE08 (100 %)	AJ852597.1
Ac- 13-2	<i>Glomus clarum</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE08 (100 %)	AJ852597.1
Ac- 13-3	?	-
Ac- 17-1	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (99 %)	NG_017177.1
Ac- 17-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 17-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1

Tabela 7- Continuação

Identificação da banda	Correspondência mais próxima no GenBank (% de identidade pelo BLASTn)	código de acesso no GenBank
Ac- 19-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 19-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 19-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 20-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 20-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 20-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 21-1	Uncultured <i>Gigasporaceae</i> clone LER04#P36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (93 %)	GU353463.1
Ac- 21-2	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (100 %)	NG_017177.1
Ac- 21-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1
Ac- 21-4	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (99 %)	EF447242.1
Ac- 22-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 22-2	<i>Hepatozoon</i> sp. CCS-2010 isolate V9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (92 %)	HM585204.1
Ac- 22-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 24-1	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (99 %)	NG_017177.1
Ac- 24-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (95 %)	AJ852609.1
Ac- 24-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 24-4	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (99 %)	EF447242.1
Ac- 25-1	<i>Scutellospora heterogama</i> partial 18S rRNA gene, clone pWD163-2-6 (96 %)	AJ306434.1
Ac- 25-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (99 %)	AJ852609.1
Ac- 25-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 26-1	<i>Scutellospora heterogama</i> partial 18S rRNA gene, clone pWD163-2-6 (97 %)	AJ306434.1
Ac- 26-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (92 %)	AJ852609.1
Ac- 26-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 27-1	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (96 %)	NG_017177.1
Ac- 27-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (99 %)	AJ852609.1
Ac- 27-3	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (96 %)	NG_017177.1
Ac- 27-4	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (95 %)	NG_017177.1
Ac- 28-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 28-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 28-3	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (92 %)	NG_017177.1

Tabela 7- Continuação

Identificação da banda	Correspondência mais próxima no GenBank (% de identidade pelo BLASTn)	código de acesso no GenBank
Ac- 29-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 29-2	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1
Ac- 29-3	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (95 %)	NG_017177.1
Ac- 30-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 30-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 30-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1
Ac- 31-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (93 %)	AJ852609.1
Ac- 31-2	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (97 %)	NG_017177.1
Ac- 31-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1
Ac- 32-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 32-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 32-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 34-1	<i>Scutellospora heterogama</i> partial 18S rRNA gene, clone pWD163-2-6 (97 %)	AJ306434.1
Ac- 34-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (95 %)	AJ852609.1
Ac- 34-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 35-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 35-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (93 %)	AJ852609.1
Ac- 35-3	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (91 %)	NG_017177.1
Ac- 36-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 36-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 36-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (99 %)	EF447242.1
Ac- 37-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 37-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 37-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 38-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 38-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (99 %)	AJ852609.1
Ac- 38-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (98 %)	EF447242.1
Ac- 40-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 40-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 40-3	Uncultured <i>Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1

Tabela 7- Continuação

Identificação da banda	Correspondência mais próxima no <i>GenBank</i> (% de identidade pelo BLASTn)	código de acesso no <i>GenBank</i>
Ac- 44-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 44-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 44-3	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 45-1	<i>Scutellospora heterogama</i> partial 18S rRNA gene, clone pWD163-2-6 (98 %)	AJ306434.1
Ac- 45-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (100 %)	AJ852609.1
Ac- 45-3	<i>Uncultured Gigasporaceae</i> clone FVDWSEP01EB9KY 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96%)	GU198545.1
Ac- 46-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (98 %)	AJ852609.1
Ac- 46-2	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (96 %)	AJ852609.1
Ac- 46-3	<i>Uncultured Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (94 %)	EF447242.1
Ac- 47-1	<i>Scutellospora heterogama</i> strain INVAM FL225 18S ribosomal RNA, partial sequence (98 %)	NG_017177.1
Ac- 47-3	<i>Uncultured Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (97 %)	EF447242.1
Ac- 48-1	<i>Scutellospora heterogama</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE19 (97 %)	AJ852609.1
Ac- 48-3	<i>Uncultured Gigaspora</i> clone K15c2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (96 %)	EF447242.1
Ac- 48-4	<i>Glomus clarum</i> 18S rRNA gene, isolate UFPE08 (96 %)	AJ852597.1

Obs: O último número de cada identificação indica a ordem (de cima para baixo) das bandas eluídas em cada amostra (Bandas sublinhadas na figura 4). Os nomes em vermelho indicam a presença de fungos não-micorrizicos.

#### 4.4. Considerações finais sobre a diversidade de FMAs em plantios de pinhão-manso

A avaliação da diversidade de FMAs presentes na rizosfera de plantas de pinhão-manso nas três áreas estudadas possibilitou a identificação de 19 espécies diferentes destes fungos, sendo 14 identificadas por características morfológicas e as 5 restantes pelo sequenciamento dos fragmentos dos genes 18S do rDNA, além de vários indivíduos classificados apenas em nível de gênero, totalizando 7 gêneros.

O gênero *Glomus* foi o que mais se destacou na avaliação morfológica, enquanto que os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* prevaleceram na identificação pela análise molecular. Tal predominância de esporos de *Glomus* pode estar ligada à sua versátil propagação e estratégias de sobrevivência (LIANG *et al.*, 2008). Além destes, foram encontrados os gêneros *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Pacispora* e *Paraglomus* na rizosfera desta planta. A diversidade de FMAs é um fator chave para melhorar a sustentabilidade em diversos ecossistemas, principalmente aqueles relacionados a baixas condições de fertilidade (MA *et al.*, 2005). Somando-se esta característica à dependência desta planta pela associação micorrízica (CARVALHO, 2008), favorece para que o pinhão-manso possa ser cultivado no mais diversos habitats.

Apenas a quantidade relativa dos esporos de FMAs presentes no solo não reflete sua importância funcional, ou seja, não permite inferir sobre a intensidade de colonização micorrízica ou sobre a distribuição das hifas no solo (DOUDS Jr. & MILLNER, 1999). Contudo, esta informação nos permite a realização de estudos, a fim de compreender a composição destas populações de fungos e acompanhar sua alteração em decorrência de eventuais distúrbios ambientais ou antrópicos.

Até o momento, não há relatos sobre a descrição das espécies de FMAs presentes na rizosfera de plantas de pinhão-manso. Este é um passo fundamental para compreensão da dinâmica e influência destes fungos sobre esta espécie de planta em nível de campo. Contudo, pelo fato da diversidade de espécies de FMAs presentes no solo poder diferir da diversidade de espécies que colonizam o sistema radicular das plantas em

um determinado momento (MARTÍNEZ-GARCIA *et al.*, 2011) a próxima etapa do estudo é realizar uma avaliação da diversidade destes fungos associados ao sistema radicular de pinhão-manso e analisar a influência de cada espécie de FMA sobre o pinhão-manso em cada região na qual a planta é cultivada.

Nossos estudos revelaram que, a região de Nova Porteirinha, caracterizada pelo clima semiárido, apresentou maior diversidade de espécies destes micro-organismos na rizosfera de pinhão-manso quando comparada às regiões de Viçosa e Canaã. Tal fato pode estar relacionado à maior diversidade de plantas presentes em locais com regiões de clima semiárido apresentando características de maior dependência da associação micorrízica, como relatado por Tao & Zhiwei (2005).

## 5. Conclusões

- O gênero *Glomus* parece ser o mais abundante em número de espécies entre os FMAs na rizosfera de pinhão-manso nas áreas estudadas.
- Plantas de pinhão-manso ocorrendo em regiões distantes, porém, com condições edafoclimáticas semelhantes, possuem populações de FMAs semelhantes próximas às raízes.
- Plantas de pinhão-manso de diferentes acessos podem influenciar a composição da comunidade de FMAs no solo rizosférico em uma mesma área.
- A utilização em conjunto das metodologias morfológica e molecular fornece informações mais completas a respeito da diversidade de FMAs presentes na rizosfera das plantas em campo.
- Plantas de pinhão-manso, independente da comunidade de FMAs presentes na área de cultivo, apresentam elevada percentagem de colonização micorrízica, bem como, relativa abundância no número de esporos na rizosfera desta planta.

## 6. Referências Bibliográficas

ACHTEN, W.M.J., VERCHOR, L. FRANKEN, Y.J., MATHIJS, E., SINGH, V.P., AERTS, R., MUYS, B. *Jatropha* Bio-diesel production and use. Biomass and Bioenergy. 32: 1063-1084. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL e BIOCOMBUSTÍVEL - ANP. Biodiesel- introdução, 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=17680&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1271697765734>. Acesso em 8 de fev. 2010.

ALEJO-ITURVIDE, F., MÁRQUEZ-LÚCIO, M.A., MORALES-RAMIRAS, I., VAZQUEZ-GARCIDUEÑAS, M. S., OLALDE-PORTUGAL,V. Mycorrhizal protection of chili plants challenge by *Phytophthora capsici*. Eur. J. plant Oathol., 120: 13-20, 2008.

APOSTOLAKOU, A.A., KOOKOS, I.K., MARAZIOTI, C., ANGELOPOULOS, K.C. Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils. Fuel Processing Technology. 90: 1023- 1031, 2009.

ARRUDA, F.P., BELTRÃO, N.E.M., ANDRADE, A.P., PEREIRA, W.E., SEVERINO, L.V. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras, 8: 789-799, 2004.

AUGÉ, R.M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Mycorrhiza* 11: 3–42. 2001.

ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA do ESTADO de MINAS GERAIS. Disponível <<http://www.almg.gov.br/index.asp?grupo=estado&diretorio=munmg&arquivo=municipios&municipio=11705>> . Acesso em 02 de jun. de 2010.

AZCÓN-AGUILAR, C., BAREA J.M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an Overview of the Mechanisms Involved. *Mycorrhiza*, 6, 457–64, 1996.

AZCÓN-AGUILAR, C., CANTOS, M.; TRONCOSO, A.; BAREA, J. M. Beneficial effect arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Sci. Hort.*, 72:63-71, 1997.

BEHERA, S.K., SRIVASTAVA, P., TRIPATHI, R., SINGH, J.P., SINGH, N. Evaluation of plant performance of *Jatropha curcas* L. under different agro-practices for optimizing biomass- A case study. *Biomass and Bioenergy*. 34: 30-41, 2010.

BERBARA, R.L.L.; SOUZA, F.A.; FONSECA, H.M.A.C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição; In: *Nutrição Mineral de Plantas*. Fernandes, M.S. (Ed.). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432p.

BRASIL. Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, 14 de janeiro de 2005; 184º da Independência e 117º da República. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)>. Acesso em 20 de out. 2008.

BRUNDRETT, M; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph*, 374p. 1996.

CARVALHO, A.M.X. Fungos Micorrízicos Arbusculares no crescimento de mudas de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Viçosa-MG, 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

CLAPP, J.P.; YOUNG, J.P.W.; MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259–265.1995.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 458-460, 1975.

CORNEJO, P., AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M., FERROL, N. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 241: 265-270. 2004.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*. 35: 4661-4670, 2007.

DE SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; VEEN, J.A. van; SMITH, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity in an arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied Environmental Microbiology*. 70:1413-1424, 2004.

DOUDS Jr, D.D.; MILLNER, P.D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 77-93. 1999.

DOUHAN, G.W.; PETERSEN, C.; BLEDSOE, C.S.; RIZZO, D.M. Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15: 365-372. 2005.

DRUMOND, M.A.; SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; MARTINS, J.C.; ANJOS, J.B.; EVANGELISTA, M.R.V. Desempenho agrônômico de genótipos de pinhão manso no semiárido pernambucano. *Ciência Rural*. Santa Maria. 40: 44-47. 2009.

PHYLOGENY AND TAXONOMY OF GLOMEROMYCOTA ('arbuscular mycorrhizal (AM) and related fungi') Disponível em: <http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/>. Acesso em 10 de jan. 2011.

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*. 39:887-894. 2004.

GASPAROTTO, F.A.; NAVARRETE, A.A.; DE SOUZA, F.A.; TSAI, S.M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de micorrizas. In: SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. 1ª Ed. P. 716. 2010.

GERDEMAN, J.W. & NICHOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235-244, 1963.

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

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

HELLER J. *Physic nut. Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Gatersleben, Germany/Rome, Italy: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/International Plant Genetic Resources Institute; 1996.

HO I. Vesicular arbuscular mycorrhizae of halophytic grasses in the Alvord desert of Oregon. *Northwest Science*, 61, 148- 151. 1987.

HOOKER, J. E.; GIANINAZZI, S.; VESTBERG, M.; BAREA, J. M.; ATKINSON, D. The applications of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagated systems: an opportunity to reduce inputs. *Agricultural Science in Finland, Jokioinen*, 3:227-232, 1999.

INVAM- International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponível em: < <http://invam.caf.wvu.edu/>>. Acesso em 03 de set. de 2010.

JANUAN, J. & ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10.1016/j.rser.2009.12.011.

JONGSCHAAP, R.E.E., CORRE, W.J., BINDRABAN, P.S., BRANDENBURG, W.A. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. *Plant Research International Report*, Wageningen; p. 158. 2007.

JOHNSON, D., VANDENKOORNHUYSE, P.J., LEAKE, J.R., GILBERT, L., BOOTH, R.E., GRIME, J.P., YOUNG, J.P.W., READ, D.J., Plant communities

affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in

grassland microcosms. *New Phytol.* 161: 503–515. 2003.

KOWALCHUK, G.A., De SOUZA, F.A., VAN VEEN, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*. 11: 571-581. 2002.

KRAMADIBRATA, K.; WALKER, C.; SCHWARZOTT, D.; SCHÜBLER, A. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Annals of Botany*. 86: 21-27. 2000.

KOSKE, R. & GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA Mycorrhizas. *Mycological Research*. 92: 486-505. 1989.

LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. Novos Estudos, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/nec/n78/03.pdf>>. Acesso em 20 jan. 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*. 40: 956-966. 2008.

LOCATELLI, L.M.; VITOVSKI, C.A.; LOVATO, P.E. Sistema radicular de porta enxertos micropropagados de macieira colonizados com fungos micorrízicos arbusculares. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v37n9/13197.pdf>. Acesso em 25 set. 2008.

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

MAES, W.H., TRABUCCO, A., ACHTEN, W.M.J., MUYS, B. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy*, 33: 1481-1485. 2009.

MARTÍNEZ-GARCIA, L.B.; ARMAS, C.; MIRANDA, J.D.; PADILLA, F.M.; PUGNAIRE, F.I. Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology & Biochemistry*. 1-8. 2011.

McGONIGLE T P, MILLER M N. Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed sorts. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 263- 269. 1996.

MELO, J. C., et al. Avaliação preliminar do potencial do pinhão-mansão para a produção de biodiesel. Recife, 2006. Disponível em:< <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Preliminar20.pdf> >. Acesso em: 12 de mar. de 2010.

MOREIRA, M.; NOGUEIRA, M.A.; TSAI, S.M. Sporulation and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil pine in the field and in the greenhouse. *Mycorrhizal*. 17: 519-526. 2007.

MORTON, J.B., BENTIVENGA, S.P. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. *Plant Soil* 159: 47–59. 1994.

MUTHUKUMAR, T & UDAIYAN, K. Seasonality of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sedges in a semi-arid tropical grassland. *Acta Oecologica* 23: 337–347. 2002.

NOVAIS, C.B.; DE SOUZA, F.A. SIQUEIRA, J.O. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em

banco de germoplasma. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.8, p.806-896, ago. 2010.

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

OPENSHAW, K. A Review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19: 1-15. 2000.

ÖPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; KÕLJALG, U.; ZOBEL, M.; SEN, R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist*. 160: 581–593. 2003.

PORRAS-SORIANO, A.; SORIANO-MARTÍN, M. L.; PORRAS-PIEDRA, A.; AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology*. 166: 1350-1359. 2009.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, J. G. D. compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências do solo*, 30: 413-424. 2006.

POZO, M. J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J., M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(368): 525-534, 2002.

POZO, M., AZCOÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 393-398. 2007.

PROGRAMA NACIONAL de PRODUÇÃO e USO do BIODIESEL- PNPB. O Biodiesel, 2008. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/>>. Acesso em: 03 de fev. 2010.

REDDY, S.R.; PINDI, P.K.; REDDY, S.M.; Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. *Current Science*, 89: 1699-1709. 2005.

RENKER, C.; BLANKE, V.; BUSCOT, F. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135: 255–266. 2005.

RODRÍGUES-ECHEVERRÍA, S., FREITAS, H. Diversity of AMF associated with *Ammophila arenaria* ssp. *Arundinacea* in portuguese sand dunes. *Mycorrhiza*. 16: 543-552. 2006.

SANDERS I.R.; CROLL, D. Arbuscular Mycorrhiza: The challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annu. Rev. Genet.* 44: 271–92. 2010.

SCHMOOK, B. & L. SERRALTA-PERAZA. *Jatropha curcas*: Distribution and uses in the Yucatan peninsula of México. In: G.M. GÜBITZ, M. MITTEMBACH, and M. TRABI (Eds). *Biofuels and Industrial products from Jatropha curcas*. Dbv-Verlag für die Technische Universität Graz, Graz, Austria, p. 53-57. 1997.

SCHENCK, N.C., PEREZ, Y. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*, 3rd ed. Synergistic Publications, Gainesville, FL, USA, 241 p. 1990.

SCHÜBLER, A., SCHWARZOTT, D., WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: Phylogeny and Evolution. *Mycol. Res.* 105(12): 1413-1421. 2001.

SCHÜBLER, A.; WALKER, C. The Glomeromycota: A species list with new families and new genera. 2010. Disponível em: <http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/>. Acesso em: 05 de jan. de 2011.

SHARMA, Y.C. & SINGH, B. Development of biodiesel: Current Scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 13: 1646-1651, 2009.

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

SMITH, S.E., FACELLI, E., POPE, S., SMITH, F.A. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Soil.* 326: 3-20. 2010.

SMITH, S.E., READ, D.J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Cambridge, MA. 605 p.

STUTZ, J., MORTON, J.B. Successive pot cultures reveal high species richness of indigenous arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Canad. J. Bot.* 74: 1883-1889. 1996.

TAO, L. & ZHIWEI, Z. Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Applied Soil Ecology* 29: 135–141. 2005.

UHLMANN, E.; GORKE, C.; PETERSEN, A.; OBERWINKLER, F. Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia. *Journal of Arid Environments* 64: 221–237. 2006.

VERMA, N., TARAFDAR, J.C., SRIVASTAVA, K.K., PANWAR, J. Arbuscular mycorrhizal (AM) diversity in *Prosopis cineraria* (L.) druce under arid agroecosystems. *Agricultural Sciences in China.* 7(6): 754-761. 2008.