

ADALBERTO ANTÔNIO SUKUMULA CHIQUETE

DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLOS DE FLORESTAS
PLANTADAS DE EUCALIPTO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C541d
2011

Chiquete, Adalberto Antônio Sukumula, 1976-
Diversidade de fungos em solos de florestas plantadas de
eucalipto / Adalberto Antônio Sukumula Chiquete. – Viçosa,
MG, 2011.
xiii, 78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Microorganismos do solo. 2. Micorriza. 3. Ectomocoriza.
4. Eletroforese. 5. Genética molecular. 6. Eucalipto. 7. Solo -
Uso. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.46

ADALBERTO ANTÔNIO SUKUMULA CHIQUETE

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLOS DE FLORESTAS PLANTADAS
DE EUCALIPTO**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2011

Prof^a. Denise Mara Soares Bazzolli
(Co-orientadora)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-orientador)

Prof. Nairam Félix de Barros

Prof. Sidney Luiz Sturmer

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

A Deus que excede todo o entendimento,

À minha esposa Eunice,
Às minhas filhas Chissola e Yolela,

Aos meus pais Sebastião e Ilda,
Aos meus sogros Tomé e Carlota,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da minha salvação, pelas maravilhas que tem feito em minha vida.

À minha querida Eunice, pelo amor, estímulo e paciência.

À minha orientadora professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela dedicação e cuidados que sublimam a mera função de orientação.

Às famílias Alberto, Chiquete e Doche, pelo apoio e estímulo para superar os desafios da vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Instituto Médio Agrário do Tchivinguiro (IMAT), por acreditar na importância desta formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao governo da Província da Huíla – Angola, pela garantia de manutenção ao longo do curso.

Ao professor Damase P. Khasa, Universidade Laval - Canadá, pelo incentivo e pronta disponibilização de recursos financeiros para a coleta de amostras em Angola.

À CENIBRA, pelo apoio com recursos financeiros, humanos e materiais em todas as viagens de coleta de amostras no leste de Minas Gerais. Em especial aos funcionários Dr. Fernando e ao técnico Gilson, pela pronta disponibilidade em apoiar e colaborar com o processo de coleta de amostras e fornecer informações dos locais de coleta.

À professora Cristina Cruz, Universidade de Lisboa, pelo incentivo e disponibilização das amostras de solo de Portugal, junto à Portucel – Soporcel.

Aos professores Denise Mara Soares Bazzoli e Olinto Liparini Pereira, pelos ensinamentos e orientação na execução do projeto.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia que, contribuíram para a minha formação.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis desta caminhada.

Ao professor Sidney Luiz Sturmer, Universidade Regional de Blumenau, pela disponibilidade em colaborar com a execução deste trabalho.

Ao pai Eduardo, por disponibilizar tempo como meu representante legal durante o período da formação.

À Nilcéa, pelo apoio e pronta disponibilidade em auxiliar no tratamento das questões regulamentares do programa.

Ao meu irmão Florindo, pelo apoio e socorro sempre presente em momentos de necessidade.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Associações Micorrízicas, Genética de Microrganismos e Ecologia Microbiana, pelo acolhimento e auxílio durante a execução dos experimentos.

BIOGRAFIA

Adalberto Antônio Sukumula Chiquete, filho de Sebastião Chiquete e de Ilda Helena dos Santos Chiquete, nasceu no município da Ganda, província de Benguela, na República de Angola no dia 11 de Junho de 1976. Em março de 1994, ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 1999. Em setembro de 1999, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de mestre em outubro de 2001. Em Janeiro de 2002, ingressou no corpo docente do Instituto Médio Agrário do Tchivinguiro-IMAT, na República de Angola. Em março de 2007, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO I – Diversidade de micorrizas em florestas plantadas de eucalipto em diferentes áreas da região leste de Minas Gerais - Brasil, na região sul de Angola e em Portugal.....	11
RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Caracterização das áreas estudadas.....	18
2.2. Amostragem.....	23
2.3. Colonização ectomicorrízica.....	23
2.4. Caracterização macroscópica das ectomicorrizas.....	24
2.5. Extração e amplificação do DNA total das ectomicorrizas.....	24
2.6. Extração e contagem de esporos de FMA.....	25
2.7. Identificação microscópica dos esporos de FMA.....	26
2.8. Extração e amplificação do DNA dos esporos de FMA.....	26
2.9. Análises estatísticas.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

CAPÍTULO II – Estrutura e composição das comunidades de fungos totais em florestas plantadas de eucalipto em diferentes áreas do Brasil, Angola e Portugal.....	55
RESUMO.....	56
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. Caracterização das áreas estudadas.....	60
2.2. Extração e amplificação do DNA total do solo.....	61
2.3. Obtenção das bibliotecas plasmidiais correspondentes às comunidades fúngicas de cada solo.....	62
2.4. Análises estatísticas.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4. CONCLUSÕES.....	71
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

RESUMO

CHIQUETE, Adalberto Antônio Sukumula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2011. **Diversidade de fungos em solos de florestas plantadas de eucalipto.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-orientadores: Denise Mara Soares Bazzolli, Olinto Liparini Pereira.

As mudanças ambientais e a conseqüente perda da diversidade em florestas tropicais devido a práticas de cultivo intensivas têm levado a necessidade de criar planos de conservação e manejo sustentável do uso da terra em florestas. Este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade de fungos em plantios comerciais de eucalipto, com diferentes idades e manejos, na região sul de Angola, região leste de Minas Gerais no Brasil e em três regiões distintas de Portugal. As coletas foram realizadas de janeiro a dezembro de 2009. A diversidade de fungos ectomicorrízicos (FECM) na região leste de Minas Gerais – Brasil foi avaliada pela caracterização morfológica das ectomicorrizas, e pela caracterização molecular das mesmas. A ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi avaliada pela densidade e caracterização morfológica e molecular dos esporos presentes nos solos. Foi também avaliada a diversidade de fungos totais do solo a partir da análise molecular do rDNA 18S em amostras de solo sob eucalipto nos três países. Observou-se a presença de ectomicorrizas em todas as plantas avaliadas, em todas as épocas e áreas com eucalipto de diferentes idades e manejo, na região leste de Minas Gerais - Brasil, havendo maior taxa de colonização nas plantas mais velhas e na segunda época de coleta, quando as condições climáticas eram de baixa precipitação e umidade relativa. A caracterização morfológica das ectomicorrizas mostrou a presença de pelo menos nove morfotipos. Foram encontrados basidiocarpos dos gêneros *Scleroderma*

e *Pisolithus*, com predominância do primeiro. Foram identificados FMA dos gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Scutellospora* a partir dos esporos dos solos, tendo os dois primeiros ocorrido em todos os solos avaliados. A caracterização morfológica dos esporos associada à análise molecular do gene 18S do rDNA dos esporos mostrou haver semelhanças na composição da comunidade de FMA dos solos da Angola, Brasil e Portugal. A análise molecular do DNA, a partir da extração direta do solo, mostrou a existência de uma diversidade considerável na composição das comunidades de fungos nos solos de florestas plantadas de eucalipto dos três países estudados, sendo que o solo do Brasil foi o que apresentou maior índice de diversidade de espécies. Os resultados deste trabalho sugerem que há grande diversidade de fungos em plantios comerciais de eucalipto e que as técnicas morfológicas clássicas, aliadas às técnicas moleculares, permitem acessar melhor a diversidade dos fungos presentes em ambientes florestais.

ABSTRACT

CHIQUETE, Adalberto Antônio Sukumula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2011. **Fungal diversity in soils of eucalypt plantations.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-Advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Olinto Liparini Pereira.

The changes in the environment and the consequent reduction on the diversity under intensive cultural practices have taken the people to develop plans of conservation and sustainable use of land and forests management. The objective of this work was to study fungal diversity in commercial plantations of eucalypt, with different ages and management, in the South of Angola, East of Minas Gerais State in Brazil and three regions of Portugal. Samples were collected from January to December 2009. The ectomycorrhizal fungi diversity (ECMF) in the East of Minas Gerais State was evaluated by morphological and molecular characterization, and the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) occurrence was investigated by using spores. The total fungal diversity in the three counties was performed by molecular analysis of 18S rDNA of soil samples. All evaluated plants presented ectomycorrhizae, in all the times and areas in the East of Minas Gerais State. The highest colonization was settling in the oldest plants and in the second period time of sampling, suggesting the importance of ectomycorrhizal association in stress conditions, like in low temperature and water availability. At least nine different morphotypes of ectomycorrhizae were characterized. Basidiomes of *Scleroderma* and *Pisolithus* were found. The arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus*, *Acaulospora* and *Scutellospora* were observed under eucalypt plantations, and the first two species occurred in all

evaluated soil. The morphological characterization of the spores associated to the molecular analysis of the 18S rDNA showed to have high similarities in the composition of the FMA community among soils of eucalypt plantations from Angola, Brazil and Portugal. The analysis of fungal composition using 18S rDNA showed considerable diversity in all three soils, and Brazilian's presented greater index of species diversity. The results of this work show that it has great diversity of fungi in commercial plantations of eucalypt and the use of classic morphological and molecular techniques allows to better access and understanding the fungal diversity in forest environments.

INTRODUÇÃO GERAL

As alterações no ambiente e a irreparável perda da diversidade em florestas plantadas de regiões tropicais, como consequência do cultivo intensivo, têm levado a transformações com possíveis implicações globais, o que implica a necessidade de criar planos de conservação e manejo do uso da terra e florestas. Atualmente existe uma ampla discussão no meio científico e na sociedade civil sobre as consequências da destruição de florestas em grande escala, levando a alterações nas condições climáticas do globo. Entretanto, apesar da existência de várias idéias, projetos e programas de conservação ambiental, pouco se sabe sobre os componentes, processos e interações do solo, que exercem função importante na regulação da composição, estrutura e funcionamento dos ecossistemas florestais. Uma das formas de superar esta deficiência é a realização de estudos de diversidade, visando conhecer a estrutura das comunidades microbianas do solo, bem como as suas interações com os demais elementos dos ecossistemas florestais.

Os estudos de diversidade são particularmente importantes quando consideram a habilidade do ecossistema em responder a alterações das condições ambientais, a necessidade de conservação da diversidade e a manutenção sustentável dos processos do ecossistema (PROSSER, 2002). Um dos grupos mais sensíveis às alterações é o dos microrganismos, os quais são essenciais para o funcionamento e a sustentabilidade dos ecossistemas naturais, mas são frequentemente ignorados devido ao seu tamanho diminuto e às dificuldades metodológicas para sua detecção e avaliação da sua atividade. Assim, estima-se que apenas 10% dos microrganismos presentes nos variados tipos de ambiente sejam conhecidos. No entanto, atualmente a utilização de técnicas moleculares, como a clonagem e sequenciamento genético, tem tornado possível os estudos sobre diversidade microbiana (PACE, 2008).

As técnicas tradicionais de estudo da diversidade microbiana têm-se baseado no cultivo em laboratório de microrganismos isolados de ambientes naturais e técnicas de identificação clássica, incluindo a análise morfológica, análise de características fisiológicas e propriedades bioquímicas (PROSSER, 2002). Estas técnicas fornecem informações em pequena escala de diversidade, mas estão sujeitas a variações resultantes das condições do meio e de cultivo empregadas, e da incapacidade de crescimento em laboratório de determinados isolados proporcionalmente significativos nas comunidades naturais (PROSSER, 2002). Uma alternativa a estas técnicas é a amplificação do DNA e de genes funcionais a partir de ácidos nucléicos extraídos diretamente de amostras do solo com subsequente análise por métodos moleculares ou por sequenciamento e análise filogenética. Isto evita a necessidade do cultivo laboratorial e permite uma melhor visualização funcional da comunidade microbiana (MUYZER, 1993; VAN ELSAS et al., 1997; PROSSER, 2002).

Em ecossistemas terrestres, a maioria das plantas apresenta-se em estreita interação com fungos mutualistas, formando associações denominadas micorrizas (ALLEN et al., 2003). Estima-se que cerca de 80% das plantas vasculares formam algum tipo de associação micorrízica, sendo as micorrizas arbusculares (MA) e as ectomicorrizas (ECM) as mais comumente encontradas (SMITH e READ, 1997). Em angiospermas, 65% das espécies formam somente um tipo de micorriza, entretanto, 5% delas podem formar MA estritamente ou simultaneamente com ECM (SMITH e READ, 1997). O eucalipto é um dos exemplos que pode apresentar em seu sistema radicular as MA e as ECM, havendo predominância das MA em plantas mais jovens e de ECM em plantas mais velhas (SCHWAN, 1993; YINGLONG et al., 2000; SANTOS et al., 2001).

As interações mutualistas entre plantas e microrganismos ocorrem predominantemente na rizosfera. Nesta região, fungos ectomicorrízicos e arbusculares transferem para as plantas nutrientes minerais e água, recebendo por sua vez fotoassimilados. Sob condições de estresse, esta associação pode ser essencial para a sobrevivência da planta, assim como para o desenvolvimento micelial do fungo (ATLAS e BARTHA, 1997). Assim, os amplos entendimentos de como estas interações se dão e que fatores norteiam a sua ocorrência e disseminação é de extrema importância para o delineamento de ações que visem o manejo sustentável dos ecossistemas florestais.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm grande importância ecológica, uma vez que a maior parte das espécies de plantas associa-se com estes fungos, incluindo grande parte das plantas agrônômicas (SMITH e READ, 1997; 2008). Esta interação é uma simbiose mutualista bem estabelecida, em que o fungo é completamente dependente dos carboidratos fornecidos pela planta (BEVER, 2002). Estes fungos são essencialmente biotróficos obrigatórios e o seu ciclo inclui o crescimento e proliferação dentro da raiz da planta hospedeira e em torno das partículas do solo (HUSBAND et al., 2002) e, espécies individuais, podem ter um largo espectro de efeitos em diferentes plantas hospedeiras.

É uma das simbioses mais comum em plantas, melhorando a produtividade e a resistência ao estresse nutricional das plantas (FEDDERMANN et al., 2010), além da sua presença influenciar na competição inter-específica, no processo de sucessão e na estabilização dos agregados do solo (ALLEN e ALLEN, 1990; HARTNETT e WILSON, 1999; MILLER e JASTROW, 2000). Eles facilitam o acesso das plantas às fontes de nutrientes do solo (BEVER, 2002). Em alguns casos, as espécies que melhor promovem o crescimento de determinada planta podem retardar o crescimento de outra (STREITWOLF-ENGEL et al., 1997; VAN DER HEIJDEN et al., 1998a). No entanto, uma mesma espécie de FMA pode diferir na resposta ao crescimento em plantas diferentes (EOM et al., 2000).

A associação dos FMA com as plantas é considerada altamente inespecífica (SMITH e READ, 1997; HOEKSEMA, 1999). Contudo, há evidências da existência de diferenças hospedeiro-específicas na resposta da planta ao fungo e vice-versa (BEVER, 2002). A aparente baixa diversidade dos FMA comparada às comunidades de plantas com as quais se associam mostra que são um grupo homogêneo e as espécies são funcionalmente redundantes (HUSBAND et al., 2002). Conseqüentemente, a presença ou ausência de determinada espécie de FMA, bem como a diversidade geral, podem afetar a produtividade e diversidade de comunidades de plantas tanto a nível experimental como em ecossistemas naturais (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; KLIRONOMOS et al., 2000). De forma inversa, a composição da comunidade de plantas tem um efeito similarmente grande na diversidade e composição da comunidade de FMA (BEVER et al., 1996; EOM et al., 2000). Esta mútua interdependência entre planta e fungo, pode gerar comunidades dinâmicas e complexas entre a planta e a malha fúngica.

Mudanças hospedeiro-específicas na comunidade de FMA podem levar ao aumento (controle positivo) ou redução (controle negativo) nas taxas relativas de crescimento das espécies de plantas mais abundantes (BEVER, 1999). Estas duas dinâmicas levam a predições muito diferentes da comunidade. O controle positivo fortalece o mutualismo entre a planta e a malha fúngica, mas causa redução na diversidade de espécies. O controle negativo enfraquece o mutualismo, mas pode contribuir para a coexistência de espécies de plantas em competição.

Um dos aspectos importantes da biodiversidade é o fato do aumento na biodiversidade local poder atuar como forma de evitar a incidência de patógenos (KENNEDY et al., 2002) e o potencial que ela tem na regulação do ecossistema de forma previsível em ambientes terrestres (McGRADY-STEED et al., 1997).

A diversidade de fungos micorrízicos pode ser usada para avaliar a sua função na manutenção de biodiversidade de plantas e funcionamento do ecossistema durante o processo de restauração e conservação de diversos ecossistemas naturais, especialmente de ecossistemas quentes e secos (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; DIALLO et al., 1999; PANDE e TARAFDAR, 2004). Neste contexto, técnicas moleculares permitem caracterizar a diversidade, a dominância, a composição de espécies e a estrutura das comunidades de microrganismos em ambientes naturais. Contudo, o valor da informação obtida por estas técnicas depende do quanto significativo é esta diversidade no funcionamento do ecossistema (PROSSER, 2002).

A técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR), seguida pela eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) provou ser útil em mostrar mudanças na estrutura microbiana da comunidade do solo (MUYZER, 1993; VAN ELSAS et al., 1997; Li et al., 2006; ROS et al., 2006a; 2006b; 2008). Desta forma, é possível obter uma imagem da estrutura da comunidade microbiana de determinado solo, e avaliar os processos que influenciam a riqueza e dominância de espécies.

Considerando que a formação da associação micorrízica é dependente de fatores ambientais, da fisiologia do hospedeiro, do inóculo presente no solo e da população dos outros microrganismos que podem influenciar o desenvolvimento e o estabelecimento da simbiose com interações positivas, negativas ou neutras, presume-se que, a interação entre os fatores bióticos e abióticos se refletirá na complexidade e variabilidade desses organismos (ALLEN et al., 2003). Sendo assim, o estudo da diversidade e ecologia de fungos micorrízicos em florestas plantadas e

nativas é de crucial importância para se conhecer e aproveitar o potencial das associações micorrízicas em viveiros e em plantações comerciais de cada região.

As florestas plantadas de eucalipto cobrem 4,5 milhões de hectares no Brasil. Desse total, 1,62 milhão são mantidos pela indústria de celulose e papel, segundo dados da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF). O eucalipto tem uso múltiplo. Além da produção de celulose, também é fonte de carvão vegetal para gerar energia e de madeira sólida usada em móveis, pisos, revestimentos e outras aplicações na construção civil (BRACELPA, 2010).

Por atender às necessidades de consumo humano, o plantio de eucalipto assim como o do pinus, também usado no Brasil para produzir papel, ajuda a preservar as florestas nativas e, assim, contribui significativamente com o equilíbrio ambiental. Outro aspecto importante em tempos de aquecimento global é o fato de seu rápido crescimento ter implicações no consumo do CO₂ atmosférico em taxas expressivas (BRACELPA, 2010). As florestas plantadas são cultivadas atendendo aos planos de manejo sustentável que têm como objetivo reduzir os impactos ambientais e promover o desenvolvimento econômico e social das comunidades vizinhas. Com base em tecnologias avançadas de gestão e controle, as empresas de celulose e papel visam alcançar práticas de excelência em sustentabilidade na área ambiental (BRACELPA, 2010).

O setor florestal brasileiro é um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo. O País detém uma parcela significativa dos plantios globais: 6,3 milhões de hectares. Cerca de um terço dessa área corresponde às florestas para celulose e papel, incluindo 374 mil hectares em mais de 21 mil propriedades de produtores independentes – muitos deles integrantes de programas de parcerias florestais (BRACELPA, 2010).

Os dez principais países com florestas plantadas, incluindo o Brasil, somam 182 milhões de hectares de plantações florestais, dos quais 132 milhões são produtivos e 50 milhões têm função exclusiva de proteção (FAO, 2006). Um terço da produção global de papel provém dessas áreas cultivadas (BRACELPA, 2010).

A República de Angola, com cerca de 70% do território situado a uma altitude entre 1.000 e 1.060 m, localiza-se na zona intertropical e subtropical do hemisfério sul, e apresenta características climáticas muito semelhantes às do sudeste do Brasil, especialmente aos estados do Rio de Janeiro e Minas gerais (MINADER-ANGOLA, 2007). Assim, vários aspectos ecológicos semelhantes podem ser

observados em diversos locais dos dois países, o que torna possível haver semelhanças na diversidade e população microbiana que habita estas regiões. Angola é detentor de um potencial agroflorestal significativo, com terras férteis e uma densidade demográfica relativamente baixa. No entanto apresenta vários hectares de florestas dizimados anualmente, fruto do grande êxodo rural provocado por longos anos de instabilidade política (MIREX-ANGOLA, 2007).

Passados os anos de conflito, o país caminha para o desenvolvimento, e o aquecimento econômico impulsiona o desenvolvimento da indústria nas suas diversas vertentes e com ela aumenta a magnitude da devastação florestal. São necessárias, portanto, políticas de desenvolvimento sustentável da atividade agroflorestal e programas de recuperação de áreas degradadas e revegetação. Assim, é importante conhecer a diversidade da microbiota existente nos solos angolanos, para futuros estudos e desenvolvimento biotecnológico no país (MIREX-ANGOLA, 2007).

Cerca de 50% do território angolano são cobertos por florestas, sendo que, uma significativa parte desta área é formada por *Eucalyptus* e *Pinus* introduzidos no período colonial. Considerando que não há qualquer informação sobre a biodiversidade microbiana em povoamentos florestais do país, o estudo da ocorrência de fungos micorrízicos, bem como elementos da diversidade microbiana nessas áreas, é de extrema importância para futuros estudos e programas de conservação e desenvolvimento sustentável (MINADER-ANGOLA).

Um aspeto interessante do desenvolvimento de florestas plantadas de eucalipto no Brasil e em Angola é o fato de a implantação nestes dois territórios ter sido feita a partir de Portugal, durante o período colonial, o que implica em características intrínsecas das comunidades florestais que daí surgiram, apesar das diferenças marcantes no que tange os aspectos referidos de clima e solo entre os países.

Assim, uma avaliação comparativa da diversidade microbiana dos solos de florestas plantadas de eucalipto fornecerá conhecimento sobre as comunidades microbianas nestes ambientes, possibilitando um estreito intercâmbio de informação e difusão de tecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M.F., SWENSON, W., QUEREJETA, J.L., WARBURTON-EGERTON, L.M. e TRESEDER, K.K., 2003. Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions' among plants and fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 41: 271 – 303.
- ALLEN, M. F. e ALLEN, E. B. 1990. The mediation of competition by mycorrhizae in succession and patchy environments. In: **Perspectives on Plant Competition**. Ed. GRACE, J. B. e TILMAN, D., New York. Academic Press, p. 367 - 389.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **BRACELPA**, 2010.
- ATLAS, R.M., BARTHA, R., 1997. Microbial Ecology: Fundamentals and applications. Menlo and Benjamin Cummings Science Publishing. **Menlo Park: Addison Wesley Longman**, 694p.
- BEVER, J. D., MORTON, J. B., ANTONIOVICS, J. e SCHULTZ, P. A., 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. **Journal of Ecology**, 84: 71 – 82.
- BEVER, J. D., 1999. Dynamics within mutualism and the maintenance of diversity: inference from a model of interguild frequency dependence. **Ecology Letters**, 2: 52 – 61
- BEVER, J. D., 2002. Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. **Plant and Soil**, 244: 281 – 290.
- DIALLO, A.T., SAMB, P.I., DUCOUSSO, M., 1999. Arbuscular mycorrhizal fungi in the semi-arid areas of Senegal. **European Journal of Soil Biology**, 35: 65 – 75.

- EOM, A-H, HARTNETT, D. C. e WILSON, G. W. T., 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tall grass prairie. **Oecologia**, 122: 435 – 444.
- FAO, 2006. Global planted forests thematic study: results and analysis. **Forest Plantations Thematic Papers**. FAO, Rome.
- FEDDERMANN, N., FINLAY, R., BOLLER, T. e ELFSTRAND, M., 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. **Fungal Ecology**, 3: 1 – 8.
- HARTNETT, D. C. e WILSON, G. W. T., 1999. Mycorrhizae influence plant community structure in tall grass prairie. **Ecology**, 80: 1187 – 1195.
- HOEKSEMA, J. D., 1999. Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better-studied systems. **Oikos**, 84: 327 – 332.
- HUSBAND, R., HERRE, E. A., TURNER, S. L., GALLERY, R. e YOUNG, J. P. W., 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical Forest. **Molecular Ecology**, 11: 2669 – 2678.
- KENNEDY, T.A., NAEEM, S., HOWE, K.M., KNOPS, J.M., TILMAN, D., REICH, P., 2002. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. **Nature**, 417: 636 – 638.
- KLIRONOMOS, J. N., McCune, J., HART, M. e NEVILLE, J., 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, 3: 137 - 141.
- LI, Z.J., XU, J.M., TANG, C.X., WU, J.J., MUHAMMAD, A., WANG, H.Z., 2006. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd contaminated paddy soils. **Chemosphere**, 62: 1374–1380.
- McGRADY-STEED, J., HARRIS, P.M., MORIN, P.J., 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. **Nature**, 390: 162 – 165.

- MILLER, M. A. e JASTROW, J. D., 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: **Arbuscular Mycorrhizae - Molecular Biology and Physiology**. Ed. Douds, D. D. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- MINISTÉRIO da AGRICULTURA e DESENVOLVIMENTO RURAL da REPÚBLICA de ANGOLA. **MINADER -Angola**, 2004.
- MINISTÉRIO das RELAÇÕES EXTERIORES da REPÚBLICA de ANGOLA. **MIREX-Angola**, 2007.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, 59: 695 – 700.
- PACE, N. R. 2008. The molecular tree of life changes how we see, teach microbial diversity. **Microbe**, 3: 15 - 20.
- PANDE, M., TARAFDAR, J.C., 2004. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in neem-based agroforestry systems in Rajasthan. **Applied Soil Ecology**, 26: 233 – 241.
- PROSSER, J. I., 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, 244: 9 - 17.
- ROS, M., GOBERNA, M., PASCUAL, J. A., KLAMMER, S., INSAM, H., 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. **Journal of Microbiological Methods**, 72: 221 – 226
- ROS, M., GOBERNA, M., MORENO, J.L., HERNANDEZ, T., GARCIA, C., INSAM, H., PASCUAL, J.A., 2006a. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. **Applied Soil Ecology**, 34: 93 – 102.
- ROS, M., KLAMMER, S., KNAPP, B., AICHNERGER, K., INSAM, H., 2006b. Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. **Soil Use and Management**, 22: 209–218.

- SANTOS, V. L., MUCHOVEJ, R. M., BORGES, A. C., NEVES, J. C. e KASUYA, M. C. M., 2001. Vesicular-arbuscular-ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Journal of Brazilian Microbiology**, 32: 81 – 86.
- SCHWAN, K. R. F., 1993. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de *Eucalyptus* spp., na região de Viçosa, Minas Gerais. **Journal of Brazilian Microbiology**, 24: 232 – 238.
- SMITH, S.E., READ, D.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. **Acadademic Press**, San Diego, California, 605p.
- SMITH, S. E., READ, D. J., 2008. Mycorrhizal symbiosis. **Academic Press**. Cambridge, UK, 787p.
- STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A. e SANDERS, I. R., 1997. Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi form a calcareous grassland. **Journal of Ecology**, 85: 181 – 191.
- VAN ELSAS, J.D.; MANTYNEN, V. E WOLTERS, A. 1997. Soil DNA extraction an assessment of the fate of *Mycobacterium clorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribossomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. **Soil Biology and Fertility**, 24: 188-195.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A., SANDERS, L.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, 396: 69 - 72.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A., BOLLER, T., WIEMKEN, A e SANDERS, I. R., 1998a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. **Ecology**, 79: 2082 - 2091.
- YINGLONG, L.C., BRUNDRETT, M.C. e DELL, B. 2000. Effects of ectomycorrhizae and vesicular-arbuscular mycorrhizae, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urophylla*. **New Phytologist**, 146: 545 – 556.

CAPITULO I

Diversidade de micorrizas em florestas plantadas de eucalipto em diferentes áreas da região leste de Minas Gerais (Brasil), na região sul de Angola e em três regiões de Portugal

RESUMO

Foram investigados a ocorrência de associação ectomicorrízica (ECM) e seus morfotipos em plantações de eucalipto da região leste de Minas Gerais - Brasil, assim como a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em povoamentos de eucalipto de Angola, Brasil e Portugal. Foram estudadas plantações de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus globulus* com idades variando de 5 a 30 anos, submetidas a diferentes tipos de manejo e em diferentes condições de clima e solo. As coletas foram realizadas em três épocas no período de janeiro a dezembro de 2009. Foram encontradas ECM em todas as áreas e épocas avaliadas. A taxa de colonização média por fungos ectomicorrízicos variou de 15 a 43% dependendo da área e época de coleta. Foram observados nove morfotipos de ECM com predominância dos morfotipos de coloração preta e marrom. A análise do perfil de bandas obtido por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou identidade entre morfotipos de locais diferentes. A densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi maior nos solos de Portugal em relação aos solos do Brasil e de Angola, sendo o maior valor (5478/100g de solo) observado na amostra de solo de Aveiro. A densidade de esporos nos solos de mata foi maior que a das florestas de eucalipto em Angola e no Brasil, como esperado, devido à maior diversidade de espécies vegetais e da comunidade microbiana destes ecossistemas. A caracterização morfológica dos esporos permitiu a identificação de três gêneros de FMA, sendo o *Glomus* e o *Acaulospora*, observados em todos os solos avaliados. Concluiu-se que a taxa de colonização e diversidade de ectomicorrizas é maior em plantações mais velhas e que há semelhanças na composição das comunidades de FMA dos solos de florestas de eucalipto de Angola, Brasil e Portugal.

Palavras-chave: Eucaliptos, micorrizas, rDNA 18S, Nested PCR, DGGE.

1. INTRODUÇÃO

Os diferentes tipos de associações micorrízicas entre plantas e fungos ocorrem de forma generalizada e em larga escala nos ecossistemas terrestres. Historicamente estas associações têm sido consideradas principalmente na perspectiva dos seus efeitos na absorção de nutrientes minerais pelas plantas.

Trabalhos recentes têm enfatizado uma perspectiva multifuncional mais ampla, incluindo os efeitos da simbiose micorrízica na planta e nas comunidades microbianas, e nos processos do ecossistema. Isto inclui: mobilização de nitrogênio (N) e fósforo (P) de polímeros orgânicos, liberação de nutrientes das partículas ou da superfície de rochas minerais ao longo do tempo, efeitos na ciclagem do carbono, interações com plantas mico-heterotróficas, mediação de respostas da planta aos fatores de estresse tais como déficit hídrico, acidez do solo, metais tóxicos e patógenos, bem como uma variedade de interações possíveis com outros grupos de microrganismos do solo (FINLAY, 2007).

Os fungos micorrízicos disponibilizam para as plantas os nutrientes requeridos para seu crescimento, mas distribuídos de forma heterogênea no solo, permitindo o fluxo de compostos ricos em energia necessários para a mobilização de nutrientes limitantes. Simultaneamente a isto, provêm canais para a translocação de produtos mobilizados para a planta hospedeira. Além de aumentar a superfície de absorção de nutrientes do sistema radicular da planta do hospedeiro, o micélio extrarradicular dos fungos micorrízicos fornece uma via de translocação direta dos derivados fotossintéticos do carbono para microssítios no solo e uma grande área de interação com outros microrganismos (ONGUENE, 2000; FINLAY, 2007).

As raízes de espécies florestais desenvolvem-se em associação com fungos do solo, formando estruturas simbióticas chamadas de micorrizas, sendo as ectomicorrizas (ECM) e as micorrizas arbusculares (MA) os dois principais tipos estudados (SMITH e READ, 1997). A simbiose micorrízica é utilizada em programas de reflorestamento para melhorar a nutrição, o crescimento e a adaptação das plantas ao solo e ao novo ambiente durante o transplante (EL KARKOURI et al., 2005).

A diversidade de FMA no campo é tradicionalmente estimada com base na contagem de esporos (HUSBAND et al., 2002). Contudo, este método pode ser problemático, pois as taxas de esporulação fúngica são afetadas por vários fatores e os esporos, por si só, não são uma medida direta da diversidade (EOM et al., 2000). Além disso, a população de esporos no solo pode mascarar a relação entre os FMA e as raízes colonizadas (CLAPP et al., 1995).

Os avanços nas técnicas moleculares tornaram possível a identificação direta do fungo na planta, pelo uso da reação de polimerase em cadeia (PCR) para determinadas sequências específicas dos FMA (CLAPP et al., 2002). Vários métodos, baseados em PCR, têm sido desenvolvidos nos últimos anos, a maioria dos quais com base nos genes do rDNA que codificam para o RNA ribossômico (rRNA).

Em relação às associações ectomicorrízicas (ECM), está bem documentado o seu efeito benéfico no crescimento e sobrevivência de grande parte das espécies florestais tanto nos primeiros como nos últimos estágios de desenvolvimento (SMITH e READ, 1997; HORTON et al., 1999; LANDEWEERT et al., 2001; HOGBERG e HOGBERG, 2002; READ e PEREZ-MORENO, 2003). Assim como *Inocybe*, *Cortinarius* ou *Russula* spp., a maioria dos fungos ectomicorrízicos formam ectomicorrizas com uma vasta gama de espécies florestais (HORTON e BURNS, 1998; MASSICOTTE et al., 1999). Uma comunidade micorrízica compartilhada pelas espécies vegetais tem implicações importantes para a manutenção do inóculo de fungos micorrízicos no local e no estabelecimento de mudas plantadas ou de regeneração natural com micorrizas (NARA, 2006). Além disso, o micélio de fungos ectomicorrízicos liga as mudas às plantas adultas. Contudo, a quantidade e diversidade do inóculo de fungos ECM é frequentemente reduzida após o corte, deslizamento de terra, avalanches ou erosão (NARA, 2006).

A estrutura das comunidades de fungos ectomicorrízicos pode ser estudada pela avaliação da colonização micorrízica, caracterização morfológica e molecular

dos basidiocarpos e das ectomicorrizas (AGERER, 1992; BRUNDRETT et al., 1996). A caracterização morfológica permite a avaliação e a descrição de populações de fungos ECM com base em características macroscópicas, como à cor, a forma e as dimensões das ectomicorrizas; e características microscópicas, como as dimensões e formas das hifas, a profundidade e organização do manto, a presença de conexões entre as hifas, a presença de hifas externas, esclerócitos e de rizomorfos e a profundidade da rede de Hartig (AGERER, 1992; BRUNDRETT et al., 1996; SALES, 2001; SAKAKIBARA et al., 2002).

Estudos feitos em plantações comerciais de eucalipto no Brasil mostraram que a intensidade de colonização de fungos micorrízicos é dependente da espécie plantada, do tipo de solo e das condições climáticas (GUIMARÃES, 1993; GRAZZIOTTI, 1995). Além disso, constatou-se que os fungos ectomicorrízicos mais comuns em florestas plantadas de eucalipto são *Pisolithus* e *Scleroderma*, sendo também encontradas ectomicorrizas formadas por *Telephora* sp. e *Clavaria* sp. (COELHO, 1993; GUIMARÃES, 1993).

KASUYA et al. (2010) constaram a ocorrência de duas espécies de fungos ectomicorrízicos, *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus marmoratus*, pela caracterização morfológica e molecular de basidiomas coletados em povoamentos de eucalipto no Brasil. CAMPOS (2004) observou uma grande diversidade de ectomicorrizas em plantios comerciais de eucalipto da região leste de Minas Gerais, sendo maior no período chuvoso e em plantios mais velhos. Além disso, demonstrou pela primeira vez a ocorrência de ECM formadas pelo fungo *Hydnangium* sp., em plantações de eucalipto.

O número de esporos de FMA por grama de solo variou em função da época de amostragem, sendo maior em períodos de menor precipitação (BELLEI et al., 1992; GRAZZIOTTI, 1995). Entretanto, não se observou variação na percentagem de colonização por FMA em função da época do ano nem houve correlação com a densidade de esporos no solo (COELHO, 1993; GUIMARÃES, 1993; GRAZZIOTTI; CAMPOS, 2004). PASQUALINI et al. (2007), estudando o efeito da comunidade de FMA no crescimento e concentração de P de espécies florestais da mata atlântica, observaram uma variação de 34 a 67% na colonização radicular e encontraram correlação inversa entre a colonização e a massa da semente. Os FMA mais comumente encontrados em florestas plantadas de eucalipto pertencem aos

gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Scutellospora* (COELHO 1993; GUIMARÃES, 1993; GRAZZIOTTI; CAMPOS 2004).

Levantamentos realizados em florestas de eucalipto têm constatado que a idade da planta tem influência no tipo de micorriza predominante e, conseqüentemente, sobre a diversidade de morfotipos formados, havendo, inicialmente a colonização por FMA, e progressiva substituição por ectomicorrizas (BELLEI et al., 1992; SCHUWAN, 1993; SANTOS et al., 2001). Além disso, a colonização por fungos micorrízicos também pode ser influenciada pela espécie de eucalipto (SCHUWAN, 1993). A inoculação concomitante dos dois tipos de fungos micorrízicos (FECM e FMA) pode levar à competição, com conseqüente redução na colonização por ambos (YINGLONG et al., 1999).

A área de florestas com eucalipto está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura deste grupo de espécies, ou em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura, com crescimento médio no país de 7,1% ao ano entre 2004-2009. Isto corresponde a uma expansão de mais de 1 milhão de hectares na área plantada nos últimos 5 anos (crescimento acumulado de 41,1% no período). No país existem 4,5 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto (CIFLORESTAS, 2009). Nestas áreas, a espécie predominante é o *Eucalyptus grandis*, ocupando 55% da área total, seguida de 17% com *Eucalyptus saligna*, 9% com *Eucalyptus urophylla*, 2% com *Eucalyptus viminalis*, 11% com híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e 6% com outras espécies (SBS, 2004). A região Sudeste do País comporta 57% dos plantios de eucalipto, sendo que o estado de Minas Gerais detém cerca de 30% da área plantada total, correspondendo a 1.300.000 ha.

O grande sucesso desses plantios é resultado da boa adaptabilidade do eucalipto a solos com limitada disponibilidade de fósforo e nitrogênio (SPECHT, 1996) e pela formação de micorrizas em seu sistema radicular (SCHWAN, 1993; YINGLONG et al., 1999).

O território angolano é recoberto em quase 50% por florestas, ainda pouco exploradas. Árvores de espécies valiosas podem ser encontradas nas florestas do norte, inexploradas desde a independência. Perto de 150.000 ha de eucalipto, ciprestes e plantações de pinho precisam de reabilitação, principalmente no centro-sul do país. O desenvolvimento de programas de reflorestamento e a massificação do

uso de ferramentas biotecnológicas são de extrema importância para o momento de crescimento econômico que o país vive hoje.

Não foi encontrada na literatura consultada informação sobre a ocorrência de fungos micorrízicos, bem como da diversidade microbiana, no território angolano. Portanto, estudos de identificação e caracterização são necessários para o desenvolvimento de programas biotecnológicos de desenvolvimento florestal. Apesar de já haver informação sobre a ocorrência de micorrizas em plantios de eucalipto no Brasil, ainda pouco se sabe sobre a diversidade e os índices de dominância e riqueza de espécies nestas florestas. Dado o fato de haver características edafo-climáticas semelhantes entre Brasil e Angola, e tendo em conta a introdução do eucalipto ter sido feita nos dois países a partir da mesma fonte (Portugal), o presente trabalho teve como objetivo constatar a ocorrência e avaliar a diversidade de fungos micorrízicos em florestas plantadas de eucalipto da região leste de Minas Gerais (Brasil), da região sul de Angola e de Portugal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização das áreas estudadas

Antes de se proceder à coleta de amostras, foi submetido ao Ministério da Agricultura do Brasil – MAPA, um requerimento para importação de material para pesquisa científica, tendo-se obtido a permissão de importação nº318/2008 de 29 de outubro de 2008.

No Brasil, foram utilizados plantios comerciais de eucalipto, pertencentes à empresa CENIBRA – Celulose Nipo-Brasileira S.A., MG, localizados na região leste do Estado de Minas Gerais. Foram selecionados três locais distintos com altitude média em torno dos 800 m, dois no Município de Belo Oriente, projeto Batinga (Áreas 1 e 2) e projeto Ipanema (Área 3) e um no Município de Guanhães, projeto Sabinópolis IV (Área 4). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo *aw*, tropical chuvoso, clima de savana, com chuvas no verão e inverno seco (OSAKI, 1994). As médias de precipitação, temperatura e umidade relativa do ar, durante as épocas de coleta, são apresentadas na Figura 1. Os plantios são originados de regeneração natural, onde os restos culturais são deixados na plantação. O sistema de colheita é mecanizado, intercalado com colheita manual em locais de maior declive.

Os solos de Angola foram coletados na plantação comercial pertencente à Companhia de Celulose e Papel de Angola, no município de Ganda (Área 1 - GAN), Província de Benguela, no Polígono Florestal do Instituto de Desenvolvimento Florestal (Área 2 – POL), no município do Lubango, Província da Huila e na reserva florestal do Instituto Médio Agrário do Tchivinguiro – IMAT, município da Humpata, Província da Huila (Área 3 - HLA). O clima é tropical seco na província

de Benguela, com precipitações que variam de 600 a 900 mm/ano bem distribuídas ao longo do ano, com temperaturas médias anuais de 28 °C, característica das zonas litorâneas. Na província da Huíla, o clima é tropical de altitude, estando situada na sua totalidade cima de 1.000 m de altitude, com precipitações que variam de 900 a 1.200 mm/ano com distribuição irregular. Devido à elevada altitude são observadas três variações climáticas características, como clima temperado com inverno seco no altiplano da Humpata, o clima mesotérmico com verão úmido e inverno seco de planalto no Centro e Leste, e o clima seco de estepe do sul da Província. A média de temperatura anual é de aproximadamente 18°C, com variações que vão de 0°C (geadas no inverno) a 35°C (no verão).

Os solos de Portugal foram coletados nas localidades de Aveiro e Agueda, na região Nordeste, Montijo, na região Sudeste e Penamacor, região Noroeste. O clima é do tipo mediterrânico, temperado com influência oceânica, precipitação média anual de 600 mm. Pela classificação de Köppen, o clima é do tipo Csb, clima temperado (mesotérmico) com inverno chuvoso e verão seco (Cs), sendo do tipo (a), onde a temperatura média no mês mais quente é superior a 22 °C.

As caracterizações da vegetação e dos solos das áreas de coleta estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

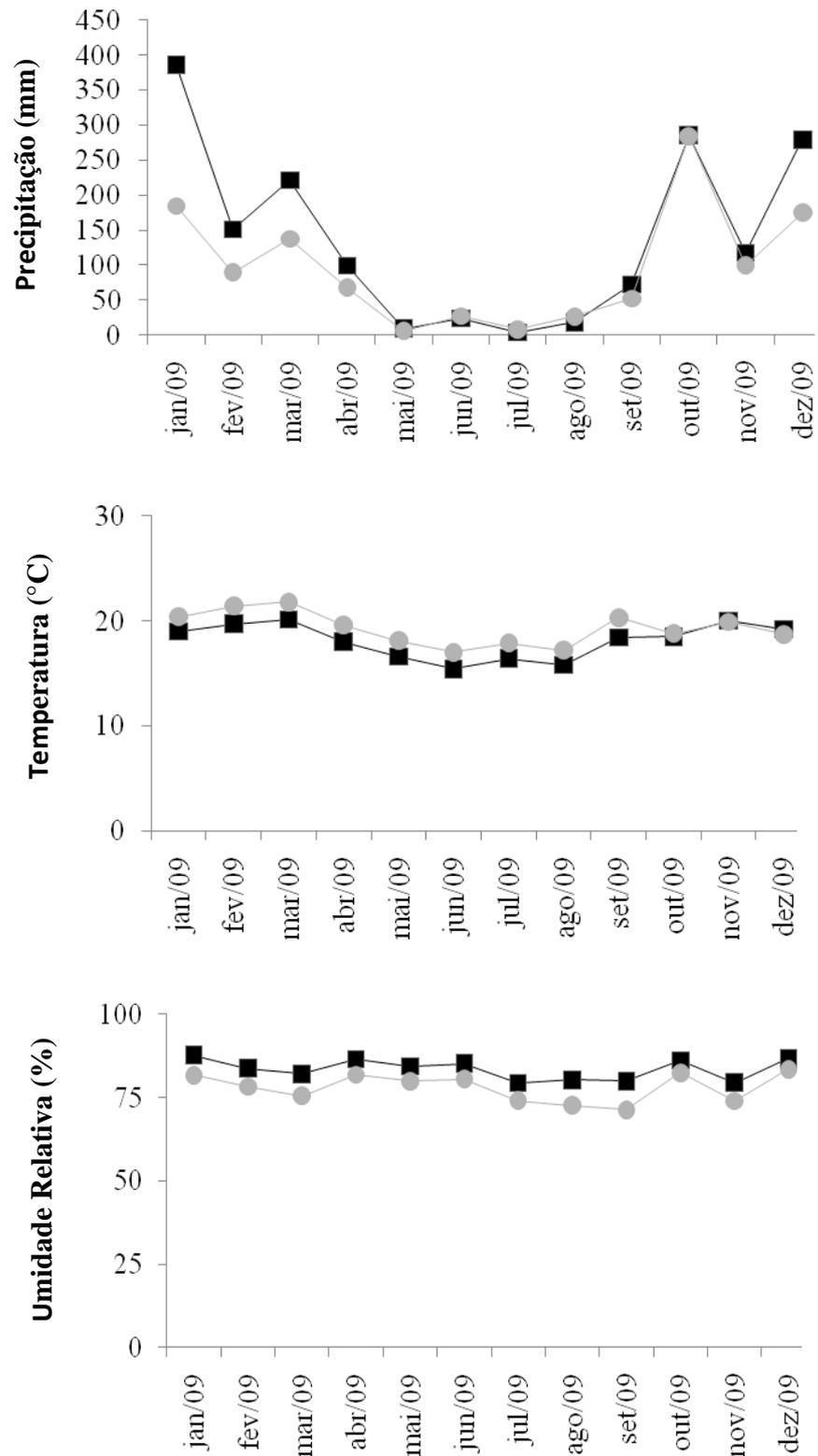


Figura 1 – Médias de precipitação, temperatura e umidade relativa dos locais em que se encontram as áreas de coleta, no período de Jan/2009 a Dez/2009. (●) - Belo Oriente, áreas 1, 2 e 3; (■) – Guanhães, área 4, Brasil.

Tabela 1 - Caracterização das áreas de estudo, abrangendo solos sob plantio de eucalipto com diferentes idades e manejos, no Brasil, em Angola e em Portugal

Áreas	Idade do Povoamento	Espécie	Coordenadas Geográficas	Material genético	Manejo	Tipo de solo ⁽³⁾	Altitude (m)	Município
Brasil								
1	30 anos	<i>E. grandis</i>	019°20'24.0" S 042°35'26.0" WO	Semente	Cultivo mínimo	CXbd6+CXbd7	810	Belo Oriente
2	8 anos	<i>E. grandis</i>	019°20'24.0" S 042°35'26.0" WO	Semente	Rebrota	CXbd6+CXbd7	810	Belo Oriente
3	20 anos	<i>E. grandis</i>	019°24'18.9" S 042°40'20.5" WO	Semente	Cultivo mínimo	CXbd10	764	Belo Oriente
4	6 anos	<i>E. urograndis</i>	018°35'40.2" S 042°57'22.7" WO	Clone	Cultivo mínimo	LAd1	855	Guanhães
Angola								
1	> 30 anos	<i>E. grandis</i>	12°56'44.6"S 14°37'59.5"E	Semente	Cultivo mínimo	CXbd6	1398	Ganda
2	> 20 anos	<i>E. grandis</i>	14°58'48.4"S 13°26'59.3"E	Semente	Cultivo mínimo	LAd1	2003	Lubango
3	> 30 anos	<i>E. grandis</i>	15°09'50.1"S 13°18'04.9"E	Semente	Cultivo mínimo	LAd1	1689	Humpata
Portugal								
1	> 5 anos	<i>E. globulus</i>	-	Clone	Cultivo mínimo	CXbd6	-	Agueda
2	> 5 anos	<i>E. globulus</i>	-	Clone	Cultivo mínimo	Arenossolo háplico	-	Aveiro
3	> 5 anos	<i>E. globulus</i>	-	Clone	Cultivo mínimo	Arenossolo háplico	-	Montijo
4	> 5 anos	<i>E. globulus</i>	-	Clone	Cultivo mínimo	Leptossolo esquelético	-	Penamacor

⁽³⁾CXbd6+CXbd7: Cambissolo Háplico Tb Distrofico típico, textura muito argilosa ou argilosa, A moderado, álico, caulinitico, hipoférrico ou mesoférrico; CXbd10: Háplico Tb Distrófico latossólico, textura argilosa, A moderado, álico, caulinitico, mesoférrico; LAd1; Latossolo Amarelo Distrofico típico, textura muito argilosa, A moderado, álico, caulinitico, hipoférrico.

Tabela 2 - Caracterização físico-química dos solos sob plantio de eucalipto com diferentes idades e manejos, no Brasil, Angola e Portugal

Áreas	pH (H ₂ O)	Matéria Orgânica ²	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	Arg	Silt/ Arg
	1:2,5	dag dm ⁻³	-----mg dm ⁻³ -----			-----cmol _c dm ⁻³ -----					-----%-----			
Brasil														
1	5,62	9,75	4,71	29,07	0,06	0,07	1,04	8,80	0,32	1,37	9,12	3,54	50	0,21
2	5,33	5,00	1,90	11,03	0,03	0,02	0,52	5,96	0,17	0,69	6,13	2,74	49	0,21
3	5,10	3,19	1,50	21,90	0,02	0,04	0,66	5,52	0,13	0,79	5,65	2,37	40	0,36
4	5,18	1,96	0,90	14,06	0,01	0,03	1,52	6,38	0,09	1,60	6,46	1,33	55	0,15
Angola														
1	6,1	4,80	6,30	330,0	4,70	1,6	0,0	5,12	7,14	7,14	12,26	58,0	24	1,5
2	5,8	1,90	4,90	62,0	0,90	0,6	0,0	1,98	1,66	1,66	3,64	46,0	8,0	1,0
3	6,0	2,40	4,70	140,0	2,60	1,3	0,0	2,31	4,26	4,26	6,57	65,0	33	1,6
Portugal														
1	5,5	4,40	21,1	499,2	1,00	0,74	-	0,23	3,49	-	3,25	93,3	-	-
2	6,1	1,60	24,0	93,60	3,07	0,27	-	0,38	3,74	-	3,69	98,9	-	-
3	5,6	1,14	13,3	42,90	1,25	0,23	-	0,36	1,66	-	1,29	78,1	-	-
4	5,1	1,92	14,0	124,8	0,72	0,36	-	0,83	1,56	-	0,73	47,0	-	-

SB: Soma de bases; **t:** capacidade de troca catiônica efetiva (CTC efetiva); **T:** Capacidade de troca catiônica total (CTC total); **V:** Saturação por bases; **Arg:** Argila; **Silt :** silte.

2.2. Amostragem

As coletas foram realizadas durante os meses de fevereiro, maio e setembro em quatro áreas selecionadas nas plantações de Minas Gerais e nos meses maio e setembro em Angola e Portugal (Tabela 1), respectivamente.

A escolha das árvores foi feita aleatoriamente dentro de parcelas de 1 ha. Em cada parcela foram selecionadas nove árvores, e a cada coleta foram amostradas três das nove árvores selecionadas. Em cada árvore foram coletadas três amostras simples de solo e raízes até uma distância de 1 m do tronco da planta, em forma triangular.

A amostragem do solo foi realizada à profundidade de 0 a 20 cm, após a retirada da serapilheira com auxílio de ancinhos. Após a limpeza da área em torno da planta, foi feita uma escavação até expor o sistema radicular da planta. Exposta parte do sistema radicular, foram coletados segmentos inteiros de raízes e separados do solo, puxando-os a partir do tronco até a extremidade mais jovem. Estas raízes foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em câmara fria a 10°C até o processamento, no máximo em 15 dias. Amostras de micorrizas típicas observadas durante a coleta foram acondicionadas em frascos contendo água e transportadas para o laboratório para observação e caracterização de ectomicorrizas típicas (ALEXANDER e HÖGBERG, 1986; AGERER, 1992).

As raízes foram lavadas e seccionadas em fragmentos com cerca de 6 cm que foram armazenados em frascos de vidro contendo FAA (formaldeído 100%: etanol 70% : Ácido acético 100% - 5:90:5) para a avaliação da colonização micorrízica.

A coleta do solo foi feita no mesmo local em que as raízes foram coletadas. Com a utilização de uma enxada e uma pá, foi aberto o perfil do solo e coletadas nove amostras simples em torno da planta, sendo peneiradas e misturadas em grupos de três para compor três amostras compostas por planta distribuídas em forma triangular até uma distância de 1m da base do tronco. As amostras foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em câmara fria 10 °C até o processamento.

2.3. Colonização ectomicorrízica

Para a avaliação da colonização por ectomicorrizas, amostras de fragmentos de raízes armazenadas em FAA (5: 90: 5) tiveram então seu tamanho reduzido para cerca de 2 cm e espalhadas em placa quadriculada, sendo a contagem de micorrizas

feita sob lupa binocular com aumento de 40 vezes (GIOVANNETTI e MOSSE, 1980). Os segmentos que apresentavam manto fúngico foram considerados como colonizados por fungos ectomicorrízicos.

2.4. Caracterização macroscópica das ectomicorrizas

Os tipos de ectomicorrizas foram caracterizados macroscopicamente baseando-se nas características morfológicas das ectomicorrizas frescas. Foram utilizadas a cor, a forma, o tipo de ramificação e a estrutura superficial das micorrizas, observadas sob lupa binocular (INGLEBY et al., 1990; AGERER, 1992).

2.5. Extração e amplificação do DNA total das ectomicorrizas

Para a análise molecular das comunidades de fungos ectomicorrízicos, foi extraído o DNA total das ectomicorrizas utilizando o Nucleospin 96 Plant II DNA extraction kit (Macheray-Nagel inc., Bethlehem, PA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% e por espectrofotometria para quantificação e certificação da qualidade para as demais análises. O DNA extraído foi então armazenado a -20 °C. As amostras de DNA foram então submetidas à técnica de amplificação Nested-PCR. Neste sentido, cada reação de PCR com volume de 50 µl continha 1X tampão *Go taq* reaction, 0,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,16 mg/ml de soro albumina bovina (BSA), 0,2 µM do oligonucleotídeo EF4f (GGAAGGGATGTATTTATTAG; SMIT et al. 1999), 0,2 µM do oligonucleotídeo EF3r (TCCTCTAAATGACCAGTTTG; SMIT et al. 1999), 0,5 µl de formamida e 1,25 U de *Go Taq* DNA polimerase. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados por e produzem fragmentos com cerca de 1540 pares de base.

As especificações de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1 min., anelamento a 47 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min.; Em seguida uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Para a segunda rodada de PCR foi utilizada uma alíquota de 5 µL do produto obtido na primeira rodada de PCR com as mesmas especificações do primeiro com exceção do oligonucleotídeo reverso utilizado que foi substituído pelo Fung5r (GTAAAGTCCTGGTTCCTCC; SMIT et al. 1999) com o grampo GC na sua extremidade 5' (MUYZER et al., 1993) formando o par EF4f/Fung5r-GC, que produz um fragmento com cerca de 603 pares de bases na sequência do rRNA 18S.

Os fragmentos obtidos foram diluídos na proporção de 1:3 para aplicação no DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) e para avaliação da diversidade de FMA. O gel de poliacrilamida para DGGE foi preparado da seguinte forma: duas soluções de gel, com 100% de desnaturante HI e 0% de desnaturante LO, foram preparadas a partir da combinação de uma solução estoque de bisacrilamida 40%, uma solução de TAE 50X, formamida e ureia. Foi formado um gel com concentração de 6% e desnaturação variando de 40% a 60% do topo para a base do gel. Este gel foi montado em suporte de DGGE Bio Rad e as amostras de PCR diluídas foram aplicadas nas canaletas do gel e submetidas a uma corrida com 60 V por 15 h em tampão TAE 1X a 60 °C. Após a corrida, o gel foi corado com Syber Gold 1X por 45 min e observado em transiluminador e a imagem do gel foi registrada.

2.6. Extração e contagem de esporos de FMA

Para a extração dos esporos, 100 g de solo foram misturados em água, assegurando que todos os agregados do solo estivessem devidamente destorroados e, deixados para decantar por algum tempo para a sedimentação de partículas maiores e pesadas. Após a decantação, a suspensão de solo foi passada por uma série de peneiras (350, 150 e 50 µm). O material foi então lavado várias vezes em água corrente até que a água ficasse transparente. Raízes e restolhos foram coletados na peneira de 350 µm de diâmetro, enquanto os esporos foram coletados em peneiras de 150 µm (considerados grandes) e 50 µm (considerados pequenos). Após a lavagem com água corrente, o material coletado nas peneiras de 150 e 50 µm foi centrifugado em água a 5000 x g por 3 minutos, para remover os restos orgânicos dispersos, e o sobrenadante descartado. Após esta centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em solução de sacarose 50% por forte agitação em tubos bem fechados. As amostras foram então centrifugadas novamente a 3000 x g por 2 minutos para separar os esporos dos componentes densos do solo.

Após a centrifugação, os esporos foram então purificados em peneiras de 150 e 50 µm e cuidadosamente lavados com água para remover a sacarose. A suspensão contendo os esporos foi então colocada em placa circular para a contagem (BRUNDRETT et al., 1996).

2.7. Identificação microscópica dos esporos de FMA

Para a caracterização morfológica e identificação dos esporos, foram preparadas lâminas microscópicas com uma gota de reagente de PVLG pura, e outra com o PVLG adicionada do reagente de Melzer, nas quais foram colocados esporos típicos e cobertos com lamínula, secas a temperatura ambiente por 72 h e em estufa a 30 °C por 48 h. As preparações em lâminas foram analisadas sob microscópio e os esporos identificados pelo método de identificação de fungos micorrízicos arbusculares do INVAM.

2.8. Extração e amplificação do DNA dos esporos de FMA

Para a análise molecular da diversidade de FMA, os esporos coletado do solo foram submetidos à extração de DNA, pelo Kit MoBio Power Soil, de acordo com as especificações do fabricante. As amostras de DNA foram então submetidas à técnica de amplificação Nested-PCR. Neste sentido, cada reação de PCR com volume de 50 µl continha 1X tampão *Go taq* reaction, 0,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,16 mg/ml de soro albumina bovina (BSA), 0,2 µM do oligonucleotídeo AM1 (5'- GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA- 3'; HELGASON et al., 1998), 0,2 µM do oligonucleotídeo NS31 (5'- TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'; SIMON et al., 1992) e 1,25 U de *Go Taq* DNA polimerase, gerando fragmentos de 580 pares de base de genes do rDNA que codificam para o rRNA 18S.

As especificações de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min.; desnaturação secundária a 94 °C por 45 s.; anelamento a 57 °C por 45 s. e extensão a 72°C por 1 min.; extensão final a 72°C por 30 min.; 35 ciclos de amplificação.

Para a segunda rodada de PCR foi utilizada uma alíquota de 5 µL do produto obtido na primeira ronda, com as mesmas especificações do primeiro com exceção da temperatura de anelamento que neste caso foi reduzida para 52 °C. A reação foi preparada da mesma forma que a primeira com substituição dos oligonucleotídeos anteriores pelo par constituído pelo NS31-GC (5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGC AAGTCTGGTGCC- 3'; KOWALCHUK et al., 2002) e Glo1 (5'- GCCTGCTTTAAACTCTA- 3'; CORNEJO et al., 2004). Os fragmentos obtidos foram diluídos na proporção de 1:3 para aplicação no DGGE (eletroforese em gel

com gradiente desnaturante) e para avaliação do perfil de diversidade de FMA. O gel para DGGE foi preparado da seguinte forma: duas soluções de gel, com 100% de desnaturante (HI) e 0% de desnaturante (LO), foram preparadas a partir da combinação de uma solução estoque de bisacrilamida 40%, uma solução de TAE 50X, formamida e uréia. Foi formado um gel de poliacrilamida com concentração de 8% e desnaturação variando de 40% a 60%, do topo para a base do gel. Este gel foi montado em suporte de DGGE Bio Rad e as amostras de PCR diluídas foram aplicadas nas canaletas do gel e submetidas a uma corrida com 60 V por 15 h em tampão TAE 1X a 60 °C. Após a corrida, o gel foi corado com Syber Gold 1X por 45 min. e observado sob luz ultravioleta, em transiluminador.

2.9. Análises estatísticas

Os dados de percentagem de colonização micorrízica, após transformação por $\arcsen (X/100)^{1/2}$, e de densidade de esporos de FMA foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O perfil de bandas foi submetido à análise de agrupamentos pelo método UPGMA, pelo sistema Bionumerics®, para determinação dos índices de identidade de nucleotídeos e construção do dendrograma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na região leste de Minas Gerais – Brasil observou-se a presença de ectomicorrizas em todas as áreas e em todas as amostras de sistema radicular de eucalipto avaliadas, o que vai ao encontro da teoria de que a associação micorrízica é regra e não exceção na natureza. A percentagem de colonização das raízes variou de acordo com o morfotipo de ectomicorriza formado, as condições climáticas do período de coleta (taxa de precipitação, temperatura e umidade relativa do ar), e as características físico-químicas dos solos das áreas de estudo, como o pH, o teor de nutrientes e de matéria orgânica no solo (Figuras 1; Tabelas 1 e 2).

A colonização total por ectomicorrizas foi maior na segunda época de coleta, em todas as áreas avaliadas (Figura 2), indicando um possível efeito da alteração nas condições climáticas na interação fungo-planta, uma vez que nesta época observaram-se baixas taxas de precipitação e redução na temperatura e umidade relativa do ar (Figura 1). É difícil, entretanto, determinar a influência relativa das características físicas, químicas e biológicas do solo na comunidade de fungos ectomicorrízicos, pois elas são interrelacionadas (JONES et al., 2003). Alterações na comunidade microbiana do solo podem ter efeito direto na formação de ectomicorrizas (GARBAYE e BOWEN, 1987; SUMMERBELL, 1987; FRIEDMAN et al., 1989) ou indireto, através de alterações na taxa de decomposição e mineralização de nitrogênio (JURGENSEN et al., 1997; FORGE e SIMARD, 2000; PRESCOTT et al., 2000). PARKER et al. (1983), estudando especificamente o efeito dos fatores físicos, demonstrou a existência de um efeito significativo da temperatura do solo na abundância de determinados FECM em *Pseudotsuga menziesii*. Em geral,

a temperatura ótima para a formação da associação micorrízica varia de 18 a 40 °C, sendo o ótimo para muitos fungos e espécies hospedeiras em torno de 30 °C (SMITH e READ, 1997). Entretanto, os efeitos da temperatura na colonização são complexos e as respostas podem variar com a planta hospedeira, o fungo e o ambiente (MILLER e SHARITZ, 2000; ENTRY et al., 2002). Não se observou o efeito do pH na colonização por ectomicorrizas em *Pinus banksiana* (McAFEE e FORTIN, 1987).

Em geral, as áreas com plantações mais velhas (BAT30 e IPA) apresentaram maiores percentagens de colonização por fungos ectomicorrízicos em relação às mais novas (BAT8 e SAB) (Figura 2). CAMPOS (2004) observou baixas percentagens de colonização por ectomicorrizas em plantações com idades entre 4 e 6 anos na sub-região adjacente às áreas aqui estudadas em relação à plantações com até 18 meses de idade. Dados observados em outras regiões do Brasil (BELLEI et al., 1992; SCHWAN, 1993) e na China (YINGLONG et al., 1998) também mostram a ocorrência de maior percentagem de colonização por ectomicorrizas em plantações mais velhas.

As plantas mais velhas possuem uma taxa de crescimento reduzida, e em condições de déficit hídrico aumentam a translocação de carboidratos para as raízes, o que além de produzir maior densidade de raízes finas pode aumentar a percentagem de colonização, visto que o principal benefício que o fungo obtém da planta nesta simbiose é a translocação de fotoassimilados para o seu crescimento (SOARES, 1993; KÄTTERER et al., 1995). De acordo com LYNCHAND WHISPPS (1990), MARSCHNER (1998) e BAREA et al. (2005), os exsudatos radiculares influenciam de forma determinante a diversidade de microrganismos na rizosfera. Plantas que se desenvolvem em solos com baixo teor de P, o que ocorre nos solos de Angola e Brasil (Tabela 2), podem exsudar compostos funcionais como ácidos orgânicos, ácido jasmônico, fosfatases e compostos fenólicos que estimulam a colonização e o desenvolvimento das micorrizas e influenciar a especificidade fungo-hospedeiro (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1989; SIQUEIRA et al., 1991; LAMBAIS, 2000; HINSINGER, 2001; KOIDE e MOSSE, 2004).

A variação da colonização ectomicorrízica total foi de 32% e 43% na área 1 (BAT30), enquanto na área 2 (BAT8) a variação da colonização ficou entre 15 a 24% (Figura 2). Estes dados indicam a possível influência da idade da planta no processo de associação, uma vez que estas áreas se encontram em locais próximos, com o mesmo tipo de solo, mesmas condições climáticas, e igual sistema de manejo

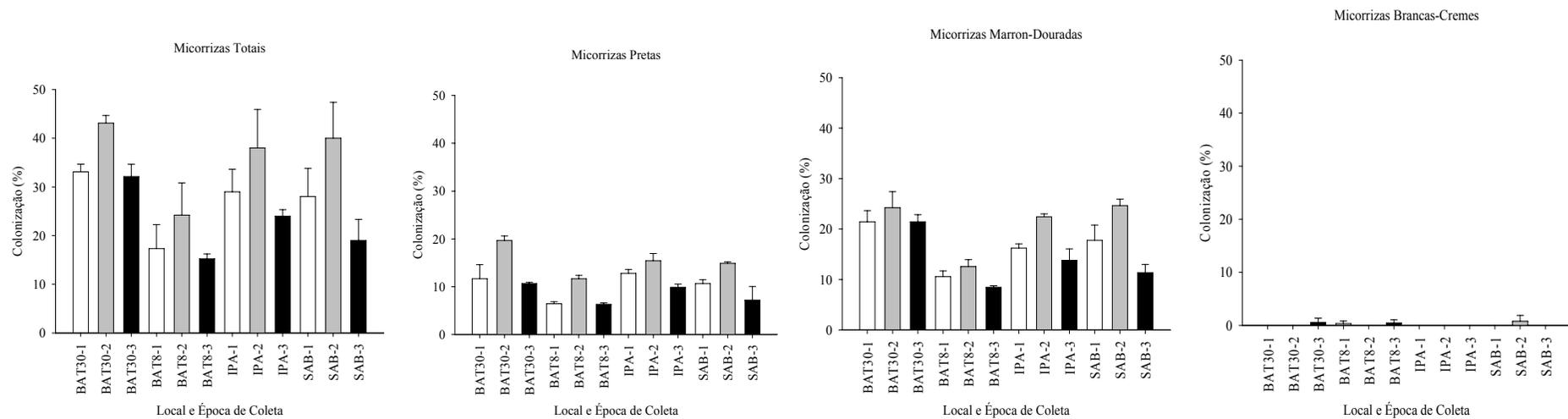


Figura 2 - Colonização de raízes por fungos ectomicorrízicos em plantações comerciais de eucalipto (Cenibra) em diferentes locais com diferentes idades [Projeto Batinga (BAT) 8 e 30 anos de idade; Projeto Ipanema (IPA) 20 anos de idade; Projeto Sabinópolis IV (SAB) 6 anos de idade], em três épocas do ano (1 – Jan/Fev; 2 – Abr/Mai e 3 – Set/Out) na região leste de Minas Gerais.

(Tabelas 1 e 2). Na área 3 (IPA), a maior porcentagem de colonização foi observada na segunda época de coleta, variando de 19 a 40%, o mesmo acontecendo na área 4 (SAB) com valores entre 24 e 38% (Figura 2), indicando a possibilidade da existência de interação entre as características de solo e a idade das plantas no processo de micorrização. Alguns FECM são restritos a plantas mais velhas, sendo incapazes de colonizar plantas jovens (JONES et al., 2003). Alguns tipos de ectomicorrizas associadas às mudas aumentam na medida em que a planta torna-se madura (DANIELSON, 1991; RICHTER e BRUHN, 1993; BRADBURY et al., 1998; BRADBURY, 1998; JONSSON et al., 1999). Alguns FECM observados em plantações mais velhas podem também ser encontrados em plantações mais jovens, mas não persistem na ausência de conexões com plantas mais velhas (KRANABETTER e FRIESEN, 2002). Portanto, a idade da planta pode ter efeito nas diferenças encontradas entre as comunidades de FECM de plantações mais velhas e mais jovens (JONES et al., 2003).

Nove morfotipos de ectomicorrizas foram observados nas áreas estudadas, sendo de cor preta, marrom, dourada e branca (Tabela 3; Figura 3). Observou-se maior incidência do morfotipo preto na segunda época de coleta, em todos os locais, e menor incidência na terceira época de coleta (Figura 2). Isto pode ser atribuído à sua maior, ou melhor, adaptabilidade às condições climáticas nesta época do ano, favorecendo assim o seu desenvolvimento e interação com a planta.

Tabela 3 - Caracterização macroscópica das ectomicorrizas encontradas nas raízes de plantas de eucalipto coletadas na região leste de Minas Gerais – Brasil e sua indicação na ilustração da Figura 3.

Morfotipo	Cor	Ramificação	Figura
1	dourada	monopodial simples	3a
2	branca	monopodial pinada	3b
3	preta	ramificação simples	3c
4	marrom	ramificação simples	3d
5	marrom	pinada irregular	3e
6	preta	monopodial pinada	3f
7	preta	monopodial simples	3g
8	preta	pinada irregular	3h
9	marrom	monopodial simples	3i

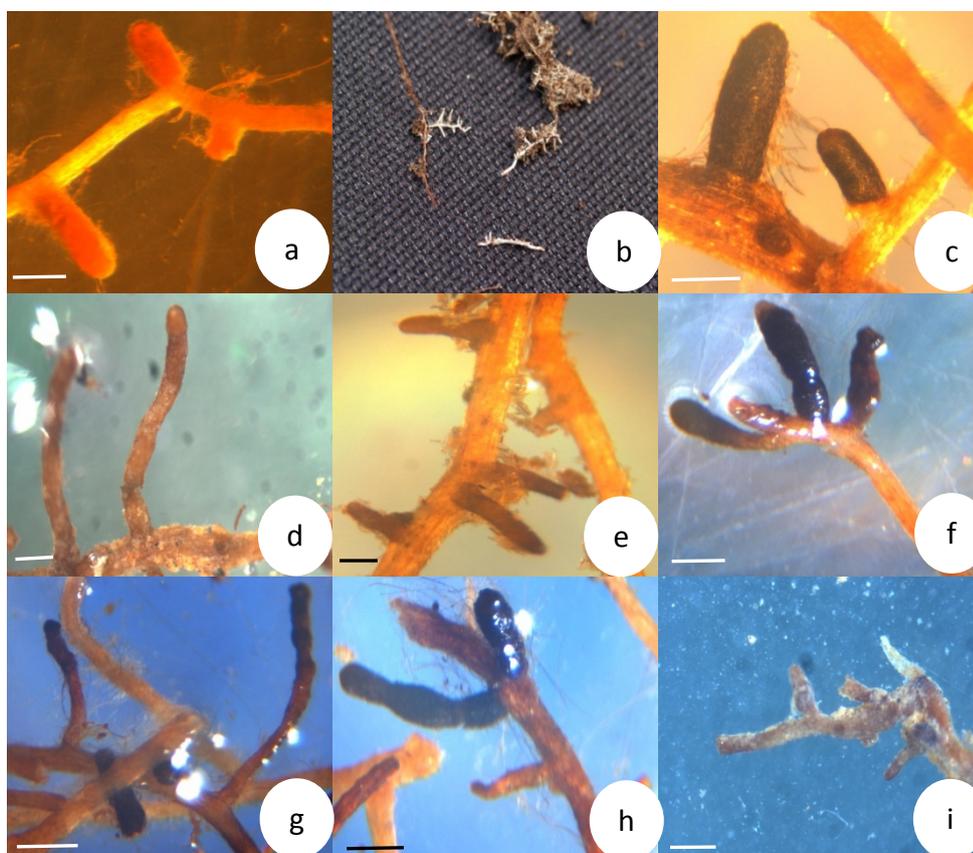


Figura 3 – Morfotipos de ectomicorrizas encontrados em povoamentos de eucalipto da região leste de Minas Gerais – Brasil. Escala = 0,5 mm

A maior colonização dos morfotipos pretos (20%) foi observada na área 1 e época 2, enquanto a menor (6%) foi observada na área 2, épocas 1 e 3 (Figura 2). Na área 2, não se observou diferença na colonização entre as épocas 1 e 3 (Figura 2).

Em relação aos morfotipos marrom-dourados, a maior colonização (25%) foi observada na área 4 e época 2, não havendo porém diferença em relação à encontrada na área 1 e época 2 (24%). A área 1 apresentou a maior colonização por este tipo de ectomicorrizas (Figura 2; Tabela 4). A colonização por ectomicorrizas do morfotipo branco foi inexpressiva, tendo sido observada uma ocorrência esporádica e sem qualquer tendência aparente (Figura 2). Entretanto, a maior colonização apresentada por este morfotipo (0,8%) foi observada na área 4 e época 2.

A avaliação da taxa de colonização por fungos ectomicorrízicos mostrou uma predominância dos morfotipos marrom-dourados em relação aos demais em praticamente todas as condições observadas (Figura 2; Tabela 4). Estes dados,

associados ao fato de terem sido observados no campo basidiocarpos de fungos do gênero *Pisolithus*, indicam a possibilidade de ocorrência de ectomicorrizas formadas por fungos deste gênero nesta região, dado que CAMPOS (2004) constatou a ocorrência de vários basidiocarpos do gênero *Pisolithus* spp. em plantações de eucalipto que haviam sido áreas de pastagens, de sub-regiões adjacentes às áreas aqui estudadas, e KASUYA et al. (2010) constataram a ocorrência de duas espécies deste fungo em plantações de eucalipto de Minas Gerais, tendo sido caracterizadas como *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus marmoratus*. As ectomicorrizas então encontradas tinham coloração predominantemente amarela-dourada, tendo ainda observado a ocorrência de grande número de ectomicorrizas nas áreas que apresentavam mais camadas de serrapilheira. A presença desta camada pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, principalmente em solos de baixa fertilidade (CONN e DIGHTON, 2000).

Tabela 4 – Médias da percentagem de colonização ectomicorrízica pelos morfotipos encontrados em relação ao tipo de solo das áreas plantadas com eucalipto. Comparações pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Morfotipos	Área			
	1	2	3	4
	-----%-----			
Pretos	0,38 a	0,29 b	0,36 a	0,33a
Marrom-douradas	0,49 a	0,33 c	0,43 b	0,43 b
Branco	0,02 a	0,02 a	0,00 a	0,02 a

Diferença não significativa para médias seguidas pela mesma letra na mesma linha

A análise do perfil de bandas gerado pelo DGGE mostrou que as ectomicorrizas do morfotipo branco encontradas nos povoamentos mais novos (BAT8 e SAB) têm alto índice de identidade formando um clado que possui, igualmente, alta identidade com o fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (Figura 4). De igual forma, o perfil de bandas das micorrizas e morfotipo branco do povoamento mais velho (BAT30) mostrou-se altamente idêntico ao perfil do fungo *Hydnangium* sp. e ambos formaram um clado com o fungo *Laccaria laccata* (Figura 4), mostrando a possível ocorrência destes fungos formando ectomicorrizas nas áreas estudadas.

COELHO (1993) e CAMPOS (2004) observaram a presença de três espécies distintas de *Scleroderma* em plantações comerciais de eucalipto de diferentes espécies e diferentes regiões de Minas Gerais. Além disso, foi demonstrada pela primeira vez a ocorrência do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. em povoamentos de *E. grandis* na região leste de Minas Gerais (CAMPOS, 2004).

O fato de ter-se observado uma diferenciação no perfil de bandas das ectomicorrizas de povoamentos mais jovens em relação a povoamentos mais velhos indica a possível influência da idade da planta no estabelecimento da associação. As micorrizas marrom-douradas coletadas nos três povoamentos avaliados, com exceção do povoamento Ipanema (IPA), mostraram identidade no perfil de bandas, tendo formado um clado com o isolado PT5 do fungo *Pisolithus* sp., e com menor identidade com o isolado FOF do mesmo fungo. De igual forma, observou-se identidade entre os perfis de bandas ectomicorrizas pretas dos povoamentos BAT8, BAT30 e SAB, tendo-se agrupado com o fungo *Cenococum graniforme* (Figura 4), mostrando a possível ocorrência destes fungos associados às raízes de eucalipto nestes povoamentos. Dado interessante foi observado entre as ectomicorrizas dos morfotipos marrom e preto coletadas no povoamento IPA, tendo formado um clado, apesar da marcante diferença morfológica observada (Figura 3), sem associação aparente com quaisquer dos fungos marcadores utilizados (Figura 4).

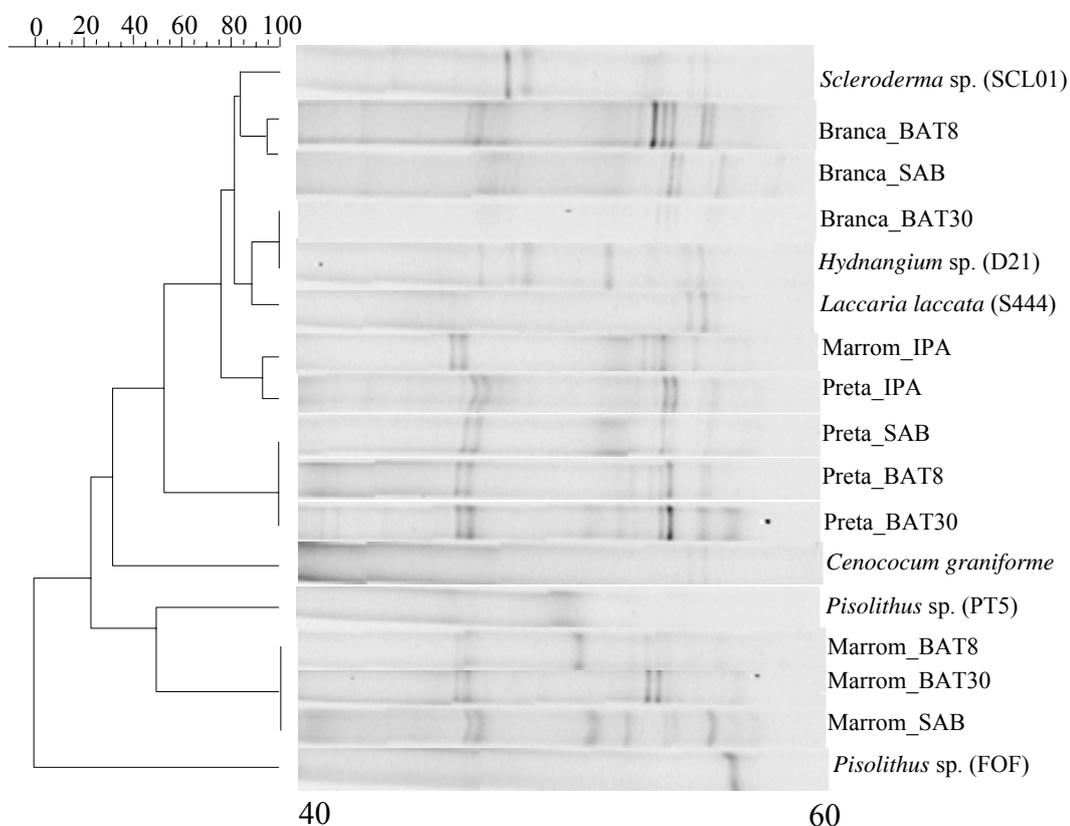


Figura 4 – Agrupamentos do perfil de bandas gerado pela técnica de DGGE, do produto do PCR a partir do rDNA 18S, no gel de poliacrilamida 6%. Em cada canaleta foram aplicados 5 μ L do produto do PCR nested, com o par de oligonucleotídeos EF4f/Fung5r+GC gerando um fragmento de 603 bp. **Marcadores** – *Pisolithus* sp.(PT5), *Cenococum graniforme*, *Pisolithus* sp.(FOF), *Scleroderma* sp.(SCL01), *Laccaria laccata* (S444), *Hydnangium* sp.(D21); **Amostras:** BAT8– Projeto Batinga 8 anos de idade; BAT30 – Projeto Batinga 30 anos de idade; IPA – Projeto Ipanema 20 anos de idade; SAB – Projeto Sabinópolis IV 6 anos de idade.

O alto índice de identidade no perfil observado neste agrupamento pode-se dever ao fato de serem espécies diferentes do mesmo gênero ou às diferentes respostas fisiológicas provocadas pela diferentes características do solo.

A caracterização morfológica dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), mostrou haver semelhanças na composição das comunidades dos solos estudados (Tabela 5). Entretanto, a ocorrência de um grande número de

esporos em estado avançado de degradação reduziu o número de espécies passíveis de serem identificadas. A análise molecular da diversidade de FMA mostrou semelhanças na composição das comunidades de FMA dos solos avaliados (Figura 5). O perfil de bandas gerado pela DGGE mostrou a existência de quatro bandas no solo do polígono florestal do Lubango – Angola; sete bandas nos solos do Montijo - Portugal, da Humpata – Angola e do projeto Batinga com plantas de 30 anos de idade – Brasil; dez bandas no solo do projeto Batinga com plantas de 8 anos de idade - Brasil, projeto Sabinópolis IV - Brasil e no solo de Aveiro – Portugal; nove bandas nos solos de Ganda – Angola, Ipanema - Brasil e Agueda - Portugal, e treze bandas no solo de Penamacor - Portugal (Figura 5).

A análise de agrupamento do perfil de bandas mostrou maior índice de identidade entre os solos de Aveiro e Batinga como povoamento de 8 anos em relação aos demais agrupamentos encontrados. O agrupamento mais dissimilar foi o formado entre os solos de SAB e IPA (Figura 5), fato que se justifica por terem tipos de solo diferentes, com conseqüente diferença nas características físico-químicas, além da diferença de altitude que pode influenciar os fatores climáticos locais (Figura 1, Tabela 2). Os solos dos povoamentos de Angola e do Brasil mostraram maior similaridade no perfil de bandas do DGGE em relação aos solos de Portugal (Figura 5). Estes resultados corroboram com o fato de a composição e estrutura das comunidades de fungos do solo serem influenciadas pelas condições climáticas e características do solo (CLAPP et al., 1995, 2002; ENTRY et al., 2002), pois, há uma grande semelhança entre as características do clima e solo de Angola e Brasil, quando comparados com Portugal.

Os dados do dendrograma mostram ainda que, apesar da tendência de agrupamento entre as amostras de Angola e Brasil, há diferenças claras na composição de FMA de alguns solos dentro de cada país (Figura 5). As amostras de Portugal mostraram-se todas diferentes entre si, sendo o solo de Penamacor o mais dissimilar em relação aos demais povoamentos (Figura 5). Apesar de não serem observadas bandas comuns a todos os solos estudados, existem várias bandas que ocorrem em solos de pelo menos dois dos três países, indicando que há semelhanças na estrutura das comunidades destes fungos em alguns dos locais estudados sendo, porém, os povoamentos de Portugal mais dissimilares em relação aos de Angola e Brasil.

A análise de variância mostrou diferenças na densidade de esporos das áreas de estudo em função do local de coleta.

Tabela 5 – Identificação morfológica dos esporos de FMA extraídos dos solos de florestas plantadas de eucalipto em Angola, Brasil e Portugal.

País	Época	Local	Identificação	
Brasil	1	Batinga 30	<i>Scutellospora</i> sp. <i>Glomus</i> sp. (formação de esporos em agregados, esporos de 53 µm, camada laminada de 2,5 -5,0 µm)	
	2	Batinga 30	<i>Acaulospora morrowiae</i>	
	3	Batinga 30	<i>Acaulospora morrowiae</i> <i>Acaulospora mellea</i>	
	1	Batinga 8	<i>Acaulospora mellea</i>	
	2	Batinga 8		
	3	Batinga 8		
	Angola	1	Ipanema	<i>Glomus</i> sp.(com características de bastonetes)
		2	Ipanema	<i>Glomus</i> sp.
		3	Ipanema	
		1	Sabinopolis IV	<i>Acaulospora mellea</i>
		2	Sabinopolis IV	
		3	Sabinopolis IV	
Angola		2	Ganda	<i>Glomus</i> sp. <i>Acaulospora mellea</i> <i>Acaulospora</i> sp.
		2	Lubango	<i>Glomus</i> sp. <i>Acaulospora mellea</i>
		2	Humpata	<i>Glomus</i> sp. <i>Acaulospora mellea</i> <i>Acaulospora</i> sp.
Portugal	3	Montijo	<i>Glomus</i> sp.	

Épocas de Coleta: 1- Janeiro/Fevereiro; 2 – Abril/Maio; 3 – Setembro/Outubro

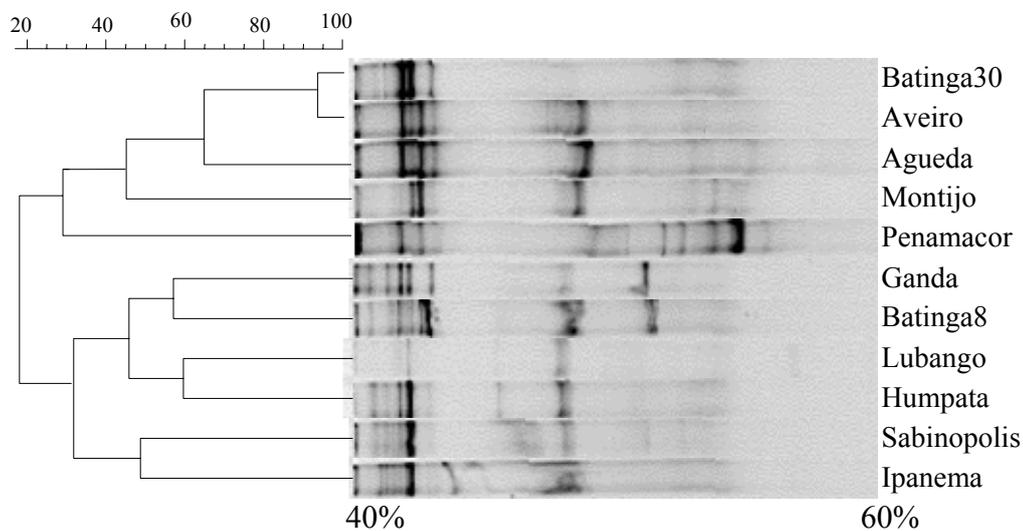


Figura 5 – Agrupamento do perfil de bandas gerado pelo DGGE, a partir do rDNA 18S de esporos de fungos micorrizicos arbusculares, no gel de poliacrilamida 8%. Em cada canaleta foram aplicados 5 μ L do produto do PCR nested, com o par de oligonucleotídeos Glo1/NS31+GC gerando um fragmento de 230 bp. Amostras – Angola (Polígono florestal do Lubango, Povoamento do IMAT – Humpata e de Ganda); Brasil (Projeto Sabinopolis IV, Projeto Ipanema, Protejo Batinga 8 anos e Projeto Batinga 30 anos); Portugal (Montijo, Aveiro, Agueda e Penamacor).

Os solos de Portugal apresentaram, em geral, os maiores valores de densidade de esporos, com exceção do solo do Montijo, cuja densidade foi inferior ou igual aos solos do Brasil e de Angola (Figura 6, Tabela 6). O maior valor foi observado no solo de Aveiro (5478 esporos/100g de solo) e o menor no solo de Sabinópolis (312 esporos/100g de solo). Com exceção de Sabinópolis, os valores observados nos solos de mata, foram maiores que os observados nas florestas de eucalipto em Angola e no Brasil (Figura 6), como se poderia esperar, devido à maior diversidade de espécies vegetais e da comunidade microbiana destes ecossistemas. Entretanto, estes valores foram inferiores aos observados para os solos de Portugal, com exceção dos valores do Montijo, fato que pode ser relacionado a diferenças de clima e solo ao nível de microssítios, devido a diferenças de altitude, temperatura e umidade relativa, além do

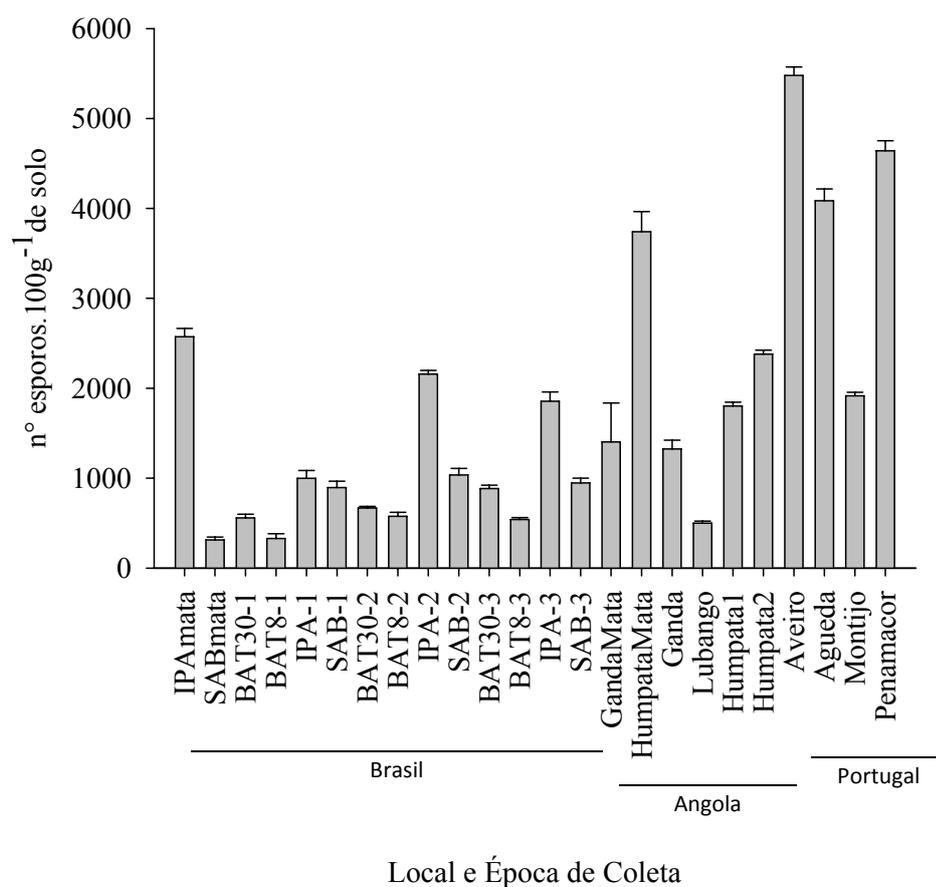


Figura 6 - Densidade de esporos totais de FMAs em solos sob plantação de eucalipto na região leste de Minas Gerais - Brasil (BAT8, BAT30, IPA e SAB), no sul de Angola (GAN, POL e IMAT) e em Portugal (Aveiro, Agueda, Montijo e Penamacor).

Tabela 6 – Densidade de esporos de FMA entre as áreas plantadas com eucalipto em Angola, Brasil e Portugal.

País	n° esporos.g ⁻¹ solo
Angola	150,1 a
Brasil	110,9 a
Portugal	403,0 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

índice de precipitação pluviométrica entre os locais de estudo dos países em questão.

Na comparação dentro de cada país, observou-se maior densidade de esporos nos solos de Ipanema, no Brasil, em relação aos demais. A segunda época de coleta foi a que mostrou os maiores valores em relação às outras duas épocas avaliadas (Figura 6; Tabelas 7 e 8). Estes dados mostram uma clara relação entre as condições climáticas e o aumento na densidade de esporos, pois, com estruturas de resistência e reprodução, sua produção tende a aumentar em situações de estresse ambiental, o que caracteriza esta época (Figura 1). Em relação aos solos de Angola, observou-se a influência da interação entre as características climática e o tipo de solo na densidade de esporos (Figura 1; Tabelas 1, 2 e 9), sendo claramente maior nos solos da Humpata (caracterizado pela elevada altitude e pluviosidade média anual superior a 1200 mm/ano) e Ganda (cuja precipitação pluviométrica média é de 900 mm/ano), em relação ao solo do Lubango. Um aspecto importante é o fato de o solo de Ganda apresentar maior teor de matéria orgânica e conseqüente maior disponibilidade de nutrientes no solo, o que reduz a incidência de fungos micorrízicos, justificando assim, os valores de densidade observados menores do que os do solo da Humpata. Para os solos de Portugal, observou-se uma clara diferença na densidade de esporos entre os locais estudados, sendo o solo de Aveiro o de maior densidade e o de Montijo o de menor densidade de esporos (Figura 6; Tabela 10).

A caracterização físico-química dos solos mostra que, de forma geral, os solos de Angola apresentam maior teor de nutrientes que os solos do Brasil, mas não os maiores valores de matéria orgânica (Tabela 2). O solo de Portugal apresenta os maiores valores de matéria orgânica e fósforo (P). A colonização e o número de esporos de FMA em solos de plantação de eucalipto têm uma correlação negativa com o teor de nutrientes dos solos, mostrando que o aumento no teor de nutrientes reduz a colonização e o número de esporos no solo (CAMPOS, 2004). O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são considerados os principais nutrientes que podem afetar a colonização, não por si só, mas pela combinação de vários fatores, como a forma em que são aplicados. A dependência micorrízica da planta, a habilidade de absorção de

Tabela 7 – Densidade de esporos de FMA, em função da época de coleta, entre as áreas plantadas com eucalipto na região leste de Minas Gerais, Brasil.

Época	n° esporos.g ⁻¹ solo
Jan/Fev	110,9 a
Abr/Mai	105,7 a
Set/Out	69,5 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente (p<0,01) pelo teste de Tukey.

Tabela 8 – Densidade de esporos de FMA, em função do local de coleta, entre as áreas plantadas com eucalipto na região leste de Minas Gerais, Brasil.

Local	n° esporos.g ⁻¹ solo
Ipanema	167,0a
Sabinopolis	95,9b
Batinga30	70,4Bc
Batinga8	48,1c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente (p<0,01) pelo teste de Tukey

Tabela 9 – Densidade de esporos de FMA entre as áreas plantadas com eucalipto na região sul de Angola.

Local	n° esporos.g ⁻¹ solo
Humpata	264,0a
Ganda	136,3ab
Lubango	49,9b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente (p<0,01) pelo teste de Tukey.

Tabela 10 – Densidade de esporos de FMA entre as áreas plantadas com eucalipto em Portugal.

Local	n° esporos.g ⁻¹ solo
Aveiro	547,8a
Agueda	464,1b
Montijo	408,5c
Penamacor	191,5d

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente (p<0,01) pelo teste de Tukey.

nutrientes, a habilidade do fungo em responder ao N e P, e o máximo de colonização micorrízica e esporulação por FMA ocorrem em condições de baixa fertilidade do solo (JONSSON et al., 2000; TRAJANO et al., 2001; PAMPOLINA et al., 2002; AZCÓN et al., 2003). Em florestas de *Salix alba* com mais de 10 anos de idade, as variáveis do solo não tiveram uma relação significativa com a média de raízes micorrizadas. Contudo, observou-se uma tendência de maior frequência de raízes micorrizadas em baixas concentrações de nutrientes e alto pH do solo entre locais com diferentes idades (PARÁDI e BAAR, 2006).

A caracterização e identificação morfológica dos esporos mostraram a ocorrência de gêneros *Glomus* e *Acaulospora* em quase todos os solos avaliados (Tabela 5). Foi observada a ocorrência do gênero *Scutellospora* apenas no solo do projeto Batinga – Brasil, com povoamento de 30 anos de idade. Duas espécies foram identificadas: *Acaulospora morrowiae* nos solos o projeto Batinga – Brasil e *Acaulospora mellea* nos solos do Brasil e Angola (Tabela 5), corroborando com a hipótese de que, dado o fato de haver características edafo-climáticas semelhantes, haveria semelhanças na estrutura da comunidade microbiana dos solos sob povoamento de eucalipto, especialmente de fungos micorrízicos.

CAMPOS (2004) constatou a presença de FMA associados às raízes de eucalipto em plantações comerciais de eucalipto na região leste de Minas Gerais, com taxas de colonização oscilando entre 3 a 77% e densidade de esporos entre 61 a 1100 esporos/100g de solo, estando o número de esporos correlacionado positivamente com a temperatura. Nas raízes colonizadas por FMA não foram encontrados arbúsculos, mas apenas vesículas e micélio. Sendo assim, uma vez que nas micorrizas formadas por fungos dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* não se observam vesículas (SMITH e READ, 1997), CAMPOS (2004) concluiu que há predominância de gêneros distintos destes formando associação com eucalipto na região leste de Minas Gerais, a exemplo de *Glomus* e *Acaulospora*.

A identificação de espécies e a quantificação da diversidade, riqueza e dominância são ainda limitadas a espécies esporulantes (DOUDS et al., 1999). Espécies não esporulantes podem ser detectadas através da técnica de culturas armadilhas, o que não fornece informação sobre a abundância relativa de espécies na amostra original. A descrição da comunidade, baseada na contagem e identificação de esporos é útil, mas ainda não reflete a contribuição total da biomassa de cada

espécie da comunidade (DOUDS et al., 1999). Assim, as técnicas moleculares podem fornecer informação mais acurada sobre a estrutura das comunidades.

A utilização do método de PCR-DGGE com oligonucleotídeos específicos para a região ITS do rDNA, mostrou-se eficiente para o estudo de espécies das famílias *Acaulosporaceae* e *Glomaceae* na rizosfera de plantas de milho (OLIVEIRA et al., 2009). Os dados obtidos por este método, associados à análise visual da colonização por FMA, mostrou que tanto o genótipo como o nível de P no solo tiveram influência na densidade total da população (número de esporos e colonização radicular) bem como na diversidade de espécies de FMA (número de bandas do DGGE). De forma geral, os resultados sugeriam que o nível de P pode influenciar na comunidade de FMA na rizosfera, além do que, a diferença na ocorrência de espécies micorrízicas pode depender do nível de exsudação radicular e da sinalização do genótipo sob condições de estresse de P (OLIVEIRA et al., 2009).

O método utilizado para a extração do DNA dos esporos, apesar de não ser específico, permitiu a extração de DNA suficiente para o processo de PCR, mesmo sem um grande rendimento. O kit mostrou-se rápido e de fácil manejo garantindo a obtenção de material genético suficiente para as análises moleculares desejadas.

4. CONCLUSÕES

A colonização por fungos ectomicorrízicos é maior em períodos mais secos.

Existe uma interação positiva entre as condições de clima e solos com a associação micorrízica, sendo a percentagem de colonização e a diversidade de ectomicorrizas maiores em plantações mais velhas.

Pelo menos quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares estão associadas ao eucalipto na região leste de Minas Gerais – Brasil, no sul de Angola e em Portugal, com predominância dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora*, sendo que as características do solo e clima associadas à idade da planta influenciam na densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares.

Há semelhanças na composição das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares em florestas plantadas de eucalipto de Angola, Brasil e Portugal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERER, R., 1992. Characterization of ectomycorrhiza. In: **Techniques of Mycorrhizal Research**. Ed. NORRIS, J. R., READ, D. J. e VARMA, A. K., San Diego. Academic Press, 25 - 74.
- ALEXANDER, I. J. e HÖGBERG, P., 1986. Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. **Plant Science**, 165: 1137 – 1145.
- AZCÓN, R., AMBROSANO, E. e CHAREST, C., 2003. Nutriente acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. **Plant Science**, 165: 1137 – 1145.
- BAREA, J.M., AZCÓN, R., AZCÓN-AGUILAR, C., 2005a. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot, F., Varma, S. (Eds.), **Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions**. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 195–212.
- BAREA, J.M., WERNER, D., AZCÓN-AGUILAR, C., AZCÓN, R., 2005b. Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbioses in sustainable agriculture. In: Werner, D., Newton, W.E. (Eds.), **Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 199–222.

- BELLEI, M. M., GARBAYE, J. e GILL, M., 1992. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (Southern Brazil). **Forest Ecology and Management**, 54: 205 – 213.
- BRADBURY, S.M., 1998. Ectomycorrhizas of lodgepole pine (*Pinus contorta*) seedlings originating from seed in southwestern Alberta cut blocks. **Canadian Journal of Botany**, 76: 213 – 217.
- BRADBURY, S.M, DANIELSON, R.M, VISSER, S. 1998. Ectomycorrhizas of regenerating stands of lodgepole pine (*Pinus contorta*). **Canadian Journal of Botany**, 76: 218 – 227.
- BRUNDRETT, M. C., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T. E MALAJCZUK, N., 1996. Working with mycorrhizas in forest and agriculture. **Camberra, Pirie**, 374 p.
- CAMPOS, D. T. S., 2004. Diversidade de fungos ectomicorrizicos em povoamentos de eucalipto. **Viçosa-MG: UFV, 82. Microbiologia – UFV**.
- CIFLORESTAS, 2010. **Centro de inteligência em florestas**, Brasil. <http://www.ciflorestas.com.br>.(acesso em dezembro 2010).
- COELHO, F. C., BORGES, A. C., NEVES, J. C. L., BARROS, N. F. e MUCHOVEJ, R. M., 1997. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., nos municípios de Paraopeba, Bocaiuva e João Pinheiro, Minas Gerais. **Revista Árvore**, 21: 393 – 404.
- COLLINS, S.L., SINSABAUGH, R.L., CRENSHAW, C., GREEN, L., PORRAS-ALFARO, A., STURSOVA, M., ZEGLIN, L.H., 2008. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. **Journal of Ecology**, 96: 413–420.
- CORNEJO, P., AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M., FERROL, N., 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 241: 265–270.

- CLAPP, J. P., YOUNG, J. P. W., MERRYWEATHER, J. W. e FITTER, A. H., 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist**, 130: 259 - 265.
- CLAPP, J. P., HELGASON, T., DANIELL, T. J. e YOUNG, J. P. W., 2002. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal communities. In: **Mycorrhizal Ecology** (eds van der Heijden MGA, Sanders IR). Springer Verlag, Heidelberg, p. 201 - 224.
- CONN, C. e DIGHTON, J., 2000. Litter quality influences on decompositions, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, 32: 489 – 496.
- DANIELSON, R.M. 1991. Temporal changes and effects of amendments on the occurrence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of conifers growing in oil sands tailing and coal spoil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 35: 261 – 281.
- DOUDS, D.D., MILLNER, P.D., 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 74: 77 - 93.
- EL KARKOURI, K., MARTIN, F., EMMANUEL DOUZERY, J. P. e MOUSAUN, D., 2005. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. **Microbiological Research**, 160: 47 – 52.
- ENTRY, J. A., RYGIEWCZ, P. T., WATRUD, L. S. e DONNELLY, P. K. I., 2002. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. **Advances in Environmental Research**, 7: 123 – 138.
- EOM, A-H, HARTNETT, D. C. e WILSON, G. W. T., 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. **Oecologia**, 122: 435 – 444.
- FINLAY, R., 2007. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis—With special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 146: 215–223.

- FORGE, T.A., SIMARD, S.W., 2000. Trophic structure of nemotode communities, microbial biomass, and nitrogen mineralization in soils of forests and clearcuts in the southern interior of British Columbia. **Canadian Journal of Soil Science**, 80: 401–410.
- FRIEDMAN, J., HUTCHINS, A., LI, C.Y., PERRY, D.A., 1989. Actinomycetes inducing phytotoxic or fungistatic activity in a Douglas-fir forest and in an adjacent area of repeated regeneration failure in southwestern Oregon. **Biologia Plantarum**, 31: 487 – 495.
- GARBAYE, J., BOWEN, G.D., 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. **Canadian Journal of Forest Research**, 17: 941 – 943.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., BRANZANTI, B., GIANINAZZI, S., 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, 7: 243–255.
- GIOVANNETTI, M. e MOSSE, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, 84: 489 – 500.
- GRAZZIOTTI, P. H., 1995. Colonização de raízes de clones de híbridos de eucalipto por fungos micorrízicos. **Viçosa-MG: UFV, 87. Microbiologia – UFV.**
- GUIMARÃES, L. G., 1993. Caracterização de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus* spp. Em Aracruz e São Mateus, Espírito Santo e Dionísio, Minas Gerais. **Viçosa-MG: UFV, 46. Microbiologia – UFV.**
- HELGASON, T., DANIELL, T.J., HUSBAND, R., FITTER, A.H., YOUNG, J.P.W., 1998. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, 394: 431.
- HINSINGER, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant Soil**, 237: 173–195.
- HOGBERG, M. N. e HOGBERG, P., 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated

- roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. **New Phytologist**, 154: 791–795.
- HORTON, T. R. e BRUNS, T. D., 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of douglas fir and bishop pine. **New Phytologist**, 139: 331–339.
- HORTON, T. R., BRUNS, T. D. e PARKER, V.T., 1999. Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. **Canadian Journal of Botany**, 77: 93–102.
- HUSBAND, R., HERRE, E. A., TURNER, S. L., GALLERY, R. e YOUNG, J. P. W., 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical Forest. **Molecular Ecology**, 11: 2669 – 2678.
- INGLEBY, K., MASON, P. A., LAST, F. T. e FLEMING, L. V., 1990. Identification of ectomycorrhizas. **ITE Research**, 111.
- JONSSON, L., DAHLBERGH, A., NILSSON, M-C., KÅRÉN, O., ZACKRISSON, O., 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. **New Phytologist**, 142: 151 –162.
- JONSSON, L., ANDERRS, D. e TOR-ERIK, B., 2000. Spatio temporal distribution of an ectomycorrhizal community in an oligotrophic Swedish *Picea abies* forest subjected to experimental nitrogen addition: above – and below – ground views. **Forest Ecology and Management**, 132: 143 – 156.
- JURGENSEN, M.F., HARVEY, A.E., GRAHAM, R.T., PAGE-DUMROESE, D.S., TONN, J.R., LARSEN, M.J., JAIN, T.B., 1997. Impacts of timber harvesting on soil organic matter, nitrogen, productivity, and health of inland northwest forests. **Forest Science**, 43: 234 –251.
- KASUYA, M.C.M., COELHO, I.S., CAMPOS, D.T.S., ARAÚJO, E.F., TAMAI, Y. E., MIYAMOTO, T., 2010. Morphological and molecular characterization of *Pisolithus* in soil under eucalyptus plantations in brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34: 1891 – 1898.

- KÄTTERER, T., FABIÃO, A., MADEIRA, M., RIBEIRO, C., STEEN, E., 1995. Fine-root dynamics, soil moisture and soil carbon content in a Eucalyptus globulus plantation under different irrigation and fertilisation regimes. **Forest Ecology and Management**, 74: 1-12.
- KOIDE, R.T., MOSSE, B., 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, 14: 145–163.
- KOWALCHUK, G.A., DE SOUZA, F.A., VAN VEEN, J.A., 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, 11: 571 – 581.
- KRANABETTER, J.M., FRIESEN, J., 2002. Ectomycorrhizal community structure on western hemlock seedlings transplanted from forests into openings. **Canadian Journal of Botany**, 80: 861 – 868.
- KRPATA, D.; MUHLMANN, O.; KUHNERT, R.; LADURNER, H.; GOBL, F. e PEINTNER U., 2007. High diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos uva-ursi* in subalpine and alpine zones: Potential inoculum for afforestation. **Forest Ecology and Management**, 250: 167–175.
- LAMBAIS, M.R., 2000. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila, G.K., Douds, D.D. (Eds.), **Current Advances in Mycorrhizae Research**. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minneapolis, pp. 46–60.
- LANDEWEERT, R., HOFFLAND, E., FINLAY, R., KUYPER, T. W. e VAN BREEMEN, N., 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends in Ecology & Evolution**, 16: 248–254.
- LYNCH, J.M., WHIPPS, J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant Soil**, 129: 1–10.
- MARSCHNER, H., 1998. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, 56: 203–207.

- MASSICOTTE, H. B., MOLINA, R., TACKABERRY, L. E., SMITH, J. E. e AMARANTHUS, M. P., 1999. Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from three adjacent forest sites by five host species. **Canadian Journal of Botany**, 77: 1053–1076.
- McAFEE, B.J., FORTIN, J.A., 1987. The influence of pH on the competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. **Canadian Journal of Forest Research**, 17: 859 – 864.
- MILLER, S. P. S. e SHARITZ, R. R., 2000. Manipulation of flooding and arbuscular mycorrhiza formation influences growth and nutrition of two semiaquatic grass species. **Functional Ecology**, 14: 738 – 748.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, 59: 695 – 700.
- NARA, K., 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. **New Phytologist**, 169: 169–178.
- OLIVEIRA , C. A., SÁ, N.M.H., GOMES, E.A., MARRIEL, I. E., SCOTTI, M.R., GUIMARÃES, C.T., SCHAFFERT, R. E., ALVES, V.M.C., 2009. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied soil ecology**, 41: 249 – 258.
- ONGUENE, N. A. 2000. Diversity and dynamics of mycorrhizal associations in tropical rain forests with different disturbance regimes in south Camerron. **PhD Thesis Wageningen University** – Netherlands, 167 p.
- OSAKI, F., 1994. Microbacias, Práticas de Conservação do Solo. **Curitiba, PR:** (Ed), 603 p.
- PAMPOLINA, N. M., DELL, B. e MALAJCZUK, N., 2002. Dynamics of ectomycorrhizal fungi in an *Eucalyptus globulus* plantation: effect of phosphorus fertilization. **Forest Ecology and Management**, 158: 291 – 304.

- PASQUALINI, D., UHLMANN, A., STÜRMER, S.L., 2007. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. **Forest Ecology and Management**, 245: 148–155.
- PARÁDI, I. e BAAR, J., 2006. Mycorrhizal fungal diversity in willow forests of different age along the river Waal, The Netherlands. **Forest Ecology and Management**, 237: 366 – 372.
- PARKE, J.L., LINDERMAN, R.G., TRAPPE, J.M., 1983. Effect of root zone temperature on ectomycorrhiza and vesicular–arbuscular mycorrhiza formation in disturbed and undisturbed forest soils of southwest Oregon. **Canadian Journal of Forest Research**, 13: 657 – 665.
- PORRAS-ALFARO, A., HERRERA, J., SINSABAUGH, R.L., ODENBACH, K.J., LOWREY, T., NATVIG, D.O., 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 2805–2813.
- PRESCOTT, C.E., BLEVINS, L.L., STALEY, C.L., 2000. Effects of clear-cutting on decomposition rates of litter and forest floor in forests of British Columbia. **Canadian Journal of Forest Research**, 30: 1751 –1757.
- READ, D.J. e PEREZ-MORENO, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? **New Phytologist**, 157: 475–492.
- RICHTER, D.L., BRUHN, J.N., 1993. Mycorrhizal fungus colonization of *Pinus Resinosa* Ait. transplanted on northern hardwood clearcuts. **Soil Biology and Biochemistry**, 25: 355 – 369.
- SALES, N. L. P., 2001. Modelo para estudo da diversidade genética em populações naturais de *Pisolithus* spp. **Lavras - MG: UFLA, 95. Fitopatologia – UFLA.**
- SAKAKIBARA, S. M., JONES, M. D., GILLESPIE, M., HAGERMAN, S. M., FORREST, M. E., SIMARD, S. W. e DURRALL, D. M., 2002. Acomparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RLFP analysis. **Mycological Research**, 106: 868 – 878.

- SANTOS, V. L., MUCHOVEJ, R. M., BORGES, A. C., NEVES, J. C. e KASUYA, M. C. M., 2001. Vesicular-arbuscular-ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Journal of Brazilian Microbiology**, 32: 81 – 86.
- SCHWAN, K. R. F., 1993. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de *Eucalyptus* spp., na região de Viçosa, Minas Gerais. **Journal of Brazilian Microbiology**, 24: 232 – 238.
- SIMON, L., LALONDE, M., BRUNS, T.D., 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular–arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, 58: 291–295.
- SIQUEIRA, J.O., NAIR, M.G., HAMMERSCHMIDT, R., SAFIR, G.R., 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **CRC Crit. Review of Plant Science**, 10: 63–121.
- SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J.D., WERNARS, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environment Microbiology**, 65: 2614-2621.
- SMITH, S.E., READ, D.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. **Academic Press**, San Diego, California.
- SOARES, I., 1993. Eficência de utilização de frações de fósforo e partição de carboidratos em eucalipto com ectomicorrizas. **Viçosa-MG: UFV, 127. Solos e Nutrição de Plantas – UFV**.
- SPECHT, R. L., 1996. The influence of soil on the evolution of eucalypts. In: **Nutrition of *Eucalyptus***. ed. ATTIWELL, P. M. e ADAMS, M. A., Collingwood, Australia. CSIRO Publishing, 60 p.
- SUMMERBELL, R.C., 1987. The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* in vitro. **New Phytologist**, 105: 437 – 448.

- TRAJANO, M. A. B., BORGES, A. C., KASUYA, M. C. M., TÓTOLA, M. R. e NOVAIS, R. F., 2001. Suprimento de P e formação de micorrizas em mudas de eucalipto em sistema de raízes divididas. **Revista Árvore**, 25: 192 – 201.
- YINGLONG, L.C., MINGQIN, G., FENGZHEN, W. e DELL, B. 1999. Mycorrhizal succession and inoculants efficiency of dual inoculation on *Eucalyptus urophylla*. **Forestry Studies in China**, 1: 16 – 21.

CAPITULO II

**Estrutura e composição das comunidades de fungos totais em solos de florestas
plantadas de eucalipto do Brasil, de Angola e de Portugal**

RESUMO

A introdução de plantações florestais de eucaliptos em Angola e no Brasil ocorreu durante o período colonial, a partir de Portugal, para facilitar a obtenção de produtos florestais de primeira necessidade. Considerando as condições em que o processo de introdução do eucalipto ocorreu, provavelmente parte da população microbiana dos locais de origem foi transportada para as áreas de introdução das plantações. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o perfil da comunidade fúngica de solos florestais na região sul de Angola, sudeste do Brasil (leste de Minas Gerais), e da região de Montijo, Portugal. Para analisar a diversidade fúngica, solos de cada região foram amostrados e submetidos a análises físico-químicas. Após a caracterização dos solos, estes foram submetidos à extração de ácidos nucléicos totais. O DNA total obtido foi quantificado e submetido à técnica de Nested-PCR, onde foram obtidos fragmentos de DNA de aproximadamente 1540 pb na primeira rodada e 603 pb na segunda, ambos correspondendo ao rDNA 18S. O fragmento de 603 pb foi purificado e ligado ao vetor plasmidial pGEM T-easy, para transformação das células ultracompetentes de *E. coli* e obtenção das bibliotecas plasmidiais, um total de 1800 clones, correspondendo 600 clones a cada comunidade região-específica, e uma parcela destes clones foi submetida ao sequenciamento. A análise dos dados mostrou a ocorrência de 34 espécimes de fungos do solo, distribuídas em 28 gêneros, dentre os quais cinco de fungos micorrízicos. O solo de Angola apresentou o maior número de indivíduos (44) e o solo de Portugal o menor número (26). Entretanto, o solo do Brasil foi o que apresentou a maior diversidade de fungos. Dois fungos ocorreram em todos os solos avaliados, um dos quais é o fungo micorrízico arbuscular, *Glomus* sp. Concluiu-se que a comunidade de fungos do solo do município de Guanhões, região leste de Minas Gerais no Brasil, apresenta maior diversidade de espécies em relação às comunidades dos solos do município de Lubango, região sul de Angola e Montijo – Portugal, apresentando em comum uma significativa abundância de fungos micorrízicos arbusculares do gênero *Glomus* nas florestas plantadas de eucalipto de Angola, Brasil e Portugal.

Palavras-chave: Eucalipto, rDNA18S, Diversidade, *Glomus* sp., Nested-PCR.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de plantações florestais em áreas previamente utilizadas para a agricultura pode contribuir para restabelecer a biodiversidade (LINDENMAYER e HOBBS, 2004; BHAGWAT et al., 2008). Os ecossistemas florestais cobrem aproximadamente 40% da superfície terrestre (WARING e RUNNING, 2007) e as florestas plantadas ocupam cerca de 5% desta área (FAO 2002). Espera-se que de forma geral as áreas de reflorestamento tenham um aumento de 140 milhões de hectares em 2005 para mais de 180 milhões de hectares até 2020 (FAO, 2006). As plantações florestais, particularmente com *Eucalyptus e Pinus*, têm sido tradicionalmente promovidas pelo seu potencial de reduzir a salinidade em solos secos (HARPER et al., 2007) e as concentrações de CO₂ e N₂O atmosférico (LIVESLEY et al., 2009). Além disso, tem sido amplamente reconhecida a sua contribuição global na conservação de mamíferos, pássaros e anfíbios (LINDENMAYER e HOBBS, 2004; BHAGWAT et al., 2008). O efeito do reflorestamento nas comunidades bacterianas do solo é bem conhecido, contudo sabe-se relativamente pouco sobre o seu efeito nas comunidades fúngicas (JESUS et al., 2009).

As plantações florestais de eucaliptos em Angola e no Brasil foram introduzidas durante o período colonial, pelos portugueses, para facilitar a obtenção de produtos florestais de primeira necessidade em menor espaço de tempo, além de reduzir a pressão sobre a exploração de florestas nativas, reservando-as à exploração madeireira. Tendo em conta as condições em que o processo de introdução do eucalipto ocorreu, é possível que parte da população microbiana dos locais de origem

do material introduzido tenha igualmente sido transportada para as novas áreas de plantação ou que as espécies vegetais estimulem determinados grupos de microrganismos. Além dos fatores de escala local, o padrão espacial das populações microbianas do solo é influenciado por processos populacionais como reprodução e dispersão (ETTEMA e WARDLE, 2002).

Assume-se ainda que os microrganismos tenham distribuição cosmopolita devido a sua grande população, curto tempo de geração e capacidade de dispersão (GREE e BOHANNAN, 2006). Assim, sugere-se que, tendo em conta as particularidades edafo-climáticas intrínsecas (BRACELPA, 2010; MINADER, 2009), as comunidades microbianas hoje encontradas em plantações de eucalipto nestes três países apresentam aspectos semelhantes na sua composição e estrutura. Estudos recentes, baseados em técnicas moleculares, apresentam evidências da diversidade microbiana do solo em larga escala (GREEN e BOHANNAN, 2006; ZHOU et al., 2008).

A medida da estrutura genética de fungos ectomicorrízicos em média escala (< 2 km) foi relacionada à limitação na dispersão dos esporos (PEAY et al., 2007; CARRICONDE et al., 2008), sustentando assim predições de que populações fúngicas do solo estariam particularmente suscetíveis a perdas em habitat de grande escala devido à sua pequena dispersão e colonização em relação às bactérias, e mantendo a noção de que a conservação da diversidade genética de fungos requer a conservação do habitat de cada hospedeiro em uma grande faixa geográfica (GEHRING et al., 1998; HEDLUND et al., 2004).

Apesar de já haver estudos sobre a diversidade microbiana do solo, ainda pouco se sabe sobre as reais consequências destas ações para as comunidades fúngicas, contudo, a conversão de florestas nativas mistas em plantações de monocultura parece exercer influência na diversidade de fungos micorrízicos (CHAPELA et al., 2001; BASTIAS et al., 2007).

As comunidades de fungos do solo exercem funções essenciais nos processos biogeoquímicos como a ciclagem de carbono e nutrientes nas florestas (DIGHTON, 2003). Recentes estudos indicam uma função dominante dos fungos em processos-chaves em solos secos (BENNETT et al., 2009). COLLINS et al. (2008) apresentaram evidências do envolvimento de fungos na decomposição, transformação de nitrogênio e translocação de nutrientes entre plantas e crostas biológicas do solo semi-árido, argumentando que os fungos assumem importância

funcional particular em solos secos, pois podem manter o seu metabolismo mesmo em altas temperaturas e em baixo potencial de água em relação às bactérias. No Brasil já têm sido feitos estudos visando entender a estrutura das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do solo, para um efetivo manejo sustentável de sistemas agro-florestais, especialmente em solos ácidos e com baixo teor de P (PASQUALINI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Apesar de a compreensão atual da dinâmica e estrutura das comunidades de fungos de solos florestais ser ainda relativamente limitada, a extração direta do DNA e a observação do perfil molecular das comunidades do solo pela amplificação por PCR dos genes correspondentes ao rRNA e das regiões espaçadoras têm fornecido dados interessantes (ANDERSON e CAIRNEY, 2004). A extração direta de RNA do solo, seguida pela síntese de cDNA pela transcriptase associada à técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) e o perfil da comunidade fornecem informações significativas especialmente para fungos ativos no solo. Para isso são utilizados oligonucleotídeos específicos tanto para genes que codificam para o rRNA 18S, como para a região ITS do rDNA (GIRVAN et al., 2004; PENNANEN et al., 2004; ANDERSON e PARKIN, 2007).

Pelo fato de as comunidades de fungos do solo constituírem uma reserva significativa de biodiversidade em ecossistemas florestais e por sustentarem processos vitais para o funcionamento dos ecossistemas como a decomposição de resíduos de plantas, ciclagem de nutrientes e estímulo ao crescimento das plantas (BRIDGE e SPOONER, 2001; OLIVEIRA et al., 2009), é necessário maior conhecimento sobre a influência do reflorestamento sobre as comunidades de fungos para um manejo e produção sustentável de florestas (CARSON et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o perfil da comunidade fúngica de solos florestais na região sul de Angola, leste de Minas Gerais –, Brasil e de Montijo – Portugal, que têm em comum extensas áreas de eucalipto e algumas semelhanças nas características climáticas e do solo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização das áreas estudadas

Antes de se proceder à coleta de amostras, foi submetido ao Ministério da Agricultura do Brasil – MAPA, um requerimento para importação de material para pesquisa científica, tendo-se obtido a permissão de importação nº318/2008 de 29 de outubro de 2008.

Foram coletadas amostras de solo de três locais, sendo uma para cada país, selecionadas de acordo com as características físico-químicas do solo, como valor de pH e tipo de solo. Dos plantios comerciais de eucalipto, pertencentes à empresa CENIBRA – Celulose Nipo-Brasileira S.A., localizados na região leste do Estado de Minas Gerais foi selecionado o solo do Município de Guanhães (projeto Sabinópolis IV). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo *aw*, tropical chuvoso, clima de savana, com chuvas no verão e inverno seco (OSAKI, 1994); De Angola foi selecionado o solo do Polígono Florestal do Instituto de Desenvolvimento Florestal (área 2 – POL). O clima da região é altitude com chuvas no verão e inverno seco, com altitude média de 1800 m, precipitação média anual de 1000 mm, temperatura média de 18 °C e umidade relativa média de 75%. Dos solos de Portugal foi selecionado o solo do Montijo, originário do plantel e eucalipto da Portucel - Soporcel de clima mediterrâneo, temperado com influência oceânica e precipitação média anual de 600 mm, altitude de 14 m, temperatura média anual de 16 °C e umidade relativa de 80%, com verão seco e quente e inverno úmido. O sistema de amostragem foi o mesmo apresentado nas seções 2.1, 2.2 do capítulo 1. As amostras do solo foram armazenadas em câmara fria a 10 °C até o processamento.

2.2. Extração e amplificação do DNA total do solo

Para a análise molecular das comunidades de fungos do solo, as amostras de cada solo foram homogeneizadas para formação de uma amostra composta para cada local e retirada uma alíquota de 1 g para extração do DNA total do solo. A extração foi realizada com a utilização do Kit MoBio Power Soil, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% e por espectrofotometria para quantificação e certificação da qualidade para as demais análises. O DNA extraído foi então armazenado a -20 °C. As amostras de DNA foram então submetidas à técnica de amplificação Nested-PCR. Neste sentido, cada reação de PCR com volume de 50 µl continha 1X tampão *Go taq* reaction, 0,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,16 mg/ml de soro albumina bovina (BSA), 0,2 µM do oligonucleotídeo EF4f (GGAAGGGATGTATTTATTAG; SMIT et al. 1999), 0,2 µM do oligonucleotídeo EF3r (TCCTCTAAATGACCAGTTTG; SMIT et al. 1999), 0,5 µl de formamida e 1,25 U de *Go Taq* DNA polimerase, produzindo fragmentos do rRNA 18S com cerca de 1540 pares de base.

As especificações de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1 min., anelamento a 47 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min. Em seguida uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Para a segunda rodada de PCR foi utilizada uma alíquota de 5 µL do produto obtido na primeira rodada de PCR com as mesmas especificações do primeiro com exceção do oligonucleotídeo reverso utilizado que foi substituído pelo Fung5r (GTAAAGTCCTGGTTCCC; SMIT et al. 1999) formando o par EF4f/Fung5r, produzindo um fragmento com cerca de 603 pares de bases na sequência do rRNA 18S (Figura 1).

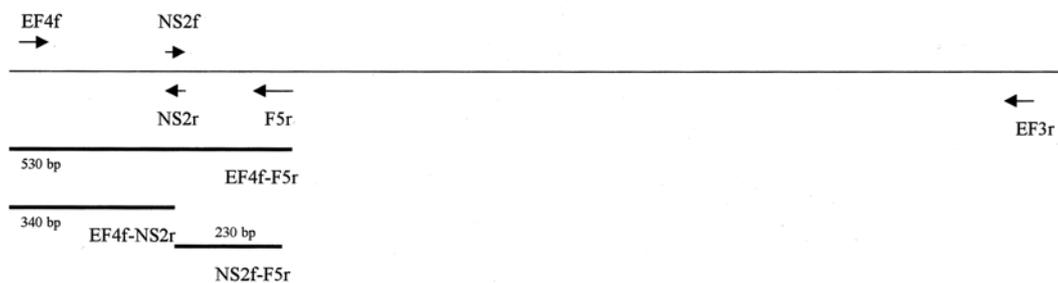


Figura 1 – Localização dos oligonucleotídeos e do produto da amplificação na sequência do rDNA 18S de fungos (SMIT et al., 1999).

Os fragmentos de DNA obtidos na segunda rodada de PCR foram extraídos do gel e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System de acordo com as especificações do fabricante. Os fragmentos eluídos foram armazenados a -20 °C para as análises subseqüentes.

2.3. Obtenção das bibliotecas plasmidiais correspondentes às comunidades fúngicas de cada solo

Para a construção das bibliotecas de clones correspondentes a cada amostra de solo analisada, os fragmentos de 603 pb purificados foram clonados em vetor pGEM T-easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi incubada *overnight* a 16 °C, posteriormente, processou-se a transformação com células ultra-competentes (INOUE et al., 1990). Uma alíquota de 100 µL das culturas de células transformantes foi plaqueada em meio LB/Ampicilina/X-Gal e incubada em câmara de crescimento a 37 °C *overnight*. Em seguida foram selecionadas as colônias brancas e transferidas para novas placas com meio LB para construção da biblioteca clonal. As placas da biblioteca foram incubadas em câmara de crescimento a 37 °C *overnight* e em seguida armazenadas a 4 °C para análises subseqüentes. Para obtenção de material para sequenciamento, foram escolhidos clones da biblioteca de forma aleatória, sendo então, submetidos à amplificação por PCR, pela transferência uma célula/colônia de cada clone para uma solução de reação de 50 µl constituída por 1X tampão *Go taq* reaction, 0,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,16 mg/ml de albumina bovina (BSA), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; SCHABEREITER-GURTNER et al. 2001), 0,2 µM

do oligonucleotídeo M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; SCHABEREITER-GURTNER et al. 2001) e 1,25 U de *Go Taq* DNA polimerase. As especificações de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 48 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min.; Em seguida, uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, uma alíquota de 5 µL do produto do PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% para avaliar a qualidade e quantificar o DNA amplificado. As amostras que apresentaram apenas uma banda foram então selecionadas para sequenciamento.

2.4. Análises estatísticas

As sequências foram analisadas pela ferramenta BLAST, disponível no banco de dados do NCBI para avaliação de homologia das sequências. A partir dos dados de homologia foi feita uma curva de rarefação para avaliação de robustez. A análise de diversidade foi feita utilizando-se os índices de riqueza de espécies (H') e equitabilidade (J) de Shannon Weiner e, os índices de dominância (D) e diversidade (D_s) de Simpson.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ácidos nucleicos foram extraídos com sucesso das amostras de solo das três florestas plantadas de eucalipto avaliadas. A amplificação por PCR gerou produtos de RNA 18S de 1540 pb no primeiro ciclo e 603 pb no segundo ciclo. O processo de purificação do produto do PCR foi eficiente para produzir DNA suficiente para os processos de transformação e sequenciamento (Figura 2). O processo de transformação possibilitou a criação de uma biblioteca clonal, permitindo a seleção 600 clones para cada um dos três solos avaliados, tendo-se ao final um total de 1800 clones na biblioteca. A análise dos dados do sequenciamento mostrou a ocorrência de 34 espécimes de fungos do solo, distribuídas em 28 gêneros, dentre os quais cinco de fungos micorrízicos. A extração de DNA do solo tem sido empregada com sucesso para demonstrar alterações nas comunidades de fungos do solo e/ou em comunidades de fungos ectomicorrízicos em resposta a práticas de manejo como a remoção da serapilheira e do húmus ou repetidos ciclos de queimada (SMIT et al., 2003; BASTIAS et al., 2006a, 2006b). Esta técnica também tem permitido revelar como os compostos derivados da planta podem influenciar as comunidades fúngicas da rizosfera e identificar diferenças nas comunidades de fungos de solos florestais e povoamentos vegetais adjacentes (KOWALCHUK et al., 2006). Além disso, atualmente tem sido aplicada para analisar comunidades fúngicas do solo sob florestas nativas mistas e plantações florestais de espécies nativas (ANDERSON et al., 2003; HE et al., 2005; SINGH et al., 2006). A persistência de rDNA de fungos metabolicamente inativos indica que as comunidades avaliadas

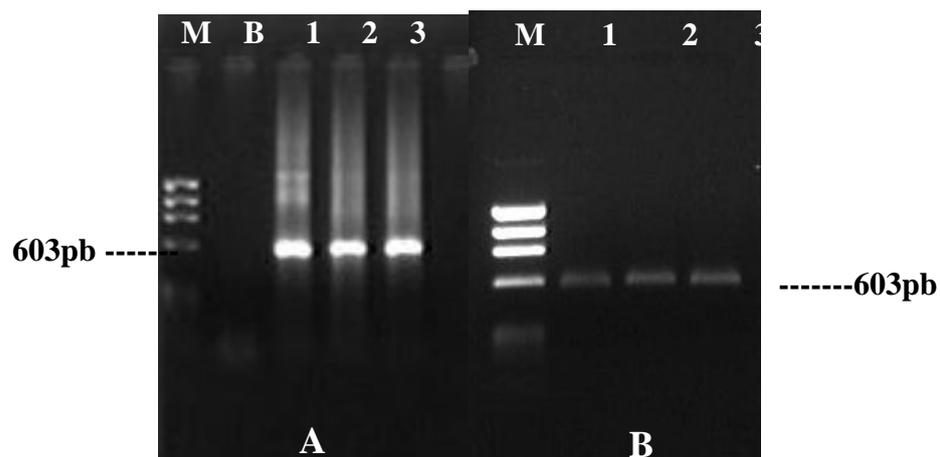


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto do PCR Nested (A) e do DNA purificado partir do produto do PCR Nested (B), de amostras do solo de Angola (1), Brasil (2) e Portugal (3) amplificadas com os oligonucleotídeos EF4f e Fung5r. M – Marcador ϕ X174 DNA/Hae III (100ng); B – branco.

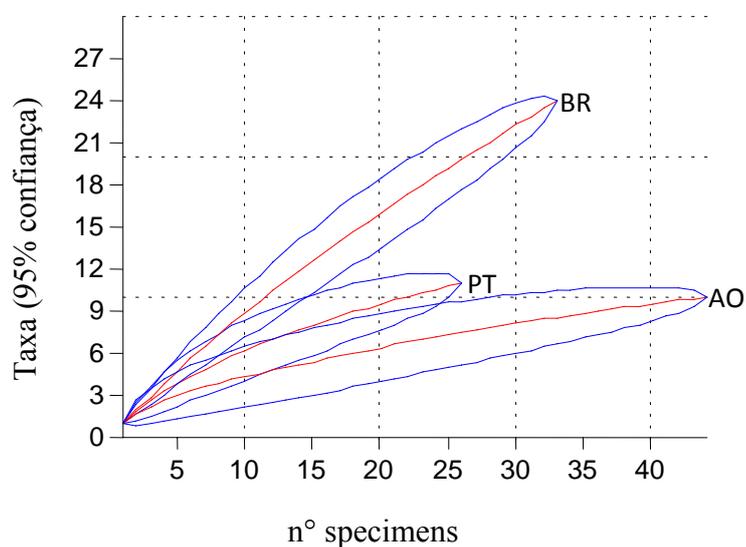


Figura 3 – Curva de rarefação para análise da diversidade de fungos de amostras do solo de Angola (AO), Brasil (BR) e Portugal (PT)

compreendem fungos ativos e inativos (PENNANEN et al., 2004; ANDERSON e PARKIN, 2007).

O solo de Angola apresentou o maior número de espécimes (44) e o solo de Portugal o menor número (26). O solo do Brasil foi o que apresentou a maior diversidade de fungos (Figura 3). Foi observada ainda, a ocorrência de 11 espécies nos solos de Angola, 23 espécies no solo do Brasil e 12 espécies no solo de Portugal. Três espécies de fungos ocorreram em todos os solos avaliados, sendo um deles o fungo micorrízico arbuscular *Glomus* sp. (Tabela 1), mostrando a sua grande dispersão. Além disso, cinco espécies mostraram-se comuns aos solos de Angola e Brasil (Tabela 1).

Os dados aqui obtidos revelam uma maior identidade na composição de fungos dos solos de Angola e do Brasil, em relação ao solo de Portugal, sugerindo que as características do clima e do solo afetam a estrutura e composição das comunidades microbianas do solo (CARSON et al., 2010; BENNETT et al., 2009; ALLISON et al., 2007), apesar da ocorrência de alguns gêneros, *Laccaria*, *Glomus*, *Sclerotium*, *Aspergillus* e *Ganoderma* comuns a dois ou a todos solos avaliados.

A despeito de terem espécies de fungos em comum, observa-se uma diferença significativa nos índices de diversidade dos solos de Angola e do Brasil, com o solo do Brasil apresentando melhores índices, estando os índices do solo de Portugal, de forma geral mais próximo dos do Brasil do que de Angola (Tabela 2). O solo de Angola apresenta menor índice de diversidade de espécies e conseqüentemente maior índice de dominância, o que implica menor equitabilidade da comunidade, sendo alta a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente na comunidade pertençam à mesma espécie. Fatores como a idade do plantio, a espécie de eucalipto plantada, as características climáticas na época de coleta e diferenças de altitude influenciam na diversidade de fungos do solo (TURNER et al., 1999; SMITH et al., 2002; JONES et al., 2003; CHEN e XU, 2006; BASTIAS et al., 2007), o que aqui pode ser observado analisando as características dos locais avaliados e as diferenças dos índices de diversidade obtidos (Tabelas 2 e 3). Os baixos valores de pH, e no teor de P, K, Ca e Mg no solo do Brasil em relação aos solos de Angola e de Portugal (Tabela 4), podem ser conseqüência da sua maior diversidade de espécies e conseqüentemente alta competição por nutrientes, fruto da maior atividade metabólica neste solo em relação aos outros (SMITH et al., 2002; JONES et al., 2003).

Tabela 1 – Fungos que ocorrem em solos de florestas plantadas de eucalipto em Angola (AO), Brasil (BR) e Portugal (PT), identificados a partir da análise de homologia de seqüências.

Identificação por Homologia	AO	BR	PT	Identidade (%)	Nº acesso NCBI	Referência
<i>Aphanoascus cinnabarinus</i>	-	+	-	99	AB015788	Sugiyama et al.(2002)
<i>Armillaria ostoyae</i>	-	+	-	98	AJ307598	
Ascomycete sp. MV_19C strain LMSA1.08.027	-	-	+	100	EF638698	Burgaud et al.(2009)
<i>Aspergillus</i> não cultivável clone neuFun19	+	+	+	94	FN394533	Michaelsen et al. (2010)
<i>Byssolophis sphaerioides</i>	-	-	+	100	GU456296	
<i>Chaetothyriales</i> sp.	-	-	+	100	FJ538969	Mayer et al.(2009)
<i>Corioloopsis byrsina</i>	+	-	-	100	FN666089	
Fungo ectomicorrízico sp. AR-Ny2	-	+	-	99	AY884238	
<i>Eimeriidae</i> sp. clone Amb_595	-	+	-	100	EF023285	Lesaulnier et al.(2008)
<i>Elaphomyces</i> sp. LoBuglio 100 ^a	-	+	-	99	ELZRGOAA	LoBuglio et al.(1996)
<i>Fabrella tsugae</i>	-	+	-	99	AF106015	Gernandt et al.(1999)
<i>Ganoderma australe</i>	+	+	-	100	AF026629	Hibbett et al. (1997)
<i>Ganoderma tsugae</i>	+	+	-	99	AY705969	
<i>Glomus</i> sp. não cultivável clone R6-17	+	+	+	100	FN645959	
<i>Heteroconium chaetospora</i>	-	-	+	99	DQ521604	Narisawa et al.(2007)
<i>Laccaria amethystina</i>	+	+	-	99	AF287837	Hibbett et al.(2000)
<i>Laccaria ochropurpurea</i>	-	+	-	98	AY654886	
<i>Mortierella hyalina</i>	-	+	-	100	AY1574931	Weber et al.(2003)
<i>Mortierella minutíssima</i>	-	+	-	99	EU736292	Hoffmann et al.(2009)
<i>Paecilomyces javanicus</i>	-	+	-	100	AB099944	
<i>Penicillium glabrum</i>	-	+	-	100	GU227342	
<i>Penicillium lagena</i>	-	+	-	98	AB032070	
<i>Phacellium paspali</i>	-	-	+	98	GU214669	Crous et al.(2009)
<i>Ramularia acroptili</i>	-	+	-	100	GU214689	
<i>Readeriella mirabilis</i>	+	+	-	100	EU754110	Gruyter et al.(2009)
<i>Rhizochaete filamentosa</i>	+	-	-	98	AY219398	Greslebin et al.(2004)
<i>Rhizoctonia fragariae</i>	-	+	-	100	AJ863511	
<i>Rhizoctonia</i> sp. AG-A	+	-	-	98	RHZSN2R	
<i>Sarcinomyces</i> sp.	-	-	+	98	AJ888458	
<i>Sclerotium</i> sp BSC-97.	+	+	-	99	AF010303	Hurek et al.(1997)
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i>	-	-	+	99	AY526476	
<i>Tremellaceae</i> sp.	-	+	-	100	EF023881	Luangsa-ard et al.(2004)
<i>Tremellaceae</i> não cultivável clone Amb_1333	-	+	-	100	EF023881	Lesaulnier et al.(2008)
<i>Trichoderma viride</i>	-	-	+	99	AJ783929	Berg et al.(2005)
Fungo não cultivável Hardwood2C12F	+	+	+	98	EU657225	Lauber et al. (2008)

Tabela 2 – Índices de diversidade de fungos dos solos de Angola, Brasil e Portugal identificados por homologia de sequências.

Índice	Angola	Brasil	Portugal
Simpson_1-D	0,69	0,94	0,82
Dominância_D	0,31	0,06	0,18
Shannon_H	1,56	3,03	2,05
Equitabilidade_J	0,68	0,95	0,85

ALLISON et al. (2007) mostraram que uma pequena diferença no pH por si só pode influenciar significativamente a composição de fungos do solo. Assim, os valores de pH dos solos aqui avaliados (Figura 2) podem ser considerados como um dos fatores determinantes para as diferenças encontradas na composição das comunidades de fungos obtidos. Além disso, parece plausível que diferenças na composição das comunidades de fungos do solo estejam relacionadas à localização geográfica das plantações florestais (BENNETT et al., 2009).

Em geral, as plantações de eucalipto pelo mundo foram introduzidas em áreas anteriormente povoadas por florestas nativas e é evidente que esta alteração no uso da terra traz alterações no teor de matéria orgânica do solo e resulta em mudanças quantitativas e qualitativas no “pool” de carbono e nitrogênio, assim como nas propriedades biológicas do solo (BAUHUS et al., 1998; TURNER et al., 1999; SMITH et al., 2002; CHEN et al., 2005; CHEN e XU, 2006; BASTIAS et al., 2007).

A técnica de extração direta e clonagem do DNA do solo, associada à amplificação por PCR e ao sequenciamento, mostrou-se eficiente para acessar a diversidade de fungos do solo, sendo recomendável para avaliar a estrutura da composição das comunidades de fungos do solo. HE et al (2005) constataram que, apesar de um número limitado de clones investigado, a extração direta do DNA associada à clonagem do rDNA 18S e a técnica de sequenciamento, mostra diferenças nas comunidades de fungos do solo sob florestas subtropicais naturais e a primeira rotação da plantação de *Araucaria cunninghamii*. Além disso, PENNANEM et al. (2004) e ANDERSON e PARKIN (2007) verificaram que os perfis gerados a partir de região ITS de vários solos foram significativamente diferentes, sugerindo diferenças entre a comunidade fúngica total do solo e aqueles fungos que estavam ativos no momento da amostragem.

Tabela 3 - Caracterização das áreas de estudo, abrangendo solos sob plantio de eucalipto com diferentes idades, na região leste de Minas Gerais – Brasil, região sul de Angola e região do Montijo em Portugal

País	Idade do Povoamento	Espécie	Coordenadas Geográficas	Material genético	Manejo	Tipo de solo ⁽³⁾	Altitude (m)	Município
Brasil	6 anos	<i>E. urograndis</i>	018°35'40.2" S 042°57'22.7" WO	Clone	Cultivo mínimo	LAd1	855	Guanhães
Angola	>20 anos	<i>E. grandis</i>	14°58'48.4"S 13°26'59.3"E	Semente	Cultivo mínimo	LAd1	2003	Lubango
Portugal	> 5 anos	<i>E. globulus</i>	-	Clone	Cultivo mínimo	Arenossolo háplico	-	Montijo

⁽³⁾ LAd1; Latossolo Amarelo Distrófico típico, textura muito argilosa, A moderado, álico, caulinitico, hipoférrico.

Tabela 4 - Caracterização físico-química dos solos sob plantio de eucalipto com diferentes idades, na região leste de Minas Gerais – Brasil, região sul de Angola e região do Montijo em Portugal

Área/País	pH	Matéria Orgânica ²	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	Arg	Silt/Arg
	(H ₂ O) ¹	dag dm ⁻³	-----mg dm ⁻³ -----			-----cmol _c dm ⁻³ -----				-----%-----				
Guanhães(BR)	5,18	1,96	0,90	14,06	0,01	0,03	1,52	6,38	0,09	1,60	6,46	1,33	55	0,15
Lubango(AO)	5,8	1,90	4,90	62,0	0,90	0,60	0,0	1,98	1,66	1,66	3,64	46,0	8,0	1,0
Montijo(PT)	5,6	1,14	13,3	42,90	1,25	0,23	-	0,36	1,66	-	1,29	78,1	-	-

SB: Soma de bases; **t:** capacidade de troca catiônica efetiva (CTC efetiva); **T:** Capacidade de troca catiônica total (CTC total); **V:** Saturação por bases; **Arg:** Argila; **Silt:** silte.

Apesar de não ser absoluto, o perfil da comunidade de fungos do solo baseado na extração direta do RNA do solo é tido como método útil para indicar aqueles fungos que são metabolicamente ativos (ANDERSON e PARKIN, 2007). A análise do perfil do rRNA 18S gerado pelo DGGE de vários solos mostrou diferenças significativas nas comunidades de fungos do solo de diferentes florestas nativas de *Eucalyptus* e *Pinus*, indicando quais dos fungos do solo estavam ativos no momento da amostragem (BASTIAS et al., 2007). Entretanto, o DGGE pode não separar devidamente fragmentos que apresentam mobilidade similar e, assim, não detectar o taxa dominante em uma amostra de solo (KOWALCHUK et al., 2006). PENNANEN et al. (2004) observaram não haver diferenças entre o perfil gerado pelo DGGE do rDNA de fungos de solos, mostrando que as comunidades de fungos totais e fungos ativos do solo pode ser altamente similar sob certas circunstâncias.

A conversão de florestas mistas em monocultura reduz a diversidade de fungos ectomicorrízicos (DUNSTAN et al., 1998). BASTIAS et al. (2007), investigando as comunidades de fungos do solo em dois tipos de florestas por várias técnicas moleculares, observaram que a conversão da floresta nativa de *Eucalyptus* para plantação de *Pinus* pode alterar significativamente a estrutura da comunidade total e de fungos ativos do solo.

4. CONCLUSÕES

A estrutura das comunidades de fungos sob plantios comerciais de eucalipto em solos de Angola, Brasil e Portugal é diferente, apesar de apresentarem algumas espécies em comum.

A comunidade de fungos do solo do município de Guanhães, região leste de Minas Gerais no Brasil, apresenta maior diversidade de espécies em comparação com as comunidades fúngicas dos solos do município do Lubango, região sul de Angola e Montijo, Portugal.

A técnica de extração direta e clonagem do DNA do solo, associada ao sequenciamento é útil e eficiente para acessar a diversidade das comunidades de fungos de solos florestais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há grande diversidade de fungos em plantios comerciais de eucalipto, incluindo os fungos micorrízicos. Esta diversidade, entretanto, é influenciada pelas condições de clima e solo, pela idade das plantas e pelo tipo de manejo. A colonização por fungos ectomicorrízicos mostrou-se maior em períodos mais secos, indicando a importância desta associação para a planta em condições de estresse.

Apesar da estrutura geral das comunidades de fungos sob plantios comerciais de eucalipto em solos de Angola, Brasil e Portugal ser diferente, observou-se a existência de espécimes em comum, sendo que a comunidade de fungos do solo do Brasil apresenta maior diversidade de espécies em relação às comunidades dos solos de Angola e Portugal. Além disto, os dados obtidos mostraram semelhanças na estrutura das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares nas três florestas estudadas, com a ocorrência de pelo menos quatro espécies em comum, com predominância dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora*.

A técnica de extração direta e clonagem do DNA do solo, associada ao sequenciamento, é útil e eficiente para acessar a diversidade das comunidades de fungos de solos florestais.

Este trabalho permitirá o delineamento de projetos de parceria visando o manejo e desenvolvimento sustentável dos povoamentos de eucalipto, nos três países, pela ampliação das amostragens em escala e a associação das técnicas clássicas e moleculares permitindo um conhecimento ainda maior da estrutura e composição das comunidades de fungos neste ecossistema.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, V.J., YERMAKOV, Z., MILLER, R.M., JASTROW, J.D., MATAMALA, R., 2007. Using landscape and depth gradients to decouple the impact of correlated environmental variables on soil microbial community composition. **Soil Biology and Biochemistry**, 39: 505–516.
- ANDERSON, I.C., CAIRNEY, J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, 5: 769–779.
- ANDERSON, I.C., PARKIN, P.I., 2007. Detection of active soil fungi by RTPCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological Methods**, 68: 248–253.
- ANDERSON, I.C., CAMPBELL, C.D., PROSSER, J.I., 2003. **Environmental Microbiology**, 5: 1121–1132.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **BRACELPA**, 2010.
- BASTIAS, B.A., ANDERSON, I.C., XU, Z., CAIRNEY, J.W.G., 2007. RNA- and DNA-based profiling of soil fungal communities in a native Australian eucalypt forest and adjacent *Pinus elliotti* plantation. **Soil Biology & Biochemistry**, 39: 3108–3114.
- BASTIAS, B.A., HUANG, Z.Q., BLUMFIELD, T., XU, Z.H., CAIRNEY, J.W.G., 2006a. Influence of repeated prescribed burning on the soil fungal community in an eastern Australian wet sclerophyll forest. **Soil Biology & Biochemistry**, 38: 3492–3501.

- BASTIAS, B.A., XU, Z.H., CAIRNEY, J.W.G., 2006b. Influence of long-term repeated prescribed burning on mycelial communities of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 172: 149–158.
- BAUHUS, J., PARE´, D., CO´TE´, L., 1998. Effects of tree species, stand age and soil type on soil microbial biomass and its activity in a southern boreal forest. **Soil Biology and Biochemistry**, 30: 1077–1089.
- BENNETT, L.T., KASEL, S., TIBBITS, J., 2009. Woodland trees modulate soil resources and conserve fungal diversity in fragmented landscapes. **Soil Biology and Biochemistry**, 41: 2162–2169.
- BHAGWAT, S.A., WILLIS, K.J., BIRKS, H.J.B., WHITTAKER, R.J., 2008. Agroforestry: a refuge for tropical biodiversity? **Trends in Ecology and Evolution**, 23: 261 - 267.
- BOSSIO, D.A., GIRVAN, M.S., VERCHOT, L., BULLIMORE, J., BORELLI, T., ALBRECHT, A., SCOW, K.M., BALL, A.S., PRETTY, J.N., OSBORN, A.M., 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. **Microbial Ecology**, 49: 50 - 62.
- BRIDGE, P., SPOONER, B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, 232: 147 - 154.
- CARRICONDE, F., GRYTA, H., JARGEAT, P., MOUHAMADOU, B., GARDES, M., 2008. High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. **Molecular Ecology**, 17: 4433–4445.
- CARSON, J.K., GLEESON, D.B., CLIPSON, N., MURPHY, D.V., 2010. Afforestation alters community structure of soil fungi. **Fungal Biology**, 114: 580 – 584.
- CHAPELA, I.H., OSHER, L.J., HORTON, T.R., HENN, M.R., 2001. Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. **Soil Biology and Biochemistry**, 32: 1733–1740.

- CHEN, C.R., XU, Z.H., 2006. On the nature and ecological functions of soil soluble organic nitrogen (SON) in forest ecosystems. **Journal of Soils and Sediments**, 6: 63–66.
- CHEN, C.R., XU, Z.H., ZHANG, S.L., KEAY, P., 2005. Soluble organic nitrogen pools in forest soils of subtropical Australia. **Plant and Soil**, 277: 285–297.
- OLIVEIRA , C. A., SÁ, N.M.H., GOMES, E.A., MARRIEL, I. E., SCOTTI, M.R., GUIMARÃES, C.T., SCHAFFERT, R. E., ALVES, V.M.C., 2009. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, 41: 249 – 258.
- COLLINS, S.L., SINSABAUGH, R.L., CRENSHAW, C., GREEN, L., PORRAS-ALFARO, A., STURSOVA, M., ZEGLIN, L.H., 2008. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. **Journal of Ecology**, 96: 413–420.
- DIGHTON, J., 2003. Fungi in Ecosystem Processes. **Marcel Dekker**, New York, 424pp.
- DUNSTAN, W.A., DELL, B., MALAJCZUK, N., 1998. The diversity of ectomycorrhizal fungi associated with introduced *Pinus* spp. in the Southern Hemisphere, with particular reference to Western Australia. **Mycorrhiza**, 8: 71–79.
- ETTEMA, C.H., WARDLE, D.A., 2002. Spatial soil ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, 17: 177–183.
- FAO, 2002. World Agriculture: towards 2020/2030 summary report. **Food and Agriculture Organisation of the United Nations**, Rome.
- FAO, 2006. Global planted forests thematic study: results and analysis. **Forest Plantations Thematic Papers**. FAO, Rome.
- GEHRING, C.A., THEIMER, T.C., WHITHAM, T.G., KEIM, P., 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. **Ecology**, 79: 1562–1572.

- GIRVAN, M.S., BULLIMORE, J., BALL, A.S., PRETTY, J.N., OSBORN, A.M., 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 2692–2701.
- GREEN, J., BOHANNAN, B.J.M., 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, 21: 501–507.
- HARPER, R.J., BECK, A.C., RITSON, P., HILL, M.J., MITCHELL, C.D., BARRETT, D.J., SMETTEM, K.R.J., MANN, S.S., 2007. The potential of greenhouse sinks to underwrite improved land management. **Ecological Engineering**, 29: 329 - 341.
- HE, J., XU, Z., HUGHES, J., 2005. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on the 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, 247: 91–100.
- HEDLUND, K., GRIFFITHS, B., CHRISTENSEN, S., SCHEU, S., SETALA, H., TSCHARNTKE, T., VERHOEF, H., 2004. Trophic interactions in changing landscapes: responses of soil food webs. **Basic and Applied Ecology**, 5: 495–503.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 69: 23-28.
- JESUS, E.D.C., MARSH, T.L., TIEDJE, J.M., MOREIRA, F.M.D.S., 2009. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, p. 1004 - 1011.
- JONES, M.D., DURALL, D.M., CAIRNEY, W.G., 2003 Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. **New Phytologist Review**, 157: 399 - 422.
- KOWALCHUK, G.A., HOL, W.H.G., VAN VEEN, J.A., 2006. Rhizosphere fungal communities are influenced by *Senecio jacobaea* pyrrolizidine alkaloid content and composition. **Soil Biology and Biochemistry**, 38: 2852–2859.

- LINDENMAYER, D.B., HOBBS, R.J., 2004. Fauna conservation in Australian plantation forests. **Biological Conservation**, 119: 151 - 168.
- LIVESLEY, S.J., KIESE, R., MIEHLE, P., WESTON, C.J., BUTTERBACH-BAHL, K., ARNDT, S.K., 2009. Soil-atmosphere exchange of greenhouse gases in a *Eucalyptus marginata* woodland, a clover-grass pasture, and *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* plantations. **Global Change Biology**, 15: 425 - 440.
- MINISTÉRIO da AGRICULTURA e DESENVOLVIMENTO RURAL da REPÚBLICA de ANGOLA. **MINADER -Angola**, 2004.
- PEAY, K.G., BRUNS, T.D., KENNEDY, P.G., BERGEMANN, S.E., GARBELOTTO, M., 2007. A strong species–area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. **Ecology Letters**, 10: 470–480.
- PENNANEN, T., CAUL, S., DANIELL, T.J., GRIFFITHS, B.S., RITZ, K., WHEATLEY, R.E., 2004. Community-level responses of metabolically-active soil microorganisms to the quantity and quality of substrate inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, 36: 841–848.
- SCHABEREITER-GURTNER, C., PINAR, G., LUBITZ, W., ROLLEKE, S., 2001. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. **Journal of Microbiological Methods**, 45: 77–87.
- SINGH, B.K., NAZARIES, L., MUNRO, S., ANDERSON, I.C., CAMPBELL, C.D., 2006b. Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 7278–7285.
- SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J.D., WERNARS, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environment Microbiology**, 65: 2614-2621.
- SMIT, E., VEENMAN, C., BAAR, J., 2003. Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus sylvestris* L. stand reveals long-term

- increased diversity after removal of litter and humus layers. **FEMS Microbiology Ecology**, 45: 49–57.
- SMITH, C.K., ASSIS, O.F., GHOLZ, H.L., BAIMA, A., 2002. Soil carbon stocks after forest conversion to tree plantations in lowland Amazonia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, 164: 257–263.
- TURNER, J., GESSEL, S.P., LAMBERT, M.J., 1999. Sustainable management of native and exotic plantations in Australia. **New Forests**, 18: 17–32.
- WARING, R.H., RUNNING, S.W., 2007. Forest Ecosystems: analysis at multiple scales. **Elsevier Academic Press**.
- ZHOU, J., KANG, S., SCHADT, C.W., GARTEN, C.T., 2008. Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105: 7768–7773.