

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

**Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de
cana-de-açúcar**

Lucas Carvalho Basilio de Azevedo

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

**Piracicaba
2008**

Lucas Carvalho Basilio de Azevedo
Engenheiro Agrônomo

Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. **MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas.

Piracicaba
2008

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

Azevedo, Lucas Carvalho Basilio de
Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar /
Lucas Carvalho Basilio de Azevedo. - - Piracicaba, 2008.
110 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cana-de açúcar 2. Ecologia do solo 3. Micorriza 4. Raízes 5. Sequenciamento genético
I. Título

CDD 633.61
A994c

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

DEDICO

A Deus;

Aos meus pais, Marlene e Erasmo, aos meus irmãos, Mateus, Ana Julia e Maria Luiza;

Aos meus avós, tios e tias;

Pelo apoio e incentivos recebidos, sendo essenciais para essa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa no início do Curso, à FAPESP pela bolsa concedida no restante do curso, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo para estágio no exterior por 5 meses.

Ao Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais, pela orientação e incentivo ao longo do curso.

Ao Dr. Prof. Ari Jumpponen (Kansas State University, Manhattan, KS, USA), por ter me acolhido e me recebido nos EUA, pela amizade, pela sua constante confiança em nosso trabalho e pelo seu incentivo à vida profissional.

Ao Dr. Prof. Sidney Luiz Stürmer por ter realizado o árduo trabalho de identificação dos esporos de FMAs, parte essencial desse trabalho.

Ao Dr. Prof. Francisco de Sousa, por disposição em ajudar com discussões e esclarecimentos sobre os trabalhos pela internet.

À Prof. Dra. Elke J.B.N. Cardoso pela concessão do material do laboratório de Microbiologia do Solo e material da Coleção de FMAs, além do constante apoio, disposição para atender aos alunos e pela confiança depositada em mim.

À parte essencial de minha vida, portanto, desse trabalho também:

Meu Pai Erasmo, minha Mãe Marlene, meus irmãos Mateus, Ana Julia e Maria Luiza, aos meus avós Florinda, Naziozeno (*in memorian*) e Quitéria, aos meus tios Maria Elena, Malu, Ismael (*in memorian*), Raquel, Israel e Maria Aparecida que sempre me incentivaram, acreditando e investindo em mim.

Agradeço especialmente à Simone, por sua confiança, apoio, paciência e por sua companhia e incentivo.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia Luis Fernando Baldesin, Wladimir Rosignolo e, especialmente, à Denise de Lourdes C. Mescolotti pela ajuda nos experimentos em laboratório.

Ao Dr. José Pereira Silva Júnior, pela amizade, esclarecimentos e ajuda na elaboração do projeto.

Aos colegas e amigos durante a jornada de doutorado: Adriano Lucheta, Alessandra de Paula, Alexandre Martines, André Nakatani, Carolina Baretta, Christie Monteiro, Daniel Lammel, Daniele Takahashi, Denise Santos, Dilmar Baretta, Eduardo Armas, Elaine Malosso,

Flávio Alves, Flávio de Paula, Gisele Lopes, Giselle Gomes, Hélio, Jackson Lange, Juliano Cury, Karina Cenciani, Luiz Fernando Romanholo, Magnus, Marcela Arnaldo, Márcio Morais, Pablo Hardoim, Rafael Armas, Rafael Leal, Rafaela, Robinson Moresca, Simão Lindoso, Sandra, Soraya Kiriachek, Winston, todos estagiários e demais amigos não mencionados aqui.

Aos amigos que encontrei e que me acolheram em Manhattan: Adelaide, Altair, Ana, Anand, Daniel, Dave, David, Fellipe, Flávia, German, Greg, Keerthi, Lia, Leila, Lorena, Maria, Michael, Nicolas, Renata, Thais, William

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão bibliográfica.....	12
2.1.1 Micorrizas Arbusculares.....	12
2.1.2 Estudo de comunidades de fungos micorrízicos arbusculares.....	13
2.1.3 Taxonomia e identificação molecular de fungos micorrízicos arbusculares.....	16
2.2 Material e métodos	19
2.2.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes	19
2.2.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs	24
2.2.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita.....	27
2.2.3.1 Análises químicas do solo	28
2.2.3.2 Extração de esporos de FMAs do solo	29
2.2.3.3 Colonização micorrízica intrarradicular	29
2.2.3.4 Análise do gene rRNA 18S fúngico em raízes de cana-de-açúcar.....	30
2.2.3.4.1 Amplificação do gene rRNA 18S de fungos gerais e FMAs.....	30
2.2.3.4.2 Amplificação do gene rRNA 18S de grupos específicos de FMAs em cana-de-açúcar	31
2.2.3.4.3 Purificação dos <i>amplicons</i>	32
2.2.3.4.4 Clonagem dos <i>amplicons</i> do gene rRNA 18S	33
2.2.3.4.5 Extração do DNA plasmidial.....	33

	7
2.2.3.4.6 Sequenciamento dos clones do gene rRNA 18S	34
2.2.3.4.7 Análise de sequências do gene rRNA 18S	35
2.3 Resultados e Discussão.....	36
2.3.1 Comparação dos métodos de extração de DNA das raízes	36
2.3.2 Desenho e validação de iniciadores específicos para grupos de FMAs	41
2.3.3 Estrutura da comunidade de FMAs em raízes e solo rizosférico de cana-de-açúcar sob diferentes manejos de colheita.....	56
2.3.3.1 Atributos químicos do solo.....	56
2.3.3.2 Produtividade da cana-de-açúcar	59
2.3.3.3 Fungos micorrízicos arbusculares no solo.....	60
2.3.3.4 Colonização micorrízica intrarradicular	70
2.3.3.5 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS7e F1Ra em raízes de cana-de-açúcar	73
2.3.3.6 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores NS31 e AM1 em raízes de cana-de-açúcar	78
2.3.3.7 Análise do gene rRNA 18S amplificado com os iniciadores específicos para grupos de FMAs em raízes de cana-de-açúcar.....	83
3 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS	101

RESUMO

Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs, filo Glomeromycota) formam associações simbióticas com a maioria das plantas vasculares. Normalmente, as hifas dos FMAs crescem no solo e colonizam o interior das raízes. No entanto, não se sabe se as espécies mais abundantes detectadas no solo, por meio da identificação com base na morfologia dos esporos assexuais, são também as mais abundantes no interior das raízes, devido às dificuldades para a identificação dos FMAs com base nas estruturas intrarradiculares. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade de FMAs em cana-de-açúcar sob dois manejos de colheita por meio da identificação das espécies que estão no solo na forma de esporos assexuais e aquelas que estão nas raízes usando o sequenciamento de clones do gene rRNA 18S. Amostras de solo e raízes de cana-de-açúcar de três variedades e dois manejos de colheita: SEM QUEIMA prévia e COM QUEIMA prévia à colheita, foram coletadas em um experimento localizado no município de Novo Horizonte, SP. Foram utilizadas três abordagens para a identificação dos FMAs no interior das raízes: emprego de (1) iniciador específico para fungos em geral, (2) iniciador específico para FMAs e (3) iniciadores específicos para grupos de FMAs. O número de esporos por 50 g de solo, a riqueza de espécies observada e estimada e a diversidade de esporos não diferiram significativamente entre os manejos SEM QUEIMA e COM QUEIMA. Efeitos significativos de variedades de cana-de-açúcar ou na interação dos fatores manejo e variedade não foram observados. A análise de ordenação com base nos esporos identificados também não indicou separação das amostras em função dos tratamentos. Entretanto, plantas do tratamento sob manejo SEM QUEIMA apresentaram as maiores taxas de colonização micorrízica arbuscular, quando comparadas às plantas do tratamento sob manejo COM QUEIMA. Esses dados indicam que a taxa de colonização micorrízica arbuscular é um indicador mais sensível à mudança de manejo de colheita da cana-de-açúcar do que os outros indicadores avaliados. Após a extração de DNA das raízes, o uso dos iniciadores específicos para fungos em geral, para FMAs e iniciadores específicos para grupo de FMAs não resultou em sequências de Glomeromycota. Mesmo assim, a comunidade de fungos associados às raízes detectada por sequenciamento do gene rRNA 18S foi avaliada. Os resultados indicam que a estrutura da comunidade fúngica associada às raízes de cana-de-açúcar diferiu significativamente entre os manejos de colheita SEM QUEIMA e COM QUEIMA prévia, apesar de não haver diferenças na riqueza e índices de diversidade de unidades taxonômicas operacionais observadas. Em geral, estudos adicionais devem ser feitos para otimizar as condições para amplificação do gene rRNA 18S de FMAs para melhor entender a ecologia dos mesmos.

Palavras-chave: Micorriza arbuscular, rRNA18S, Ecologia, Fungos

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi communities in soil and sugarcane roots

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, Glomeromycota) form mutualistic symbioses with most land plants. AMF hypha generally grow through the soil and colonize the cortical tissue of the plant roots. However, it is not known whether the most abundant species in the soil, determined based on the morphology of asexual spores are the most abundant inside the roots, due the difficulties in identifying AMF based on intraradical structures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the AMF community structure in sugarcane rhizosphere and roots under two harvesting managements, based on spores in the soil and sequencing of 18S rRNA gene clones, respectively. Sugarcane rhizosphere soil and roots were sampled from three varieties, under two harvesting managements: without pre-harvesting burning and with pre-harvesting burning, at an experimental field located in Novo Horizonte (São Paulo, Brazil). Three approaches were used to identify AMF inside the roots: (1) using fungi-specific primers, (2) using AMF-specific primers and (3) using AMF group-specific primers. The number of spores in the soil, the observed and estimated species richness and the diversity of AMF spores in the treatments without and with pre-harvesting burning were not statistically different. Statistically significant effects of sugarcane varieties or the interaction of the factors Harvesting Management and Varieties were not observed. Ordination analysis based on the identified spores did not show clustering by treatments. However, intraradical root colonization rates were higher in the treatment without pre-harvesting burning, as compared to the treatment with pre-harvesting burning. These data indicate that intraradical colonization rate may be used as a more sensitive indicator of environmental changes due to harvesting management, as compared to the other indicators evaluated. The use of fungi-specific, AMF-specific and AMF group-specific primers did not allow the detection of Glomeromycota in the sugarcane roots sampled from the field experiment. Nonetheless, the fungal communities associated with sugarcane roots detected by 18S rRNA gene clone sequencing were evaluated. The results indicate that the fungal communities associated with sugarcane roots from the treatments without and with pre-harvesting burning were statistically different, even though no differences in operational taxonomic unit richness and diversity indices were observed. In general, additional studies are necessary to optimize AMF 18S rRNA gene amplification for a better understanding of their ecology.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza; 18S rRNA; Ecology; Fungi

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

