

**ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FUNGOS
EM SOLOS DA AMAZÔNIA POR
ELETROFORESE EM GEL COM
GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)**

GISELLE GOMES MONTEIRO

2007

GISELLE GOMES MONTEIRO

**ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FUNGOS EM SOLOS DA
AMAZÔNIA POR ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE
DESNATURANTE (DGGE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Monteiro, Giselle Gomes

Análise da comunidade de fungos em solos da Amazônia por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) / Giselle Gomes Monteiro. – Lavras : UFLA, 2007.

48 p. : il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Fungos do solo. 2. rDNA 18S. 3. Solos tropicais. 4. Uso da terra. 5. DGGE.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.4

-632.4

GISELLE GOMES MONTEIRO

**ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FUNGOS EM SOLOS DA
AMAZÔNIA POR ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE
DESNATURANTE (DGGE)**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 01 de fevereiro de 2007

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso

UFLA

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

EMBRAPA Milho e Sorgo

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A toda minha família, ao meu
namorado Claudinei e aos amigos
de Belo Horizonte,

OFEREÇO.

A minha amada mãe, Gercina Gomes Monteiro,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar força, proteção e amparo ao longo do meu caminho.

A minha mãe, por tudo que ela representa, por todo amor, carinho, dedicação e todas as lições de vida que sempre me proporcionou.

Ao meu maravilhoso namorado, Claudinei, pelo amor, atenção, apoio e paciência.

A minha tia Marinalda e aos meus primos Vanessa, Stephane e Estevão, que sempre torceram por mim.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização da pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, “Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity”, Biosbrasil, pelo financiamento para a execução deste trabalho.

A Professora Fátima Moreira e aos alunos Éderson, Rafaela e Krisle, por terem disponibilizado as amostras de solo.

Ao meu orientador, Ludwig Pfenning, por todos os ensinamentos e por ter acreditado no meu potencial.

Aos membros da banca examinadora, professores Ludwig Pfenning, Patrícia Cardoso e Ivanildo Marriel, pela grande contribuição.

Aos professores: Rosane, Eustáquio, Romildo, Patrícia e Donizeti, pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Professor Márcio Lambais, por ter proporcionado a realização deste trabalho na Esalq-USP.

A todos os membros do Laboratório de Microbiologia Molecular da Esalq-USP, que se tornaram grandes amigos, em especial ao Rafael e ao Lucas, pela incansável paciência em me ajudar.

A Isabeli, Alessandra, Karlinha, Mariana, Daline e a Vó Dolores, por terem me recebido tão bem em Piracicaba.

A todos os amigos da Microbiologia Agrícola, em especial ao André e a Taís, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

A todos os integrantes do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos Filamentosos, pela amizade e pelo carinho.

Ao Lucas Abreu, pela ajuda na discussão dos resultados.

A Raírys, Sidi e Liliana, pela maravilhosa amizade e por terem tornado meus dias em Lavras mais felizes.

A minha grande amiga e irmã, Mary Anne, pela incondicional amizade, pela força e por todas as palavras de carinho.

Aos meus amigos de Belo Horizonte: Ana Cláudia, Vivi, Caio, Dedéia, Jaiminho, Tia Tati e Foca.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Solo como hábitat de fungos	3
2.2 Diversidade de fungos e suas funções	4
2.3 Técnicas dependentes de cultivo para estudo da diversidade de fungos do solo	6
2.4 Técnicas moleculares para estudo da diversidade de fungos do solo... 7	
2.4.1 Extração direta de DNA de fungos predominantes no solo e amplificação por PCR	9
2.4.2 DGGE	10
2.4.3 DGGE e estudo de comunidades de fungos do solo	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Amostragem de solo.....	16
3.2 Extração de DNA total do solo.....	19
3.3 PCR	20
3.4 DGGE.....	21
3.5 Análises estatísticas	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Extração de DNA e amplificação do rDNA	23
4.2 Otimização da DGGE.....	25
4.3 DGGE de comunidades de fungos em solos sob diferentes sistemas de uso da terra	25

5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	45

RESUMO

MONTEIRO, Giselle Gomes. **Análise da comunidade de fungos em solos da Amazônia por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**. 2007. 48p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Os objetivos deste trabalho foram adaptar uma metodologia de DGGE para analisar variações na estrutura de comunidades de fungos em solos sob vegetação natural da Amazônia e avaliar o impacto de sistemas de uso extensivo da terra sobre a comunidade de fungos. A área do estudo é localizada na região do Alto Solimões, município de Benjamin Constant, no Estado da Amazônia. Cinquenta amostras compostas de solo foram coletadas sob floresta tropical úmida de terra firme e sob cinco diferentes sistemas de uso extensivo de terra, adotados pela população indígena local. DNA metagenômico foi extraído diretamente do solo com um kit comercial e amplificado por *nested* PCR utilizando dois pares de *primers*, NS1+EF3 e NS1+FR1GC, descritos na literatura e considerados específicos para a amplificação de um fragmento de 1650 pb do gene 18S rDNA de fungos. Condições favoráveis da DGGE para a separação satisfatória dos amplicons foram obtidas ajustando o gradiente desnaturante do gel a 25-38% e a corrida eletroforética a uma voltagem constante de 200 V a 55 °C por 15 horas. Nestas condições foi possível detectar diferenças na estrutura das comunidades de fungos nas amostras de solo estudadas, gerando um perfil polimórfico de bandas por DGGE, característico para cada tipo de uso da terra. A análise do padrão de bandas evidenciou que o perfil das repetições de cada sistema é mais similar que os perfis dos diferentes sistemas de uso da terra. Mesmo assim, não há diferença significativa entre os diferentes sistemas, exceto a pastagem, indicando que o impacto das práticas agrícolas é baixo e, provavelmente, preserva a estrutura da comunidade de fungos. Apesar destas áreas não terem sofrido intervenções antrópicas significativas, o protocolo desenvolvido neste trabalho mostrou-se sensível para detectar alterações na estrutura das comunidades de fungos. Informações sobre a identidade e função de fungos poderiam ser obtidas por meio da confecção de bibliotecas genômicas a partir do DNA extraído e da excisão e o seqüenciamento de amplicons obtidos.

* Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning – UFLA (Orientador); Márcio Rodrigues Lambais – ESALQ, USP (Co-orientador)

ABSTRACT

MONTEIRO, Giselle Gomes. **Analysis of the fungal community in soils of Amazonia mediated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**. 2007. 48p. Dissertation (Master Degree in Agricultural Microbiology) Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. *

The aim of the present work was the adaptation of a DGGE methodology for the analysis of the fungal community structure in soils under natural vegetation in the Brazilian Amazon and the evaluation of the impact of different land-uses on the soil fungal communities. The area studied is located in the region known as “Alto Solimões”, close to the municipality of Benjamin Constant, Amazon State. Fifty composite soil samples were collected from undisturbed tropical forest and from sites nearby, submitted to five different land uses by local indigenous people. Metagenomic DNA was extracted directly from soil with a commercial kit and amplified by nested PCR using two sets of primers, NS1+EF3 and NS1+FRIGC, which are considered specific for the amplification of a 1650 bp fragment of fungal 18S rDNA gene. Satisfactory band separation in DGGE was accomplished with a gradient of denaturants ranging from 25 to 38%, under a constant voltage of 200 V and temperature of 55 °C, in an electrophoretic run of 15 hours. Under these conditions it was possible to detect variations in the fungal community structure with a polymorphic DGGE band pattern, characteristic of each land use evaluated. The DGGE band patterns among samples of the same land use were more similar than for samples from different origins. However, except for pasture, no statistically significant differences among land uses were detected, indicating that agricultural practices commonly adopted in the region have low impact on the fungal community structure. Information about identity and function of fungal species could now be obtained by construction of a genomic library based on extracted metagenomic DNA and excision and sequencing of amplicons.

* Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Adviser); Marcio Rodrigues Lambais – ESALQ, USP (Co-Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A floresta amazônica cobre 60% do território nacional e é considerada um grande reservatório de biodiversidade. Esta grande diversidade, principalmente de espécies vegetais, contribui para uma maior diversidade de microrganismos, principalmente os que habitam o solo. O sistema de uso da terra pode ter um impacto significativo sobre a população de organismos, reduzindo assim, a resiliência de diversos processos que ocorrem no solo.

Fungos do solo representam o principal grupo funcional responsável pela decomposição de material orgânico, reciclagem de nutrientes de plantas, doenças de plantas, além de interagirem em uma rede complexa com vários organismos. Informações sobre a estrutura e diversidade de comunidades de fungos ajudam no manejo sustentável de solos e no controle de fitopatógenos.

Até hoje, há pouca informação sobre fungos do solo com a precisa identificação de espécies que permitiria um censo confiável das comunidades presentes em solos sob sistemas florestais e em solos agrícolas nos trópicos. Como o estudo de comunidades fúngicas por métodos baseados em cultivo é demorado e exige especialistas treinados, o uso de métodos moleculares, que analisam organismos do solo de maneira independente de cultivo, novas perspectivas se abriram.

Uma dessas técnicas é a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), que representa uma boa alternativa por ter alta sensibilidade e reprodutibilidade. A técnica permite analisar a diversidade fúngica em menos tempo, por meio de produtos de PCR, detectar e acompanhar alterações na composição de comunidades de fungos do solo sob influência de práticas agrícolas e outros impactos naturais ou antropógenos.

Apesar de essas técnicas moleculares de *fingerprinting*, clonagem e seqüenciamento estarem sendo cada vez mais utilizadas para a avaliação de

comunidades de fungos, elas ainda não foram utilizadas para estudos de fungos em solos de ecossistemas florestais. Não existem informações sobre as comunidades de fungos em ecossistemas de solo com vegetação florística natural que sofreram impacto de práticas agrícolas.

Os objetivos deste trabalho foram adaptar uma metodologia de DGGE para analisar variações na estrutura de comunidades de fungos em solos sob vegetação natural da Amazônia, e avaliar o impacto de sistemas de uso extensivo da terra sobre a comunidade de fungos.

Espera-se que as comunidades de fungos sofram variações de acordo com cada sistema de uso da terra e que essas alterações sejam detectadas por DGGE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Solo como hábitat de fungos

O solo é um ambiente fundamental, insubstituível, complexo e dinâmico. A população habitante que vive no solo inclui macrofauna, mesofauna, microfauna e microflora, sendo que 80-90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediadas por microrganismos (Nannipieri et al., 2003). Microrganismos do solo são fundamentais para a manutenção e o funcionamento de solos naturais e agrícolas devido ao seu envolvimento em processos chaves, tais como: formação da estrutura do solo; fixação de nitrogênio; decomposição de matéria orgânica, incluindo xenobióticos e compostos polifenólicos; remoção de toxinas; ciclagem de nutrientes, aumentando assim a biodisponibilidade de nitratos, sulfatos, fosfatos e metais essenciais (Garbeva et al., 2004; Gomes et al., 2003).

As florestas tropicais abrigam a maior biodiversidade do mundo. Estima-se que elas contenham, pelo menos, 50% de todas as espécies do planeta (WRI, IUCN, UNEP, 1992). A Amazônia Legal cobre 60% do território nacional com, aproximadamente, 5.000.000 km², correspondendo a unidades políticas e geográficas, em que a maioria dos programas de planejamento e desenvolvimento tem sido baseada. Ela está localizada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Rodrigues, 1996). É constituída por uma floresta exuberante, com grande diversidade e, ainda, é pouco explorada para a produção agrícola comparada com outras regiões brasileiras. A intensificação das atividades antrópicas, que culminam na conversão de florestas em pastagens extensivas, resulta na alteração e perda da biodiversidade. Essa redução pode influenciar sobre processos biológicos importantes para o bom funcionamento do

ecossistema, que afetarão sua produtividade e sustentabilidade (Moreira et al., 2006).

Apesar de os microbiologistas estarem investigando o papel da diversidade microbiana sobre a estabilidade do funcionamento do ecossistema desde os anos 1960, atualmente, o interesse sobre o efeito que a diversidade da comunidade microbiana tem sobre as funções ecológicas e a resiliência em solos impactados vem crescendo consideravelmente (Garbeva et al., 2004).

Em solos de regiões tropicais, a remoção da vegetação nativa para a introdução de florestas plantadas, o cultivo de subsistência ou o cultivo comercial alteram a composição de espécies vegetais, os níveis de matéria orgânica e de nutrientes, bem como a estrutura da comunidade microbiana do solo. O resultado é uma menor diversidade de microrganismos, uma vez que um solo ecologicamente balanceado depende da ciclagem de nutrientes e do balanço entre matéria orgânica, organismos do solo e diversidade de plantas (Tótolá & Chaer, 2002). Um uso mais racional da terra agrícola e a regeneração de recursos naturais, incluindo a diversidade de áreas degradadas, representam um dos maiores desafios para a proteção de recursos naturais, incluindo uma maior diversidade de microrganismos e relações ecológicas e processos mediados por esses organismos (Pfenning & Abreu, 2006).

2.2 Diversidade de fungos e suas funções

A função dos fungos no solo é complexa e fundamental para este ecossistema. Fungos possuem uma importante função ecológica, incluindo ciclagem de nutrientes e como carbono, e participam do desenvolvimento e saúde das plantas (Anderson & Cairney, 2004; Bridge & Spooner, 2001). Alguns fungos são bem conhecidos por causarem uma variedade de doenças em plantas e, em alguns casos, por devastarem colheitas agrícolas (Thorn, 1997). Em solo sob vegetação natural, fungos interagem com uma comunidade

microbiana complexa, incluindo bactérias e componentes da microfauna. Saprófitos, como os zigomicetos e ascomicetos, podem decompor tanto açúcares simples como celuloses e hemiceluloses (Lodge, 1997). Em agroecossistemas, patógenos de plantas e seus antagonistas são especificamente importantes. Patógenos de plantas agem no solo e na rizosfera, causando perda de rendimento. Solos supressivos são caracterizados por um nível muito baixo de desenvolvimento de doença, embora um patógeno virulento e um hospedeiro susceptível estejam presentes. Elementos abióticos contribuem para supressividade, porém elementos bióticos têm sido identificados como fatores primários em supressão de doenças (Mazzola, 2002). Dentre os organismos envolvidos na supressividade de solos, os fungos são os mais bem estudados, devido ao interesse na obtenção de produtos comerciais à base de fungos para o controle biológico de patógenos habitantes do solo (Bettiol & Ghini, 2005).

É estimado que existam 1,5 milhão de espécies fúngicas na Terra, das quais somente cerca de 70.000 são descritas (Hawksworth & Rossman, 1997). A grande maioria das espécies fúngicas identificadas e descritas ocorre, provavelmente, no solo em alguns estágios do seu ciclo de vida (Bridge & Spooner, 2001).

Há evidências de que a diversidade de fungos nos trópicos é maior do que em regiões temperadas e que os poucos gêneros e nichos ecológicos estudados não fornecem informações adicionais ao que já se sabe dos 5% dos fungos conhecidos na Terra (Hawksworth, 2001).

A estrutura da população de fungos do solo, dinâmica e diversidade ainda é pouco conhecida (Kowalchuk, 1999a). Frequentemente, a detecção destes fungos é impedida pela relutância de muitos fungos, em particular micorrizas, em crescerem em meio de cultura (van Elsas et al., 2000). A identificação dos fungos em amostras de solo é trabalhosa e requer alguns nutrientes de alto valor, como aqueles exigidos pelos basidiomicetos e fungos

endomicorrízicos. Supõe-se que menos de 20% das espécies fúngicas conhecidas podem ser facilmente cultivadas em meios de cultura (Bridge & Spooner, 2001).

Não existem investigações suficientes sobre fungos do solo, com identificação exata de espécies, que permita extrair um quadro correto sobre as comunidades presentes em solos de floresta e agrícola (Pfenning & Abreu, 2006) e a avaliação da diversidade de fungos do solo e investigações a respeito de sua importância para agricultura sustentável é relevante.

2.3 Técnicas dependentes de cultivo para estudo da diversidade de fungos do solo

Os procedimentos microbiológicos clássicos para o estudo de fungos do solo são baseados no isolamento de propágulos microbianos ou crescimento de hifas ativas do solo e o crescimento destes em meio de cultura para futuras identificação e quantificação. Outras metodologias envolvidas são enfocadas em análises da atividade e função de fungos em processos biogeoquímicos que ocorrem em ambientes. Para este propósito, métodos de análises da biomassa microbiana do solo, respiração, ciclagem de nitrogênio, análises de ácidos graxos de fungos e observações diretas do desenvolvimento do micélio em partículas do solo têm sido aplicados (Anderson & Ingram, 1989; Brodie et al., 2003; Houston et al., 1998; Widden & Parkinson, 1973). Fungos de serapilheira, conhecidos como um dos mais importantes grupos de organismos decompositores, são, freqüentemente ainda referidos como biomassa microbiana (Swift & Bignell, 2001). Entretanto, estes métodos fornecem poucas informações sobre as espécies de fungos envolvidas nestes processos.

Procedimentos de isolamento e identificação são, geralmente, requeridos para um melhor entendimento da estrutura da comunidade de fungos no solo e da função de cada um de seus elementos (Brodie et al., 2003). A partir do momento em que o plaqueamento de solo começou a ser utilizado, progresso

considerável foi realizado, utilizando-se técnicas de lavagem, bem como meios de culturas menos seletivos e elementos aditivos que reduzem o crescimento de certos grupos de fungos (Pfenning & Abreu, 2006).

Entretanto, as metodologias de isolamento e cultivo de fungos de ecossistemas complexos, tais como o solo, apresentam limitações devido à natureza fastidiosa de várias espécies de fungos e à impossibilidade do meio de cultura em fornecer as mesmas condições presentes no ambiente. Além dessas limitações metodológicas, existe também uma carência de conhecimento taxonômico, o que dificulta a identificação de algumas espécies presentes no solo (Kirk et al., 2004).

2.4 Técnicas moleculares para estudo da diversidade de fungos do solo

Nosso entendimento sobre o funcionamento e a diversidade de fungos do solo permanece pobre quando comparado com as comunidades de bactérias. Não é incomum encontrar artigos que sugerem investigar aspectos da ecologia microbiana do solo, mas, de fato, consideram somente bactérias (Anderson & Cairney, 2004; Oros-Sichler et al., 2006).

Alguns grupos de fungos, tais como os basidiomicetos, são difíceis de cultivar e podem não esporular em meio axênico, o que impossibilita sua identificação (Thorn et al., 1996). Fungos pertencendo ao grupo *Glomeromycota*, formadores de micorriza arbuscular, são fungos biotróficos obrigatórios que não crescem na ausência de sua planta hospedeira (Stürmer & Siqueira, 2006). Esse fato estimulou o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo de fungos, sem a necessidade de cultivo prévio.

Considerando que parte destas espécies pode ocorrer no solo em alguma fase do seu ciclo de vida, outras metodologias devem ser usadas para complementar as técnicas tradicionais, para um melhor entendimento da diversidade e dinâmica de fungos do solo (Bridge & Spooner, 2001).

Essas metodologias, aliadas aos avanços da bioinformática e aos métodos de análise estatística, são ferramentas promissoras para estudos de caracterização da diversidade microbiana e sobre como as comunidades microbianas se organizam em diferentes ambientes (Lambais et al., 2005).

Extração direta de DNA do solo, seguida de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas que geram perfis de comunidades (*fingerprinting*) fornecem uma nova alternativa para a elucidação de características taxonômicas e funcionais das comunidades de fungos do solo.

Diversas técnicas moleculares permitem a geração de verdadeiros perfis de comunidades de fungos de solo. Segundo Kennedy & Clipson (2003), dentre as mais importantes, podem-se citar: eletroforese em gel com gradiente desnaturante ou *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), eletroforese em gel com gradiente temperatura ou *temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais ou *terminal-restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP), polimorfismo de conformação de fita simples ou *single strand conformation polymorphism* (SSCP) e análise de espaçadores intergênicos ribossomais automatizados ou *automated ribosomal intergenic spacer analysis* (ARISA).

A técnica DGGE, originalmente desenvolvida na pesquisa médica para análise de mutações pontuais do DNA (Fischer & Lerman, 1980), figura, atualmente, entre as técnicas de *fingerprinting* mais utilizadas para análises de comunidades de fungos e bactérias do solo.

Apesar de essas novas ferramentas moleculares contribuírem para estudos da biodiversidade, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas e das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária uma abordagem polifásica por meio de vários enfoques, para se chegar, o mais próximo possível, do quadro real de um ambiente (Muyzer & Smalla, 1998).

2.4.1 Extração direta de DNA de fungos predominantes no solo e amplificação por PCR

A análise de genes do DNA ribossomal, obtidos diretamente de amostras ambientais, permitiu a ampliação do conhecimento da diversidade microbiana nos anos recentes e provou ser uma poderosa ferramenta para investigar esse aspecto em diferentes amostras de ambientes naturais (Pace, 1997).

Para o estudo da diversidade e da ecologia microbiana por meio de técnicas moleculares é de fundamental importância a utilização de técnicas eficientes de extração de DNA. Uma adequação desta técnica deve ser realizada, já que há grande biodiversidade e uma variedade da composição química do solo (Rosado et al., 1997).

Um grande número de variações na técnica de extração de DNA de fungos do solo já foi descrito (Atkins & Clark, 2004). Atualmente, pode-se contar com kits que possuem eficiência e rapidez para recuperação do DNA do solo (Ranjard et al., 2003). Os ácidos nucleicos extraídos são de origem mista, compreendendo DNA ou RNA de bactérias, plantas, fungos, pequenos animais e outros microeucariotos. A eficiência da extração dos ácidos nucleicos depende das espécies presentes, do substrato da amostra ambiental, bem como do método utilizado (Mitchell & Zuccaro, 2006).

A qualidade e a pureza dos ácidos nucleicos extraídos do solo são fundamentais para o sucesso da amplificação por PCR do DNA/RNA genômico. Durante a extração, componentes inibidores da PCR, tais como ácidos húmicos, polissacarídeos e tanino, podem ser co-precipitados com o DNA e o RNA (Anderson & Cairney, 2004). A remoção destas impurezas pode ser alcançada por diluição ou inclusão de detergentes seletivos (Mitchell & Zuccaro, 2006).

O desenvolvimento da PCR (*polymerase chain reaction*) (Saiki et al., 1988) possibilitou um grande avanço no desenvolvimento de diferentes técnicas moleculares. É um método qualitativo e pode ser usado para detectar, monitorar

e identificar fungos de amostras ambientais utilizando *primers* específicos (Atkins & Clark, 2004). As vantagens deste método incluem simplicidade, rapidez e sensibilidade para pequenas quantidades de DNA (Mullis & Faloona, 1987).

Diversos *primers* foram desenvolvidos para amplificar um vasto número de grupos taxonômicos de fungos (Mitchell & Zuccaro, 2006). Conjuntos de *primers* universais, que amplificam partes do gene-cluster de DNA ribossomal de fungos, juntamente com técnicas moleculares de *fingerprinting*, tais como DGGE, fornecem ferramentas apropriadas para análises descritivas e comparativas da estrutura de comunidades de fungos (Brodie et al., 2003; Gomes et al., 2003; Hagn, 2003; Kowalchuk, 1999b; Malosso et al., 2006; May, 2001; Smit, 1999; Vainio & Hantula, 2000; van Elsas et al., 2000). O gene 18S rDNA de fungos não varia muito no seu tamanho, contém, em sua seqüência, regiões conservadas e variáveis e são moléculas convenientes, uma vez que a síntese de ribossomos é fortemente conservada ao longo da evolução (Anderson & Cairney, 2004; Kennedy & Clipson, 2003).

2.4.2 DGGE

A técnica de DGGE, introduzida na ecologia microbiana por Muyzer et al. (1993), permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não de acordo com o tamanho dos produtos. Isto possibilita não só a avaliação da diversidade genética das comunidades microbianas como também, por meio do seqüenciamento, a identificação filogenética dos membros da comunidade.

Nesta técnica utilizam-se géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturante, geralmente uréia e formamida, nos quais moléculas de DNA com o mesmo tamanho, porém, com seqüências de ácidos nucléicos distintas, apresentam um padrão de desnaturação diferentes. Essa separação

baseia-se em um princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula com respeito a sua conformação, que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, compostas por partes em dupla hélice e partes em fitas simples, movimentam-se mais lentamente no gel do que moléculas em fita dupla ou simples (Muyzer & Smalla, 1998).

Quando o DNA é submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita, até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula chamados “domínios de desnaturação”. Quando há a desnaturação de um domínio, processa-se uma transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e a migração da molécula no gel é interrompida. Variações nas seqüências nucleotídicas desses domínios levam a uma diferença nessas condições de desnaturação e as moléculas com diferentes seqüências vão interromper sua migração em diferentes posições no gel (Rosado & Duarte, 2002).

Com a utilização de DGGE é possível detectar, aproximadamente, 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (Myers et al., 1985). Essa percentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA, um segmento rico em GC (grampo de GC). Esse grampo de GC, quando anexado à extremidade 5' de um dos *primers*, é amplificado por PCR juntamente com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado (Sheffield et al., 1989), agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas do DNA em fitas simples. Normalmente, o comprimento do grampo de GC varia entre 30 e 50 nucleotídeos (Muyzer et al., 1998).

A técnica de DGGE é uma ferramenta molecular bem estabelecida, que permite o estudo da complexidade e o comportamento de comunidades microbianas. É uma técnica fidedigna, rápida, econômica (Muyzer, 1999) e permite a análise simultânea de várias amostras no mesmo gel, tornando possível o acompanhamento de mudanças na comunidade com o passar do tempo (Fromin et al., 2002; Kennedy & Clipson, 2003).

Além das limitações do processo de extração de DNA metagenômico representativo da comunidade de fungos e da PCR, a DGGE também possui limitações intrínsecas. A técnica é fundamentada na separação de amplicons, com base em seu padrão de desnaturação no gel, determinado, basicamente, pelo conteúdo de G + C. Portanto, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo, com seqüências divergentes, mas com teores de G + C iguais (Gomes et al., 2003). Por essas razões, não se pode estabelecer uma relação direta entre a quantidade de bandas detectadas por DGGE e o número de espécies ou os grupos taxonômicos presentes na amostra. Para a identificação das espécies, das quais os amplicons são provenientes, é necessário fazer a excisão do amplicon do gel, reamplificar o DNA e seqüenciá-lo (Lambais et al., 2005; Muyzer & Smalla, 1998).

2.4.3 DGGE e estudo de comunidades de fungos do solo

A utilização da DGGE já foi relatada em diversos estudos de ecologia molecular de fungos do solo. Alterações de comunidades de fungos em solos impactados com fungicida clorotalonil, sob três diferentes tipos de manejos, foram detectadas por DGGE (Sigler & Turco, 2002).

Por meio da amplificação do gene 18S rDNA, e posterior DGGE, foi possível visualizar efetiva redução na diversidade de fungos na rizosfera comparada com o solo, juntamente com o efeito da idade da planta (Gomes et al., 2003). A mesma relação entre influência de diferentes espécies de plantas na

estrutura de comunidades de fungos na rizosfera e no solo foi observada por Costa et al. (2006), utilizando PCR-DGGE do gene 18S rDNA.

Utilizando DGGE é possível avaliar a persistência de espécies de fungos no solo e analisar a resposta de comunidades fúngicas naturais em um solo contaminado artificialmente com petróleo (van Elsas et al., 2000). Ela permite também investigar a diversidade de fungos endofíticos em batatas transgênicas. Associando a técnica DGGE e métodos dependentes de cultivo, Götz et al. (2006) conseguiram detectar efeito da lisoenzima T4 sobre as populações de fungos endófitos.

A utilização de DGGE e T-RFLP para detectar efeito da planta *Lolium perenne* em três tipos de solos com propriedades químicas diferentes foi mais discriminatória em relação aos métodos fisiológicos e bioquímicos para detectar alterações nas comunidades de fungos (Singh et al., 2006). Anderson et al. (2003) observaram uma forte separação entre perfis do DGGE de ITS1 rDNA para comunidades fúngicas em florestas e vegetação rasteira adjacente, que foram consistentes com mudanças nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Da mesma maneira, foram detectadas alterações na composição de comunidades de fungos no solo sob pastagens naturais na Irlanda, usando PCR rDNA 18S seguida de DGGE e T-RFLP (Brodie et al., 2003).

A diversidade de fungos em solos marítimos da Antártida foi caracterizada utilizando-se isolamento por cultivo, DGGE e técnicas de clonagem. Os amplicons separados por DGGE foram seqüenciados, obtendo-se 48 seqüências de fungos Ascomycetos, 48 seqüências de Basidiomicetos e 6 seqüências de fungos do Filo Zygomycota (Malosso et al., 2006).

Ainda não há relatos sobre o uso da técnica de DGGE para a avaliação da diversidade de fungos em solos sob vegetação natural nos trópicos. Provavelmente, a complexidade da composição química e biológica de solos sob

vegetação natural interfere na eficácia de protocolos existentes para o emprego da técnica de DGGE. Entretanto, a técnica apresenta potencial para o monitoramento de solos que passam a sofrer impacto de práticas agrícolas. O acompanhamento de alterações na composição e da estrutura de comunidades de microrganismos pode ajudar na avaliação do impacto causado e na elaboração de recomendações para garantir a sustentabilidade da agricultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do projeto “Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity”, implementado pelo “United Nations Programme (UNEP)” e executado, no Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda.

As áreas estudadas estão localizadas na região amazônica, incluindo comunidades indígenas do município de Benjamin Constant, no Estado do Amazonas. O local de estudo situa-se a aproximadamente 1.100 km a oeste de Manaus e está localizado na região do Alto Solimões (Figura 1). As áreas avaliadas estão localizadas nas comunidades indígenas de Nova Aliança, Guanabara II e na cidade de Benjamin Constant. As comunidades indígenas estão organizadas em associações, praticando agricultura itinerante de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal, sendo assim baixa a intensidade de uso da terra. As comunidades existem há 22 anos e são formadas por índios das tribos Ticuna e Cocamo.

Como se trata de um projeto de abordagem multidisciplinar, os procedimentos gerais de escolha dos sistemas de uso da terra (SUT), sistema de amostragem, localização das janelas de estudo e os métodos utilizados foram padronizados pela equipe global do projeto.

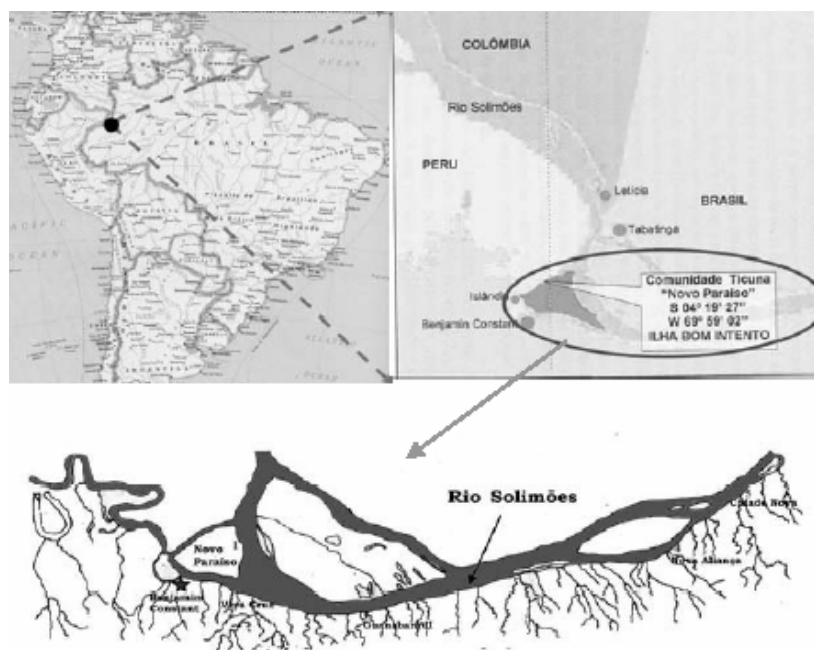


FIGURA 1. Localização do município de Benjamin Constant AM e algumas comunidades indígenas da região.

3.1 Amostragem de solo

As amostras de solo foram coletadas, durante o mês de março de 2004 em seis áreas denominadas janelas com, 8,4 hectares cada, situadas entre as coordenadas geográficas 4°20' e 4°26' Sul e 69°36' e 70°2' Oeste. Cada janela é composta por, aproximadamente, 16 pontos distantes 100 m entre si. Alguns pontos foram coletados com 50 m de distância entre si para possibilitar uma melhor representatividade dos diferentes tipos de uso do solo nas janelas.

A localização e o arranjo espacial das janelas foram escolhidos de forma a cobrir um gradiente de usos do solo (Figura 2). A descrição dos diferentes sistemas de uso da terra (SUT), definidos segundo Fidalgo et al. (2005), e os pontos escolhidos para a avaliação das comunidades de fungos do solo estão descritos na Tabela 1.

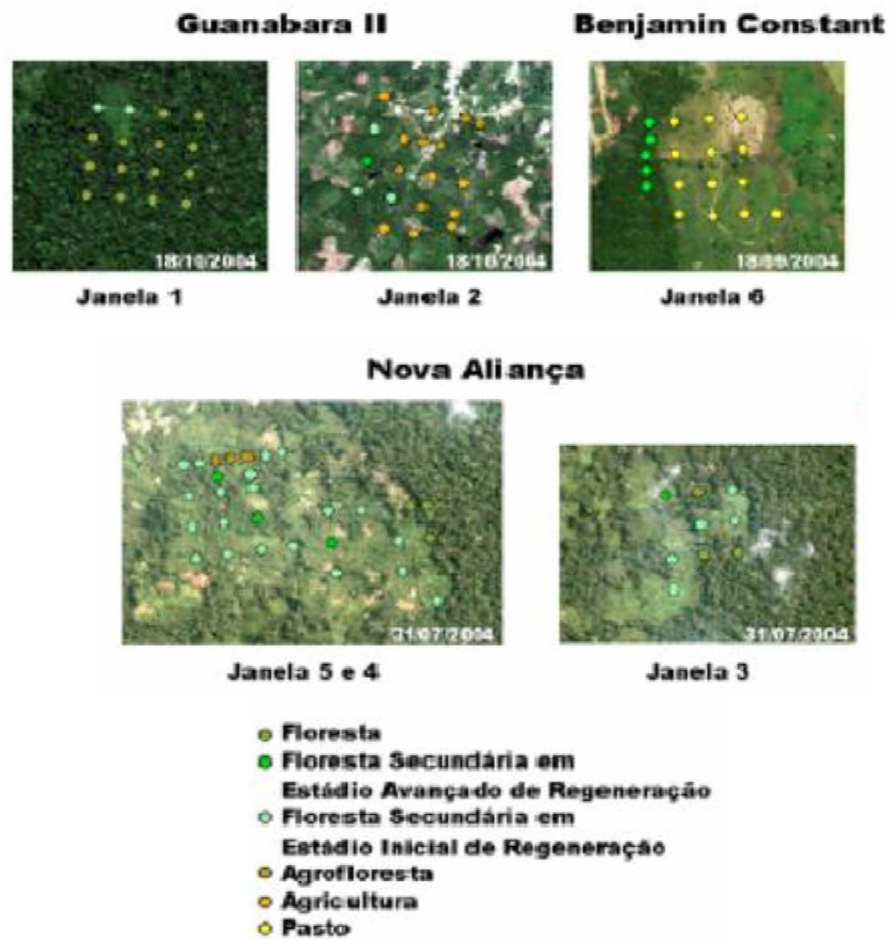


FIGURA 2. Imagens Ikonos multiespectrais, com 4 m de resolução, mostrando a localização dos pontos de amostragem nas diferentes janelas.
 Fonte: Fidalgo et al. (2005)

TABELA 1. Caracterização dos diferentes sistemas de uso da terra (SUT) e identificação dos pontos utilizados para avaliação da diversidade de fungos do solo

SUT	Caracterização	Pontos utilizados
Floresta primária	Áreas de formação florestal original, em que se desconhece a ocorrência de desflorestamento em não há evidências da retirada de material lenhoso.	04, 08, 09, 10, 14, 39, 40, 41, 57, 61
Floresta secundária	Vegetação secundária em diversos estados de sucessão. Encontram-se sob sistemas de cultivo itinerante ou em pousio.	01, 23, 29, 30, 37, 42, 56, 60, 63, 69, 75, 76, 79, 80, 88, 88A
Agrofloresta	Sistema de produção florestal extensiva, em que grande parte da vegetação é formada pela regeneração espontânea de espécies de floresta secundária. Predomina a ocorrência de espécies arbóreas.	17, 20, 22, 24, 24A, 25, 66, 67, 67A
Agricultura	Representa áreas que se encontram cobertas por culturas anuais ou semiperenes, como a cultura da banana.	18, 28, 33, 44, 49, 58, 72
Pastagem	Compreende áreas destinadas à produção animal, cobertas por gramíneas.	83, 84, 85, 86, 92, 93, 94, 96

A – pontos alocados a 50 m.

As práticas agrícolas realizadas na região, como desmatamento e capinas, são feitas manualmente e não há o uso de insumos agrícolas pelos moradores.

Cada amostra, representando o ponto georeferenciado, foi constituída de 12 subamostras, retiradas com a ajuda de um trado em uma profundidade de 0-20 cm (Figuras 3). Os equipamentos usados foram lavados entre as coletas em cada ponto. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis Millipore e mantidas em ambiente resfriado ate a chegada ao laboratório, quando foram congeladas a -80°C.

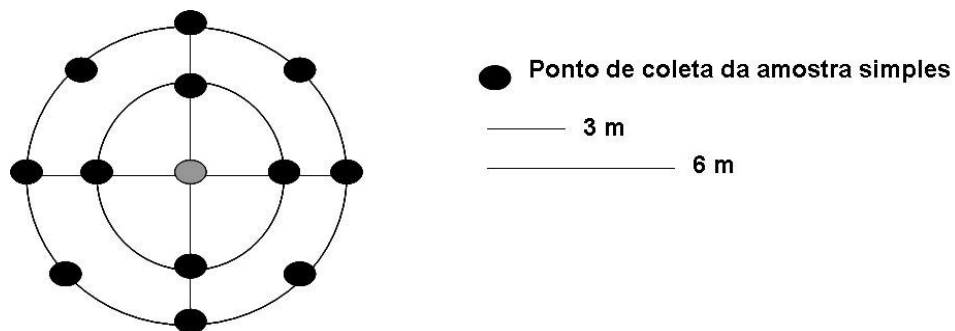


FIGURA 3. Esquema de coleta de amostras compostas de solo em cada local. O ponto do centro do círculo (em cinza) foi georreferenciado. Os 12 pontos representam as subamostras.

3.2 Extração de DNA total do solo

Para a extração do DNA do solo utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil seguindo recomendações do fabricante (Bio 101, Vista, Califórnia). Em microtubos contendo granada finamente moída, foram adicionados cerca de 0,6 g de solo, 978 μ L de tampão fosfato e 122 μ L de tampão MT. Os tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos a velocidade de 5.5, em um FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Bio 101, Vista, Califórnia). Em seguida, centrifugaram-se os tubos por 1 minuto, a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. A essa solução adicionaram-se 250 μ L de tampão PPS, agitando-se os tubos 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado e transferido para um microtubo limpo. Adicionou-se ao sobrenadante 1 mL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 minutos por inversão. Em seguida, eles foram incubados por 3 minutos, a matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter, Bio101) e os tubos centrifugados por 2 minutos a 13.000 rpm. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 μ L de uma solução de lavagem (SEWS) e o filtro centrifugado 2 vezes, por 2 minutos, a 13.000 rpm. Após 5 minutos de

incubação em temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de água ultrapura ao filtro e centrifugou-se por 2 minutos, a 13.000 rpm. O DNA purificado foi recolhido em um tubo limpo e sua quantificação feita por comparação com padrão de massa, após eletroforese em gel de agarose 1,0 % - 0,5x TBE (1x TBE: 44 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser FluorImagem (Amersham Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.3 PCR

Os procedimentos para a condução do Nested PCR para amplificar rDNA 18S de comunidades fúngicas do solo baseiam-se num protocolo proposto por Oros-Sichler et al. (2006). Para a amplificação inicial da subunidade de 18S do DNA ribossomal de fungos, utilizaram-se os *primers* NS1 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3') (White et al., 1990) e EF3 (5' TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG 3') (Smit et al., 1999), gerando um fragmento de 1700 pb. A amplificação foi feita em solução contendo, aproximadamente, 2 ng de DNA; 2,5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 mM de dNTP; 3,75 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada iniciador; 1 unidade de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen), água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 25 ciclos de °C por 30 segundos; 53°C por 45 segundos; 72°C por 3 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento sugerida no protocolo proposto por Oros-Sichler et al. (2006) é de 47°C. Essa temperatura foi alterada para 53°C para reduzir o risco de amplificações inespecíficas.

Diluições dos amplicons resultantes da primeira amplificação foram utilizadas como molde para uma segunda amplificação com os *primers* NS1 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3') e FR1GC (5' CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T 3') (Vainio & Hantula, 2000). As amplificações foram feitas em solução contendo as mesmas proporções de reagentes, utilizando o mesmo programa de amplificação como descrito para NS1-EF3. As duas únicas alterações foram a temperatura de anelamento que, em vez de 53°C, foi de 48°C e o número de ciclos que, de 25, diminuiu para 20. A quantificação dos amplicons resultantes foi feita por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1,0 % (TBE 0,5x – gel e tampão de corrida), utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (Amersham Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.4 DGGE

Diferentes condições da DGGE foram testadas com o objetivo de adequar a técnica para comunidades de fungos em solos naturais (Tabela 3).

TABELA 2. Diferentes condições da DGGE utilizadas para a avaliação de fungos em solos naturais

Acrilamida-bisacrilamida (%)	Gradiente desnaturante (%)	Condições da eletroforese
8	18-38	18h a 180V e 58°C
6	18-38	18h a 180V e 58°C
6	20-30	18h a 180V e 58°C
6	25-35	18h a 180V e 58°C
6	18-38	15h a 200V e 55°C
6	25-45	15h a 200V e 55°C
6	25-38	15h a 200V e 55°C

Os amplicons do rDNA 18S (10 a 20 μ L) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) foram preparados com gradiente desnaturante, usando duas soluções: uma solução desnaturante 100%, contendo 7 M de uréia e 40% de formamida e uma solução 0%, sem uréia e formamida. A eletroforese foi realizada em um sistema vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão 0,5x de TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução 10% de ácido acético glacial, por 15 minutos, em agitador horizontal. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada, imerso em solução de metanol 50% por 15 minutos em agitador horizontal, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000, v:v), por 30 minutos, em agitador horizontal no escuro. Após a coloração, a imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se o densitômetro laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences).

3.5 Análises estatísticas

A similaridade entre as estruturas de comunidades de fungos foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database para determinação da riqueza de amplicons (Sa). A média do número de amplicons dentro dos diferentes tipos de uso da terra foi obtida com auxílio do método gráfico *individual plot* com o auxílio do programa Minitab 14. O agrupamento hierárquico foi realizado através do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA e amplificação do rDNA

Inicialmente, foram selecionadas 50 amostras de solo sob diferentes usos da terra para a extração de DNA metagenômico. Destas, não foi possível recuperar DNA de 14 amostras, das quais 5 eram de floresta primária (4, 39, 40, 41, 57), 5 de floresta secundária (23, 30, 37, 88 e 88A), 2 de agrofloresta (24A e 25) e 1 de agricultura (18). Com o kit FastDNA Spin for Soil foi possível recuperar quantidades suficientes de DNA, diretamente de solos das demais 37 amostras. O rendimento do DNA variou de 15-60 ng/ μ l (Figura 4).

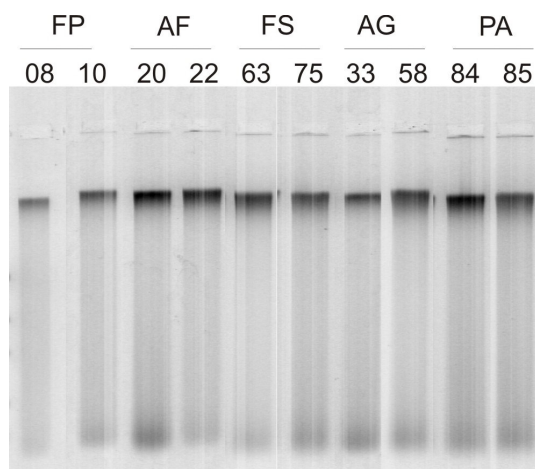


FIGURA 4. DNA metagenômico extraído de amostras de solos naturais sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. FP – floresta primária, AF – agrofloresta, FS – floresta secundária, AG – agricultura (AG) e pastagem (PA).

Os *primers* escolhidos para análise em DGGE amplificaram regiões conservadas do genoma de tamanho esperado e forte intensidade de banda, indicando grande concentração da região do DNA amplificado.

A primeira amplificação da região 18S, com os *primers* NS1/EF3, produziu bandas de baixa intensidade, porém, com o tamanho esperado de 1700 pb (Figura 5). Diluições dos amplicons gerados a partir dessa primeira amplificação foram usadas como moldes em uma segunda amplificação com os *primers* NS1/FR1GC, obtendo-se bandas de maior intensidade de, aproximadamente, 1650 pb (Figura 6).

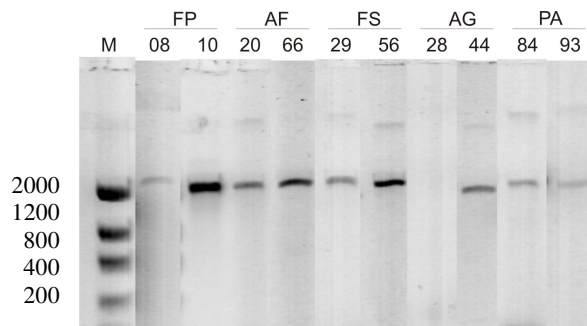


FIGURA 5. Fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com *primers* NS1/EF3 a partir do DNA extraído da comunidade total de solos sob diferentes usos da terra. M – marcador de massa DNA Mass Ladder, FP – floresta primária, AF – agrofloresta, FS – floresta secundária, AG – agricultura e PA – pastagem.

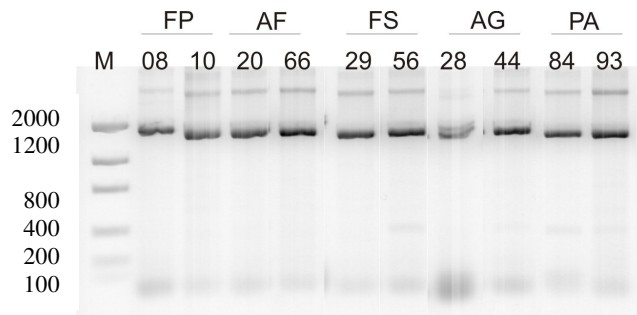


FIGURA 6. Fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com *primers* NS1/EF3 + NS1/FR1-GC a partir do DNA extraído da comunidade total de solos sob diferentes usos da terra. M – marcador de massa DNA Mass Ladder, FP – floresta primária, AF – agrofloresta, FS – floresta secundária, AG – agricultura e PA – pastagem.

4.2 Otimização da DGGE

Os perfis dos géis de DGGE obtidos em diferentes condições estão representados no Anexo 1A. As condições que se mostraram mais favoráveis para a separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados por PCR Nested com os *primers* NS1/EF3 + NS1-FR1-GC de amostras de solos sob diferentes SUT foram: 6% de acrilamida, 25-38% de uréia e formamida, temperatura de 55°C, 200V e 15 horas de corrida da eletroforese.

4.3 DGGE de comunidades de fungos em solos sob diferentes sistemas de uso da terra

Os amplicons gerados a partir da Nested PCR com *primers* NS1/EF3 + NS1/FR1-GC foram separados e analisados por DGGE. Nas condições estabelecidas neste trabalho, foi possível obter um perfil das comunidades de fungos em solos naturais para as 37 amostras de DNA extraídas diretamente do solo, em que se conseguiu obter uma amplificação eficiente.

Um total de 43 bandas diferentes foi detectado por DGGE. O SUT que apresentou um maior número de amplicons foi agricultura, com uma média de 13 amplicons, seguida de floresta primária, com 11 amplicons, agrofloresta e pastagem com 9 e, por último, floresta secundária, apresentando a menor média de 8 amplicons (Figura 7).

Os perfis obtidos para as comunidades de fungos estão representados nas Figuras 8 e 9. O padrão de DGGE das comunidades de fungos do solo mostrou que a avaliação comparativa dos perfis de bandas evidencia bandas características para a comunidade de cada sistema de uso da terra.

A análise do agrupamento hierárquico, em função da presença e da ausência de bandas detectadas em todos os pontos dos diferentes usos da terra, é visualizada em forma de dendrograma (Figura 10). As amostras tenderam a um agrupamento, em função do sistema de uso da terra. O dendrograma indica dois

grupos distintos. O primeiro grupo se subdivide em três subgrupos: o primeiro agrupou floresta primária com floresta secundária; o segundo, floresta secundária com agrofloresta e o terceiro subgrupo, separando as amostras de agricultura dos demais SUT. O segundo grupo separou todos os diferentes pontos do SUT de pastagem.

As amostras de diferentes usos da terra que se agruparam próximas, como a AF24/FS01 e FP14/FS80, apresentaram uma similaridade de 93% e 88%, respectivamente. As únicas amostras que apresentaram 100% de similaridade foram A67 e A67A. As amostras que apresentaram uma similaridade inferior a 50% foram entre floresta primária e agricultura.

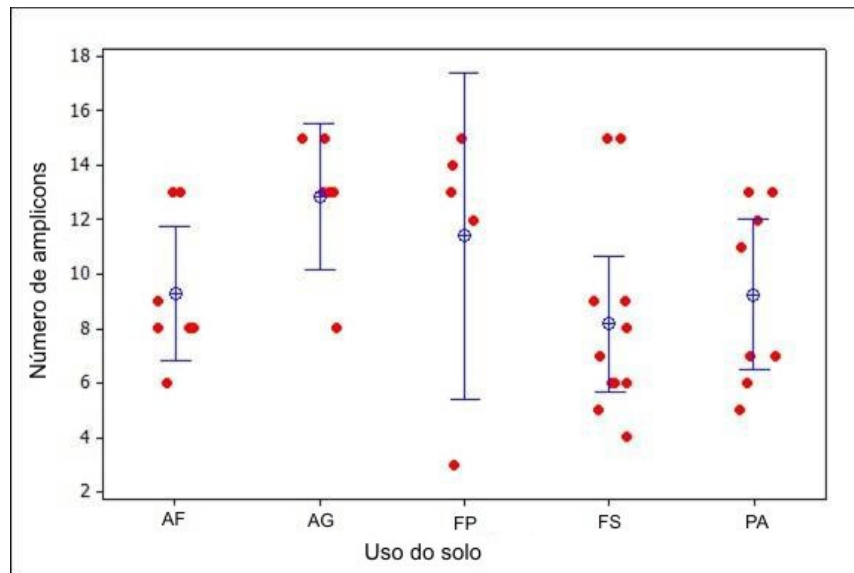


FIGURA 7. Média do número de amplicons detectados em solos naturais sob diferentes sistemas de uso da terra, por DGGE. AF – agrofloresta, AG – agricultura, FP – floresta primária, FS – floresta secundária e PA – pastagem.

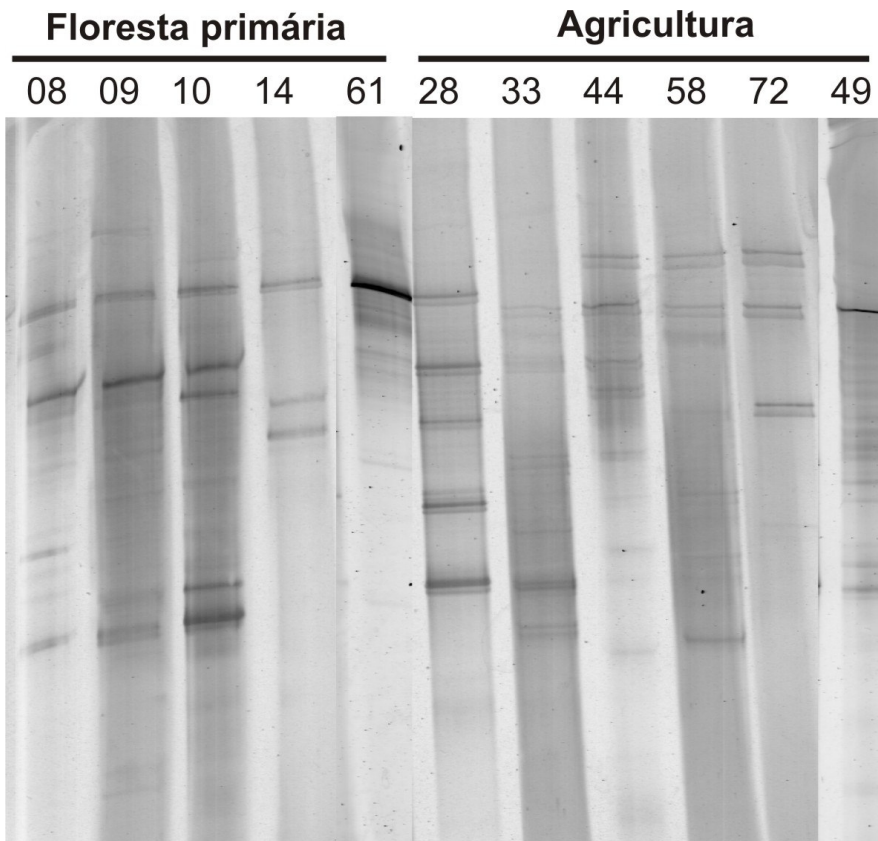


FIGURA 8. Gel de DGGE 25-38% de uréia e formamida, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3 + NS1/FR1-GC de amostras de solos naturais sob os SUT floresta primária e agricultura.

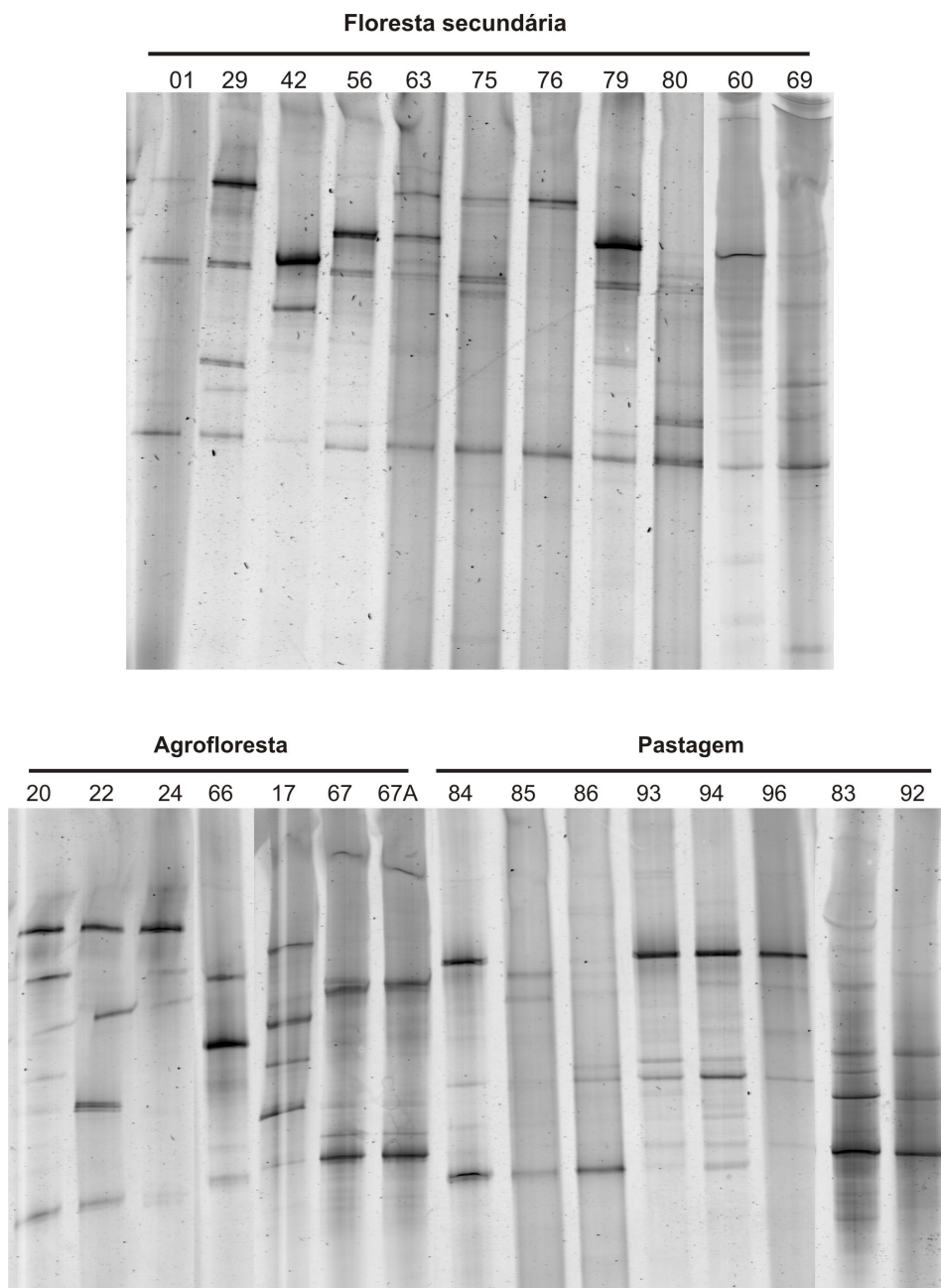


FIGURA 9. Gel de DGGE 25-38% de uréia e formamida, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3 + NS1/FR1-GC de amostras de solos naturais sob diferentes SUT. A – floresta secundária. B – agrofloresta e pastagem.

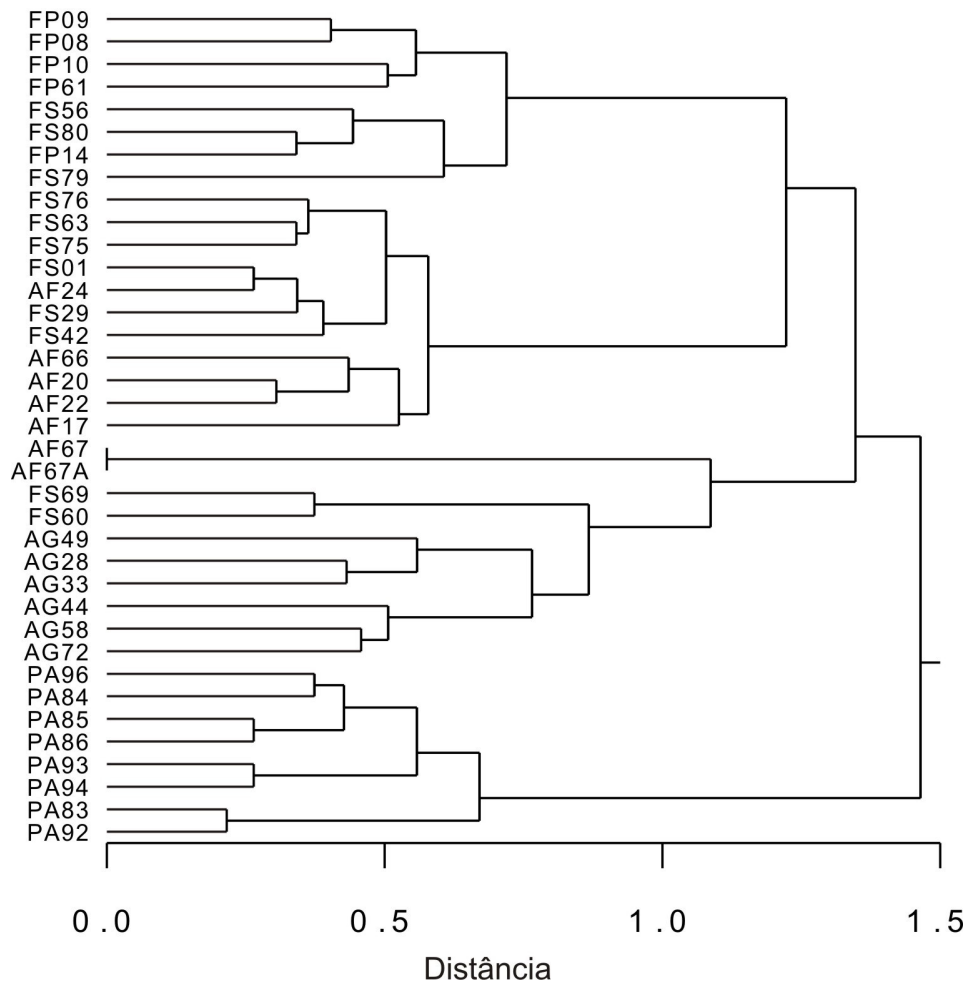


FIGURA 10. Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 18S de fungos de solos naturais sob diferentes uso da terra, detectadas por DGGE. FP – floresta primária, FS – floresta secundária, AF – agrofloresta, AG – agricultura e PA – pastagem.

5 DISCUSSÃO

Este é um dos primeiros trabalhos sobre a estrutura de comunidades de fungos em solos naturais sob diferentes sistemas de uso da terra utilizando técnica molecular de *fingerprinting*. A maioria das amostras das quais não se conseguiu extrair DNA de solo ou de que não foi possível obter uma amplificação eficiente era do SUT de florestas primárias e secundárias. Estes sistemas possuem grande quantidade de matéria orgânica, tais como ácidos húmicos, tanino e lignina, que podem co-precipitar com o DNA e inibir enzimas tais como a *Taq* DNA polimerase (Anderson & Cairney, 2004; Tebbe & Vahjen, 1993).

Para a amplificação de fragmentos do gene 18S rDNA de fungos de amostras de DNA extraídas diretamente de solo, foi utilizado o sistema de Nested PCR desenvolvido por Oros-Sichler et al. (2006). Este protocolo sugere a amplificação com os *primers* NS1/EF3 + NS1/FR1-GC, gerando um produto de 1650 pb. Para a separação de amplicons em DGGE, geralmente, são recomendados fragmentos entre 500-1000 pb (Muyzer & Smalla, 1998; Sheffield et al., 1989). Entretanto, amplicons gerados a partir de amplificações com os *primers* NS1/FR1GC, descritos por Vainio & Hantula (2000), têm sido utilizados com sucesso em análises de comunidades de fungos do solo, por meio da DGGE, produzindo perfis de boa qualidade (Costa et al., 2006; Gomes et al., 2003; Oros-Sichler et al., 2006). Estes *primers* são específicos para amplificar 18S rDNA dos três maiores filos de fungos, Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, não amplificando DNA de plantas, nematóides e protozoários. Clonagem e seqüenciamento de fragmentos de 18S rDNA, amplificados de DNA de amostras de solo, também suportam esta especificidade (Gomes et al., 2003; Pennanen et al., 2001; Vainio & Hantula, 2000).

Na recente literatura, as condições para DGGE são de um gradiente desnaturante variando de 18-38%, uma corrida eletroforética de 18 horas, a uma voltagem constante de 180 V e temperatura de 58°C. Essas condições não foram favoráveis para a separação de amplicons gerados a partir de amplificação de genes 18S rDNA de amostras de DNA extraídas diretamente de solos naturais. Os tipos de solos utilizados para a extração de DNA metagenômico, nesses trabalhos, são solos agrícolas com cultivo de milho diferindo na capacidade de utilização de nitrogênio; solos com histórico de culturas como cevada, milho, trigo, batata e centeio; e solos com cultivo de morango, respectivamente (Costa et al., 2006; Gomes et al., 2003; Oros-Sichler et al., 2006). O protocolo ora proposto permite gerar com sucesso um perfil da estrutura das comunidades de fungos em solos naturais, adotando condições em que um gradiente desnaturante varia de 25-38%, uma corrida eletroforética de 15 horas, a uma voltagem constante de 200V e temperatura de 55°C.

Apesar de não ter sido observada diferença significativa dos números de amplicons entre os diferentes SUT, foi possível observar diferenças nos perfis das comunidades de fungos gerados por DGGE. O dendrograma gerado a partir da DGGE demonstra que os amplicons de fungos encontrados nos SUT de floresta primária, floresta secundária e agrofloresta se agruparam em um mesmo grupo, sendo mais similares. Dentro desse mesmo grupo, porém em um subgrupo mais distinto, estão localizados todos os amplicons dos diferentes pontos de agricultura. O segundo grupo separou muito bem todos os amplicons do SUT de pastagem. Estes resultados sugerem que as comunidades de fungos podem sofrer alterações, principalmente de acordo com o tipo de vegetação.

Os sistemas de florestas e agroflorestas são compostos principalmente por espécies arbóreas, enquanto que os de agricultura são cobertos por culturas anuais ou semiperenes. Já a pastagem é um sistema que possui uma maior intervenção antrópica, pois é uma área destinada à produção animal, composta

somente de gramíneas. A influência da vegetação sobre as comunidades de fungos foi demonstrada por Brodie et al. (2003), ao comparar comunidades de fungos em solos sob pastagens naturais com uma zona de transição florística, utilizando as técnicas de DGGE e TRFLP. Com a utilização da técnica RISA, alterações nas comunidades de fungos, em função do tipo de vegetação, também foram detectadas por Leckie et al. (2004), ao comparar em dois tipos de florestas localizadas no Canadá que se diferenciam na disponibilidade de nitrogênio. Uma alta diversidade de plantas pode promover uma riqueza em diversas comunidades microbianas, devido à formação de relações íntimas entre espécies de plantas específicas e microrganismos. Por outro lado, uma baixa diversidade de plantas pode estar associada com uma diversidade microbiana reduzida (Brodie et al., 2003; Pfenning & Abreu, 2006).

Uma das dificuldades em estudos de comunidades de fungos foi a seleção de *primers* específicos para fungos. Até o presente momento, a avaliação da diversidade de fungos em sistemas naturais por métodos moleculares tem sido limitada pela falta de *primers* específicos. Nikolcheva & Bärlocher (2004) desenharam *primers* específicos da região ITS de Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota e Oomycota. Entretanto, eles não foram específicos como sugerido pelos autores. O *primer* sugerido para Ascomycota amplificou membros dos outros filos e os demais *primers* falharam ao amplificar membros do grupo específico. Além disso, eles não foram eficientes para amplificar amostras de solos naturais (dados não mostrados).

A técnica de DGGE vem sendo muito utilizada em análises de comunidades de fungos do solo, mas é muito importante considerar algumas limitações quando a utilizamos para um estudo de ecologia de microrganismos. Algumas comunidades representativas podem não ser detectadas pelo sistema de *primers*, de modo que as bandas observadas no gel podem representar as espécies mais abundantes na amostra (Smit et al., 1999). Amplicons de fungos

diferentes podem possuir a mesma mobilidade eletroforética, ocupando a mesma posição no gel. Portanto, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo, com seqüências divergentes, mas com teores de G+C iguais (Gomes et al., 2003). Outra limitação é que um mesmo fungo pode gerar múltiplas bandas no gel de DGGE, devido à heterogeneidade do operon (Vainio & Hantula, 2000). Portanto, a DGGE pode ser mais adequada quando o objetivo é conduzir um estudo comparativo de áreas distintas ou impactadas (Muyzer et al., 1993). Se as amostras exibirem padrões de bandas de amplicons diferentes, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças. Caso o padrão de bandas seja o mesmo, então, estas diferenças podem estar presentes ou não, havendo a necessidade do emprego de outras técnicas para detectá-las (Lambais et al., 2005).

Diversos estudos de comunidades de fungos do solo associam diferentes técnicas moleculares para se obter uma visão real das espécies de fungos presentes no ambiente e das relações ecológicas desempenhadas por eles. He et al. (2005) utilizaram técnicas de *fingerprinting* TGGE e SSCP associadas com clonagem e seqüenciamento de genes 18S rDNA para comparar comunidades de fungos em solos de florestas naturais com solos de plantação de pinheiro. Essas técnicas demonstraram diferenças na composição das comunidades de fungos entre as amostras, sendo que a floresta primária possui uma maior diversidade de Ascomycota e menos Zygomycota do que a plantação de pinheiro.

Além de técnicas moleculares de *fingerprinting* (DGGE e ARDRA), clonagem e seqüenciamento, Malosso et al. (2006) utilizaram técnicas dependentes de cultivo para avaliar a diversidade de fungos em solos marítimos da Antártida. Utilizando técnicas de cultivo foi possível detectar leveduras e ascomicetos filamentosos nas amostras. Já com o emprego de técnicas moleculares foi possível encontrar seqüências de fungos pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota.

Singh et al. (2006) aplicaram as técnicas de DGGE e TRFLP, juntamente com métodos fisiológicos (Biolog) e bioquímicos (análise de ácidos graxos de fosfolipídeos ou *phospholipids fatty acid* ou PLFA) para detectar efeito da planta *Lolium perenne* em três tipos de solos com propriedades químicas diferentes sobre a estrutura das comunidades microbianas. Biolog detectou um significativo efeito da planta nas comunidades de microrganismos enquanto PLFA detectou tanto o efeito do tipo de solo quanto efeito da planta. TRFLP e DGGE apresentaram resultados similares, detectando forte efeito do tipo de solo sobre as comunidades de fungos.

Com exceção da pastagem, as áreas estudadas não sofreram intervenções antropogênicas significativas, porém, os resultados indicam que a intensificação do uso do solo levou a mudanças nas populações de fungos. O manejo das terras é muito similar em cada um dos sistemas de uso identificados, não indicando diferenças acentuadas, em termos de intensidade de uso em cada sistema. Em nenhum deles são utilizados insumos como corretivos, fertilizantes ou produtos para controle de pragas e doenças, bem como irrigação. O solo é cultivado durante um período e, posteriormente, deixado em pousio, o que permite uma certa recomposição do ecossistema, inclusive com a formação de florestas secundárias. Já foi demonstrado que após intervenções antrópicas como desmatamentos, queimadas e plantio de subsistência (arroz) em uma floresta tropical na Costa do Marfim, ocorreu uma considerável mudança nas comunidades de fungos. Porém, com posterior abandono da área, a recomposição dessas comunidades ocorreu rapidamente (Persiani et al., 1998).

Neste trabalho, foi possível estabelecer uma metodologia de DGGE para comunidades de fungos em solos naturais sob diferentes sistemas de uso da terra, e através desta metodologia foi possível detectar alterações nestas comunidades de acordo com cada SUT. Depois de estabelecida, a técnica de DGGE possui grande potencial para avaliar impacto causado por práticas

agrícolas, em um curto período de tempo. Futuramente, será realizado seqüenciamento das bandas presentes no gel de DGGE, para determinar quais são as espécies de fungos presentes nesses ambientes. Além disso, uma comparação entre esses resultados com os dados obtidos por métodos dependentes de cultivo, no qual foi possível detectar mais de 130 espécies de fungos (dados não publicados), será realizada. Com esta abordagem polifásica, será possível obter mais informações sobre a diversidade de fungos em solos naturais da região amazônica.

6 CONCLUSÕES

O sistema de Nested PCR com a combinação dos *primers* NS1/EF3 + NS1-FR1-GC forneceu amplificação eficiente de DNA metagenômico extraído diretamente de solos sob floresta tropical.

Foi possível detectar diferenças na estrutura das comunidades de fungos nas amostras de solos, gerando um perfil polimórfico de bandas por DGGE, característica para cada tipo de uso da terra.

Não há diferença significativa entre os diferentes sistemas, indicando que o impacto das práticas agrícolas é baixo e preserva a estrutura da comunidade de fungos.

Apesar destas áreas não terem sofrido intervenções antrópicas significativas, o protocolo desenvolvido neste trabalho mostrou-se sensível para detectar alterações na estrutura das comunidades de fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, Aug. 2004.

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a morrland – Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 1121-1132, Nov. 2003.

ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical soil biology and fertility, a handbook of methods**. Wallingford, UK: CAB International, 1989. 171 p.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal Applied Genetics**, Warszawa, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 125-152.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, n. 1/2, p. 147-154, 2001.

BRODIE, E.; EDWARDS, S.; CLIPSON, N. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 105-114, July 2003.

COSTA, R.; GÖTZ, M.; MROTZEK, N.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 236-249, May 2006.

FIDALGO, E. C. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O.; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; SANTOS, M. L. M.; HUISING, J. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: Phase I) Município de Benjamin Constant (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. Apostila

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 80, n. 6, p. 1579-1583, 1980.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 634-643, Nov. 2002.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 3758-3766, July 2003.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; WOLTERS, H.; DRAEGER, S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 404-413, Dec. 2006.

HAGN, A.; PRITSCH, K.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. **Biology and Fertility of Soils**, San Diego, v. 38, n. 4, p. 236-244, Aug. 2003.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 4, p. 1422-1432, Apr. 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 9, p. 888-891, Sept. 1997.

HE, J. Z.; XU, Z.; HUGHES, J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 247, n. 12, p. 91-100, June 2005.

HOUSTON, A. P. C.; VISSER, S.; LAUTENSCHLAGER, R. A. Microbial processes and fungal community structure in soils from clear-cut and unharvested areas of two mixedwood forests. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 630-340, Apr. 1998.

KENNEDY, N.; CLIPSON, N. Fingerprinting the fungal community. **Mycologist**, New York, v. 17, n. 2, p. 158-164, 2003.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, Aug. 2004.

KOWALCHUK, G. A. Fungal community analysis using denaturing gradient electrophoresis. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; BRUJIN, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer, 1999a. p. 1-16.

KOWALCHUK, G. A. New perspectives in analyzing fungal communities in terrestrial ecosystems. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 10, n. 3, p. 247-251, June 1999b.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. R.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005, v. 4, p. 43-84.

LECKIE, S. E.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J.; NEUFELD, J. D.; MOHN, W. W. Characterization of humus microbial communities in adjacent forest types that differ in nitrogen availability. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, n. 1, p. 29-40, July 2004.

LODGE, D. J. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 6, n. 5, p. 681-688, May 1997.

- MALOSSO, E.; WAITE, I. S.; ENGLISH, L.; HOPKINS, D. W.; O'DONNELL, A. G. Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. **Polar Biology**, New York, v. 29, n. 7, p. 552-561, June 2006
- MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, n. 1/4, p. 557-564, 2002.
- MAY, L. A.; SMILEY, B.; SCHMIDT, M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 7, p. 829-841, Sept. 2001.
- MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**, New York, v. 20, p. 62-74, 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. Soil organisms in tropical ecosystems: a key role for Brazil in the global quest for the conservation and sustainable use of biodiversity. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p. 1-12.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 317-322, June 1999.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, Jan. 1998.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

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

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 655-670, Dec. 2003.

NIKOLCHEVA, L. G.; BÄRLOCHER, F. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 41-49, Fev. 2004.

OROS-SICHLER, M.; GOMES, N. C. M.; NEUBER, G.; SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 63-75, Apr. 2006.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, London, v. 276, n. 5313, p. 734-740, May 1997.

PENNANEN, T.; PAAVOLAINEN, L.; HANTULA, J. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 4/5, p. 697-699, Apr. 2001.

PERSIANI, A. M.; MAGGI, O.; CASADO, M. A.; PINEDA, F. D. Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest. **Mycologia**, Bronx, v. 90, n. 2, p. 206-214, Mar./Apr. 1998.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p. 184-205.

RANJARD, L.; LEJON, D. P. H.; MOUGEL, C.; SCHEHRER, L.; MERDINOGLU, D.; CHAUSSOD, R. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 1111-1120, Nov. 2003.

RODRIGUES, T. E. Solos da Amazônia. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. F. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: SBCS, UFV, 1996. p. 251-260

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: USP, 2002. p. 97-128.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular Microbial Ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 135-147, abr./jun. 1997.

SAIKI, R. K.; GELFAUD, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, London, v. 239, n. 6189, p. 487-494, Sept. 1988.

SHEFFIELD, V. C.; COX, D. R.; MYERS, R. M. Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 86, n. 1, p. 232-236, Jan. 1989.

SIGLER, W. V.; TURCO, R. F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 107-118, Sept. 2002.

SINGH, B. K.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J. M.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 72-82, Mar. 2006.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J. D.; WERNARD, K. 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, June 1999.

STÜMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p. 206-236.

SWIFT, M.; BIGNELL, D. **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Bogor: ICRA, 2001. 34 p. (ASB Lecture Note 6B).

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 2657-2665, 1993.

THORN, G. The fungi in soil. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63-127.

THORN, R. G.; REDDY, C. A.; HARRIS, D.; PAUL, E. A. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4288-4292, Nov. 1996.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 195-276.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, New York, v. 104, n. 8, p. 927-936, Aug. 2000.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; WOLTERS, A. K.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 133-151, Dec. 2000.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. 1990. p. 315-322.

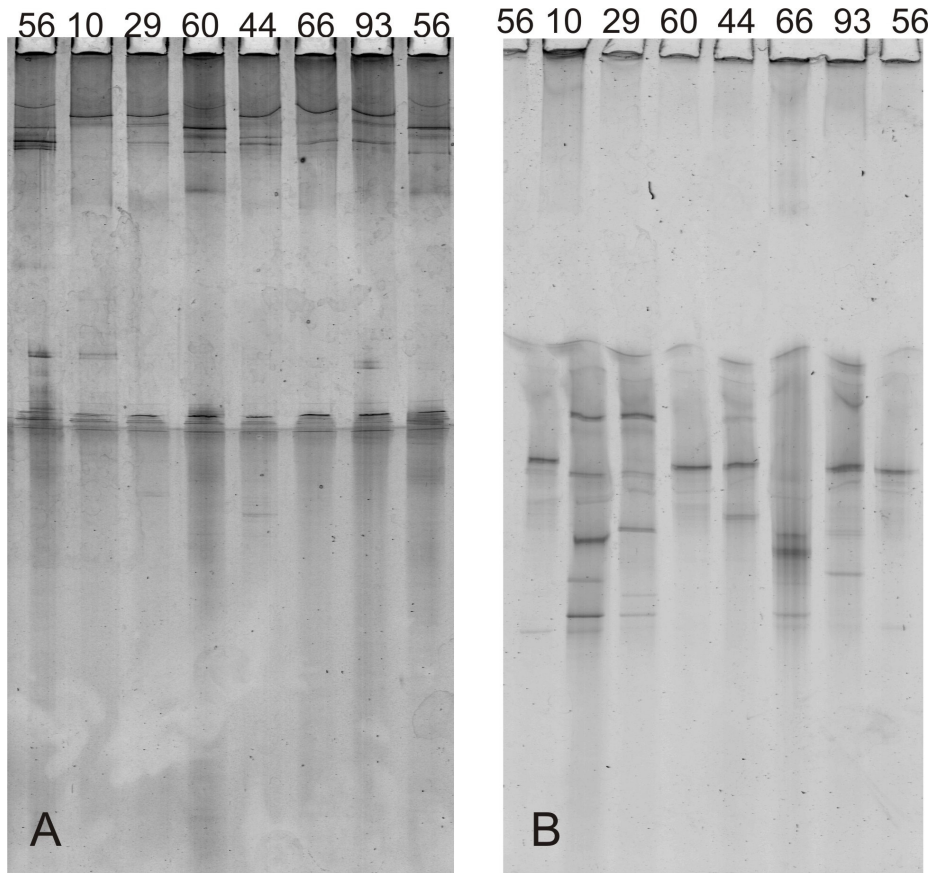
WIDDEN, P.; PARKINSON, D. Fungi from Canadian coniferous forest soils. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, n. 12, p. 2275-2290, 1973.

World Resources Institute (WRI), World Conservation Union (IUCN), United Nations Environment Programme (UNEP). **Global biodiversity strategy: guidelines for action to save, study, and use earth's biotic wealth sustainably and equitably**. 1992.

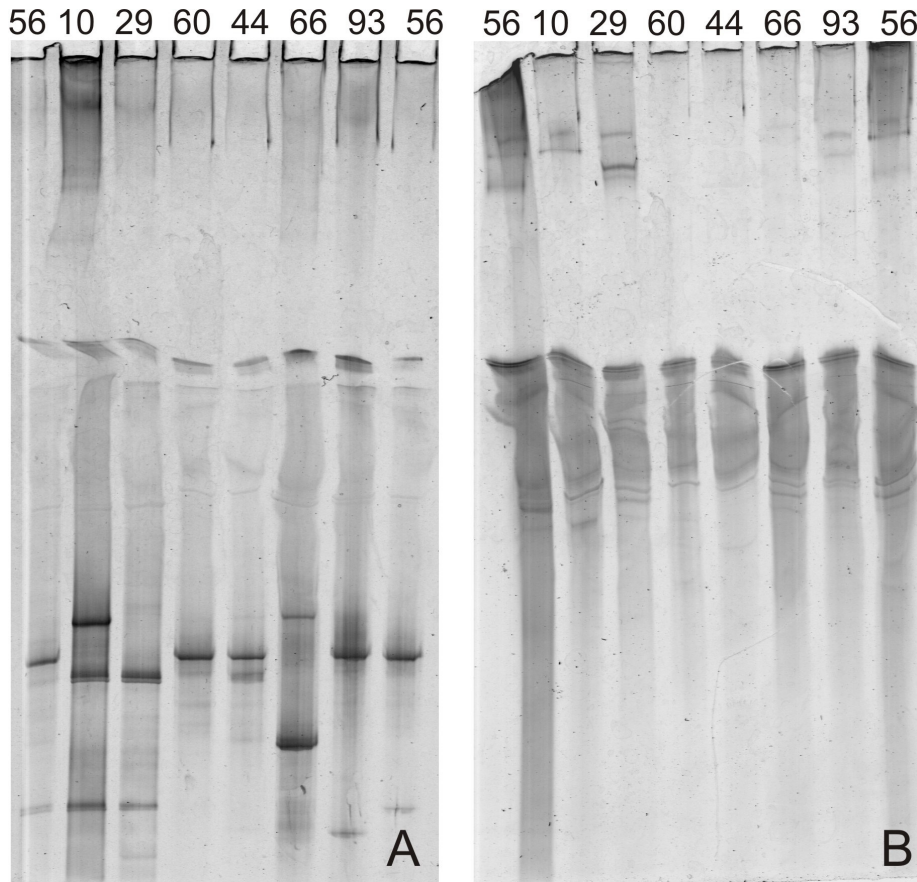
ANEXOS

ANEXO A	Página
ANEXO 1A	Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 8% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h. B - 6% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h 46
ANEXO 2A	Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 6% de bis-acrilamida, 20-30% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h. B - 6% de bis-acrilamida, 25-35% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h 47
ANEXO 3A	Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 6% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 200 V, 55°C, 15 h. B - 6% de bis-acrilamida, 25-45% de gradiente desnaturante, 200 V, 55°C, 15 h 48

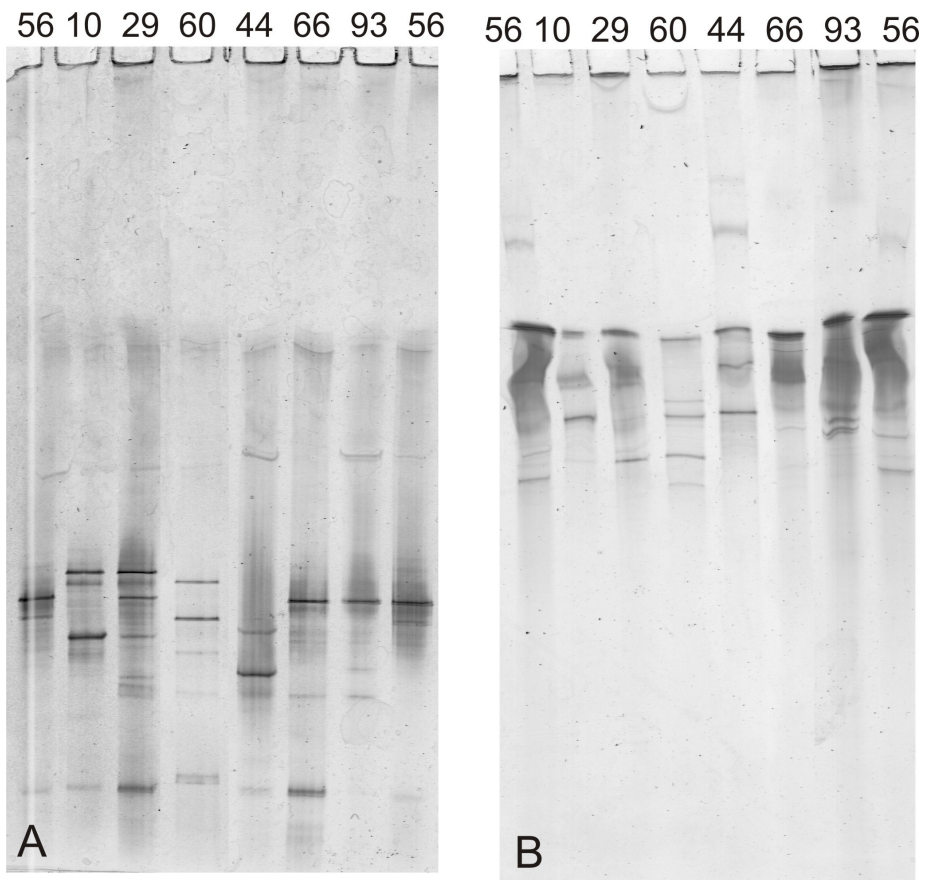
ANEXO 1A - Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 8% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h. B - 6% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h.



ANEXO 2A – Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 6% de bis-acrilamida, 20-30% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h. B - 6% de bis-acrilamida, 25-35% de gradiente desnaturante, 180 V, 58°C, 18 h.



ANEXO 3A – Gel de DGGE, gerados por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com NS1/EF3; NS1-FR1-GC de amostras de solo sob diferentes sistemas de uso da terra. A - 6% de bis-acrilamida, 18-38% de gradiente desnaturante, 200 V, 55°C, 15 h. B - 6% de bis-acrilamida, 25-45% de gradiente desnaturante, 200 V, 55°C, 15 h.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)