



**JOÃO GABRIEL BARBOSA BRAGA**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CAMADAS  
ORGÂNICAS DO SOLO DA AMAZÔNIA**

**LAVRAS – MG  
2020**

**JOÃO GABRIEL BARBOSA BRAGA**

**FUNGOS MICRORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CAMADAS ORGÂNICAS DO  
SOLO DA AMAZÔNIA**

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

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus

Orientador

Dr. Cândido Barreto de Novais

Coorientador

**LAVRAS – MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Braga, João Gabriel Barbosa.

Fungos Micorrízicos Arbusculares em Camadas Orgânicas do  
Solo da Amazônia / João Gabriel Barbosa Braga. - 2020.

56 p.

Orientador(a): Ederson da Conceição Jesus.

Coorientador(a): Cândido Barreto de Novais.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Micorrizas. 2. Diversidade. 3. Amazônia. I. Jesus, Ederson  
da Conceição. II. de Novais, Cândido Barreto. III. Título.

**JOÃO GABRIEL BARBOSA BRAGA**

**FUNGOS MICRORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CAMADAS ORGÂNICAS DO  
SOLO DA AMAZÔNIA**

**ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN ORGANIC LAYERS OF AN AMAZON  
SOIL**

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

APROVADA em 06 de fevereiro de 2020  
Dr. Ederson da Conceição Jesus - EMBRAPA  
Dr. Marco Aurelio Carbone Carneiro - UFLA  
Dr. Sidney Luiz Stürmer - FURB

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus

Orientador

Dr. Cândido Barreto de Novais

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

*Dedico aos meus pais pelo carinho e apoio nesta jornada.*

*Ao meu avô pelo exemplo de vida que me foi passado.*

## **Agradecimento**

A Universidade Federal de Lavras em especial aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e a CAPES pela concessão de bolsa.

A National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NAS) e à USAID pelo apoio financeiro do projeto 4-299 sob o acordo AID-OAA-A-11-00012.

Aos meus pais pelos exemplos de vida e educação a mim passados. Pelo amor e carinho incondicional e por sempre acreditarem e apoiarem meus planos de vida.

A professora Sandy pelo apoio em minha iniciação científica e por ter aberto portas na minha vida.

Ao professo André Vargas pela orientação, confiança e o apoio nos momentos difíceis.

Aos meus amigos que sempre ao meu lado nos momentos de descontração me fizeram enxergar o lado mais leve da vida.

Ao meu Orientador e Coorientador Ederson e Cândido pela paciência e os conhecimentos a mim transferidos. Só chegamos até aqui pela dedicação e apoio que me deram e saibam que por isso serei eternamente grato.

A Bia pelo amor, companheirismo, e apoio com sua calma e serenidade mesmo nos momentos mais complicados. Se não fosse seu apoio não chegaria até aqui.

Aos meus colegas de departamento que em meio as dificuldades se tornaram amigos que carregaram junto a mim.

Aos meus irmãos da República Lobo Mau que acolheram e que me proporcionaram as melhores experiências em Lavras e que são amigos que sei que levarei para o resto da vida.

A todos os professores que atuaram em minha educação, pois ela é a base de tudo.

**A todos Muito Obrigado!**

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”*

(Isaac Newton)

## RESUMO

A Amazônia atrai grande atenção da comunidade científica internacional por ser um dos principais centros de biodiversidade do planeta. Embora possua uma grande diversidade vegetal, esse bioma se localiza em uma região onde predominam solos de baixa fertilidade. Boa parte da biomassa e energia armazenadas por esses vegetais é perdida para os sistemas decompositores presentes no solo, mantendo, dessa forma, uma camada orgânica de grande relevância para manutenção da nutrição vegetal. A manutenção desse ecossistema seria impossível sem a presença de microrganismos transformadores e enriquecedores nas chamadas formas de húmus. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constituem uma fração importante desses microrganismos e sua diversidade e abundância são diretamente relacionadas com a diversidade e produção de sistemas florestais. Apesar de ter sido alvo de diversos estudos, pouco se sabe sobre a dinâmica das comunidades microbianas nas formas de húmus da Amazônia, principalmente tendo em vista sua importância nesse ecossistema singular. Dessa forma, esse trabalho teve o objetivo de avaliar a diversidade de FMA em um fragmento de floresta da Amazônia oriental e um pasto adjacente, relacionando-a com a distribuição vertical da matéria orgânica. Adicionalmente, plantas micoheterotróficas foram coletadas na área de estudo e as espécies de FMA associadas às suas raízes e de plantas adjacentes foram avaliadas assim como os presentes nas raízes das plantas adjacentes. As amostras foram coletadas no município de Baião (PA). Cinco pontos distanciados 50 m entre si foram coletados ao longo de um transecto na floresta e no pasto. O solo da floresta foi estratificado em sete camadas, desde a liteira até o horizonte A subjacente. Na pastagem, foram coletadas três camadas incluindo o solo mineral. A porção mineral dos solos e as camadas orgânicas que continham raízes foram utilizadas para o preparo de vasos de cultivo armadilha com *Uruchloa decumbens*. Após a multiplicação dos fungos e obtenção de esporos viáveis, os fungos foram identificados com base em sua morfologia e ferramentas moleculares. Não foi observada diferença na composição de espécies de espécies de FMA entre as camadas e os sistemas de uso da terra avaliados. Porém, a maior concentração de glomalina foi observada nas camadas FH, H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> da floresta, que se caracterizam por serem ricas em raízes finas e, portanto, como sítios de infecção para FMA. A planta micoheterotrófica foi classificada como *Voyriella parviflora*. Apenas duas espécies, uma do gênero *Glomus* e, outra, de *Racocetra* estavam associadas à *V. parviflora*, indicando que essa planta seleciona essas espécies dentre as demais existentes nas raízes das plantas autotróficas da liteira circundante.

**Palavras-chave:** Formas de Húmus. Micorrizas. Nutrição vegetal. Ciclagem de nutrientes.

## ABSTRACT

The Amazon attracts great attention from the international scientific community for being one of the main biodiversity centers on the planet. Despite its high plant diversity, this biome is located in a region where soils of low fertility predominate. Much of the biomass and energy stored by these plants are lost to the decomposing systems present in the soil, thus maintaining an organic layer of high relevance for the maintenance of plant nutrition. The maintenance of this ecosystem would be impossible without the presence of microorganisms that transform and enrich the so-called humus forms. Among them are the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), whose diversity and abundance are directly related to the diversity and production of forest systems. Despite having been the subject of several studies, little is known about the dynamics of microbial communities in humus forms in the Amazon, mainly because of their importance in this unique ecosystem. Thus, this work aimed to assess the diversity of AMF in a forest fragment in the eastern Amazon and an adjacent pasture, relating the AMF diversity with the vertical distribution of organic matter. Additionally, mycoheterotrophic plants were collected, and the AMF associated with their roots and those of adjacent plants were evaluated. The samples were collected in the city of Baião (PA). Five points, 50 m apart, were collected along a transect in the forest and pasture. The forest floor was stratified into seven layers, from the litter to the underlying A horizon. In the pasture, three layers were collected, including the mineral soil. The mineral portion of the soils and the organic layers that contained roots were used to prepare trap cultivation pots with *Uruchloa decumbens*. After the multiplication of fungi and obtaining viable spores, the fungi were identified based on their morphological and molecular characters. No difference in the composition of species of AMF species between the layers and the land-use systems evaluated. However, the highest concentration of glomalin was observed in the FH, H<sub>1</sub>, and H<sub>2</sub> layers of the forest, which are characterized by being rich in thin roots and, therefore, as infection sites for AMF. The mycoheterotrophic plant was classified as *Voyriella parviflora*. Only two species, one of the genus *Glomus* and the other, of *Racocetra*, were associated with *V. parviflora*, indicating that this plant selects these species among the others existing in the roots of the surrounding autotrophic plants.

**Keywords:** Humus forms. Mycorrhiza. Plant nutrition. Nutrient cycling.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE: INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Classificação de FMAs</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 FMA no bioma Amazônia</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 As formas de húmus e sua relação com a floresta amazônica</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5 Glomalina</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6 Micoheterotrofismo na família das Gentianaceae</b> .....	<b>20</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>22</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	<b>26</b>
<b>ARTIGO 1: FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E SUA DISTRIBUIÇÃO NAS CAMADAS ORGÂNICAS DO SOLO DA AMAZÔNIA</b> .....	<b>26</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Coleta do material e área de amostragem</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Cultivo armadilha de FMA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3 Extração de esporos e identificação morfológica de FMA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4 Identificação molecular de FMA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.5 Proteína do solo relacionada a glomalina</b> .....	<b>33</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 FMA observados nas camadas orgânicas e no solo da Amazônia</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Proteína no solo relacionada a glomalina</b> .....	<b>38</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>ARTIGO 2: FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS A UMA PLANTA MICOHETEROTRÓFICA DA AMAZÔNIA ORIENTAL</b> .....	<b>44</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>2.1 Coleta do material</b> .....	<b>47</b>

<b>2.2 Preparo de vasos armadilha</b> .....	<b>48</b>
<b>2.3 Extração e identificação de esporos multiplicados nos vasos armadilhas</b> .....	<b>48</b>
<b>2.4 Análise molecular das plantas coletadas</b> .....	<b>49</b>
<b>2.4.1 Análise filogenética</b> .....	<b>49</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Filogenia e identificação molecular de <i>Voyriella parviflora</i></b> .....	<b>50</b>
<b>3.2 FMAs associados à planta micoheterotrófica e disponíveis na camada orgânica</b> .....	<b>50</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## PRIMEIRA PARTE

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

O bioma Amazônia é considerado um dos principais centros mundiais de biodiversidade por se tratar de um ecossistema extremamente biodiverso e por possuir duas das maiores bacias hidrográficas do Brasil: a bacia do rio Amazonas, que abrange uma área de 6,9 milhões de km<sup>2</sup> e a bacia dos rios Tocantins-Araguaia, que com 767 mil km<sup>2</sup> (CARVALHO, 2009). Nessa região predominam as classes Latossolo-Amarelo distrófico de textura argilosa e Argissolo Vermelho-Amarelo (SANCHEZ *et al.*, 1982; MOREIRA & MALAVOLTA, 2004; HERRERA *et al.*, 1978). Quimicamente esses solos são ácidos, saturados por alumínio (Al) e pobres na maioria dos nutrientes, o que parece ser contraditório levando-se em consideração que, nessas condições, se encontram os ambientes florestais com maior diversidade vegetal do planeta. O que torna tal biodiversidade possível é o fato de, nesse ambiente, as plantas dependerem em grande parte dos compostos nutricionais liberados pela liteira decomposta. Isso ocorre graças à interação de organismos transformadores e enriquecedores do solo (OLIVEIRA E OLIVEIRA, 2010; HERRERA *et al.*, 1978).

Tendo em vista a importância da liteira decomposta e das camadas orgânicas e organo-minerais dos diversos solos dos ecossistemas da floresta amazônica, os estudos de classificação das formas de húmus nesse ambiente são de extrema relevância. Até o momento, apenas um estudo abordou as formas de húmus na Amazônia (CESÁRIO *et al.*, 2015) e apesar de sua importância para a dinâmica dos nutrientes na floresta, estas têm sido desconsideradas dos levantamentos de biodiversidade. Os húmus descritos por Cesário *et al.* (2015) foram classificados como do tipo Mull, sendo que uma das áreas estudadas apresentou uma fina camada de raízes na superfície do solo. Além disso, encontrou-se a presença de fungo da podridão branca, característico de Moder em solos temperados, em húmus do tipo Mull, o que foi considerado atípico.

Os fungos são os principais decompositores de matéria orgânica, sendo os microrganismos de maior relevância na ciclagem de nutrientes, e ainda são microrganismos frequentemente relacionados a fitopatologias (LINDAHL, 2007). Deste modo, eles têm um papel relevante na decomposição da matéria orgânica nas diferentes formas de húmus, em especial na Mor e na Moder, onde a atividade da fauna do solo é desestimulada. Além de sua importância na transformação da matéria orgânica acumulada sobre o solo, existem ainda

fungos que se associam simbioticamente com o sistema radicular das plantas formando as chamadas micorrizas. Dentre eles, destacam-se os fungos micorrizicos arbusculares (FMA), principais formadores de micorrizas em ambientes tropicais (DE SOUZA *et al.*, 2008, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2010). Nessa associação mutualística a planta supre o fungo com energia para crescimento e reprodução via fotossintatos. Por sua vez, o fungo provê a planta e o solo com uma gama de serviços, sendo os principais realizados pelo micélio extra-radicular como, por exemplo, a absorção de nutrientes, o aumento da resistência da planta a ataques de patógenos do sistema radicular e o aumento da capacidade de absorção de água (SOUZA *et al.*, 2008). Estima-se que 80% das espécies vegetais formem micorrizas arbusculares, sendo então essa relação considerada uma regra e não uma exceção na natureza (MOREIRA, 2006; SEQUEIRA *et al.*, 2010).

Os FMA são pertencentes ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes, e tratam-se de organismos biotróficos obrigatórios que estabelecem uma simbiose de extrema importância nos ecossistemas tropicais, principalmente pelo seu papel na aquisição de nutrientes, sendo relacionados à nutrição de fósforo (P), que é o nutriente mais limitante para o desenvolvimento vegetal nos solos dos trópicos (SEQUEIRA *et al.*, 2010; MOREIRA, 2006). Além disso, a própria biodiversidade de fungos micorrizicos está intimamente ligada à diversidade e produtividade de comunidades vegetais (GOI & SOUZA, 2006).

No campo, foi identificada a existência de uma forma de húmus semelhante ao tipo Mor em uma floresta no estado do Pará. Esta forma de húmus foi encontrada em solos muito arenosos, classificados como espodossolos (DOS SANTOS, *et al.* 2018). Algumas árvores localizadas nessa floresta são de grande porte, o que é incomum nesses tipos de solo. Na Amazônia, os espodossolos são encontrados em campinas e campinaranas e, quando sob floresta, esta tem árvores com caule de pequeno diâmetro, o que não é o caso da floresta em questão (TADINI, A. M. *et al.*, 2017; DO VALLE, C. M. *et al.*, 2005). Em alguns pontos, as camadas orgânicas alcançam mais de 20 cm de profundidade, com uma grande quantidade de raízes envolvidas por matéria orgânica decomposta. Este fato levou à hipótese de que FMA estão presentes nessa camada uma vez que estão densamente ocupadas pelas raízes das plantas deste fragmento florestal. Além disso, plantas micoheterotróficas do gênero *Voyriella*, que se associam a FMA (IMHOF & WEBER, 1997) foram observadas na serapilheira, o que indica que esses fungos também estão se associando a outras plantas da floresta na camada orgânica do solo.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo (1) estudar a diversidade e distribuição de FMA nas diferentes camadas orgânicas e no solo dessa floresta; e (2) estudar os fungos micorrízicos associados às plantas micoheterotróficas presentes nesse fragmento. A floresta foi contrastada com uma pastagem adjacente, visando identificar o impacto da conversão da floresta a pasto.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares**

Os FMA são organismos do solo que estabelecem a simbiose mais comum entre plantas e microrganismos. Estes fungos pertencem ao filo Glomeromycota e são encontrados nas raízes da grande maioria das plantas terrestres, formando uma associação mutualística. Existem inúmeras espécies de FMA, incluindo espécies com grande valor econômico, sendo que estes fungos são registrados em todos os ecossistemas terrestres, desde polares até tropicais úmidos ou desérticos (SMITH & READ, 2008). As micorrizas arbusculares são indicadas como um dos possíveis fatores que possibilitaram o sucesso da transição das plantas para o ambiente terrestre e foram registradas ocorrendo em angiospermas, pteridófitas e briófitas (REDECKER, 2000). Como organismos simbiotróficos obrigatórios, estes fungos dependem de raízes metabolicamente ativas para manter seu ciclo de vida. Existem três principais formas de propágulos de FMA no solo: segmento de raízes infectada, hifas ou micélio extraradicular ou os esporos, que podem ser considerados os principais (SMITH & READ, 2008; REDECKER, 2000). Dessa forma o ciclo se inicia com o prolongamento da hifa a partir de um desses tipos de propágulo em direção a uma raiz metabolicamente ativa. Havendo o contato entre o fungo e a raiz, um apressório é formado e ocorre a colonização interna da raiz, com a formação de estruturas intraradiculares conhecidas como arbúsculos, através das quais o fungo passa a receber fotoassimilados para conduzir seu desenvolvimento. Ocorre a emissão de hifas extraradiculares, que atuam na absorção de nutrientes e água para a planta. Com a colonização bem estabelecida, o fungo começa a produzir esporos, que são as estruturas morfológicamente mais características de cada espécie (GIOVANNETTI, 2010; SMITH & READ, 2008). Algumas formam o esporo dentro das raízes colonizadas, outras a partir do micélio extraradicular, podendo ocorrer de forma individual ou em estruturas conhecidas como esporocarpos (GUPTA, 2017).

As micorrizas arbusculares beneficiam os vegetais pois, através das hifas extraradiculares, o fungo coloniza a rizosfera em busca de nutrientes e atua como um

competidor para microrganismos possivelmente patógenos que ocorram próximos às raízes (SMITH & READ, 2008; PFEFFER *et al.* 2004). Além disso, o micélio externo aumenta a capacidade da planta em explorar o solo, pois aumenta a área superficial de contato e o volume do sistema radicular, possibilitando, assim, um suprimento de água e nutrientes que não seriam alcançados pelas raízes da planta hospedeira. Como as hifas possuem diâmetro muito menor que as raízes, elas são capazes de penetrar em poros do solo que não estariam acessíveis para às raízes da maioria das plantas, ampliando a absorção dos nutrientes presentes nestes ambientes (SMITH & READ, 2008). Nesse processo de formação de micélio extraradicular, os FMAs ainda promovem a agregação do solo pela ação mecânica de suas hifas e pela liberação de substâncias que são exsudadas ou liberadas pela decomposição da parede celular de suas hifas e esporos. Um exemplo, é a glomalina, que é uma glicoproteína hidrofóbica que serve como um agente agregador das partículas de solo, diminuindo a erosão do solo (SILVA, C. F. *et al.*, 2014; PURIN & RILLING, 2007). O fósforo é o macronutriente com maior ênfase nesta simbiose, pois trata-se de um nutriente com baixa mobilidade no solo, sendo encontrado em formas insolúveis, o que dificulta sua absorção pelos vegetais (PFEFFER *et al.*, 2004). O fósforo é tão importante dentro do contexto dos FMA que, hoje, já se sabe que o fluxo de carbono da planta para o fungo varia em relação à concentração desse nutriente em formas disponíveis no solo (KONVALINKOVÁ, *et al.*, 2017). Uma planta que se encontra em um solo com baixa concentração de fosfato, irá investir mais carbono na sua relação com os FMA. Esse investimento da planta na micorrização de suas raízes pode chegar até a 20% de todo carbono fotoassimilado, existindo evidências de que os FMA também colaboram como um dreno do carbono atmosférico, aumentando a biomassa e o carbono disponíveis no solo para outros organismos que nele habitam (KONVALINKOVÁ, *et al.*, 2017). Desta forma, é possível afirmar que as micorrizas arbusculares possuem um papel relevante na ciclagem de fosfato e carbono, influenciando drasticamente a produtividade de ecossistemas terrestres. O micélio dos FMA é capaz de interconectar o sistema radicular de plantas vizinhas distintas ou da mesma espécie, fazendo com que a maioria das plantas em ecossistemas terrestres estejam interligadas por uma rede de hifas em comum (GIOVANNETTI, 2010). Portanto, são evidentes os benefícios promovidos pelos FMA, o que se reflete em um grande interesse biotecnológico e ecológico ainda a ser explorado.

## 2.2 Classificação de FMA

Os primeiros trabalhos que tentaram classificar os FMA, feitos com base na morfologia de suas hifas e esporos, datam do final do século XIX e início do século XX. Estes fungos foram, inicialmente, incluídos na família Endogonaceae, dentro do filo Zigomycota, devido à semelhança de seus esporos com os de Zigomycetos (GERDEMANN; TRAPPE, 1974). A partir de estudos mais recentes com abordagem molecular associados com as características morfológicas foi possível a criação de um filo exclusivo para os fungos formadores de micorrizas arbusculares, sendo o filo Glomeromycota (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2003; STÜRMER, 2012). Nos últimos anos, os estudos baseados principalmente no gene 18S RNAr destes organismos provocaram inúmeras modificações em sua filogenia. Desta maneira, foram descritas três classes (Archeosporomycetes, Glomeromycetes e Paraglomeromycetes), cinco ordens (Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales e Paraglomerales), 14 famílias e 29 gêneros (Tabela 1) com aproximadamente 333 espécies como indicado na lista do site <http://www.amf-phylogeny.com> (REDECKER *et al.* 2013).

A grande maioria das espécies de plantas investigadas até hoje são colonizadas por FMA, sendo que existem poucos dados experimentais que evidenciam especificidade por hospedeiro por parte destes fungos, uma vez que uma única espécie de fungo pode colonizar diversas espécies de plantas. Estudos que buscaram traços de DNA destes fungos em raízes de uma planta colonizada revelaram que uma única planta pode se associar com mais de 20 diferentes espécies de FMA (FITTER, 2005). A ausência de especificidade hospedeira por parte dos FMA foi reforçada em estudos mais recentes. Entretanto não se pode excluir a possibilidade da especificidade ocorrer por parte do vegetal, podendo existir compatibilidade simbiótica diferenciada (CAMPOS *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Classificação dos FMA

Classe	Ordem	Família	Gêneros	
Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Simiglomus</i> <i>Septoglomus</i>	
		Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>	
		Entrophosporaceae	<i>Viscospora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Albahypha</i>	
		Diversisporales	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> <i>Redeckera</i> <i>Otospora</i> <i>Tricispora</i>
			Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> <i>Kuklospora</i>
			Sacculosporaceae	<i>Sacculospora</i>
			Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Gigasporales		Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
			Scutellosporaceae	<i>Scutellospora</i> <i>Orbispora</i>
		Racocetraceae	<i>Racocetra</i> <i>Cetraspora</i>	
		Dentiscutataceae	<i>Dentiscutata</i> <i>Fuscutata</i> <i>Quatunica</i>	
	Archaeosporomycetes	Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> <i>Intraspora</i>
			Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
			Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
	Paraglomeromycetes	Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>

Fonte: Redecker *et al.* 2013

### 2.3 FMA no bioma Amazônia

Como já elucidado anteriormente, o bioma Amazônia tem a predominância de solos relativamente pobres em nutrientes, sendo que sua diversidade vegetal depende principalmente da decomposição da liteira para o estabelecimento e manutenção das plantas existentes nesse habitat, que são, em sua maioria, perenes e de porte arbóreo (OLIVEIRA E OLIVEIRA, 2010; HERRERA *et al.*, 1978). Levando em consideração as características do solo e das formas de húmus do bioma Amazônia, dando ênfase no que se diz respeito à nutrição vegetal, fica claro que os FMA se constituem numa importante fração da riqueza biológica dos solos da Amazônia (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2010).

A ocorrência de FMA na Amazônia já foi estudada tanto em plantas nativas de importância ecológica como em espécies frutíferas, medicinais, ornamentais e madeiras, que possuem importância econômica para o local (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2010; OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2016; DA SILVA JUNIOR & CARDOSO, 2006; OLIVEIRA & DE OLIVEIRA, 2005; STÜMER & SIQUEIRA, 2011). Os diferentes trabalhos realizados revelaram que os FMA ocorrem naturalmente nesse ecossistema, tanto em ambientes de várzea quanto em terra firme, sendo os FMA extremamente abundantes e apresentando elevada diversidade de espécies em todos os ambientes estudados (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2010). Os estudos realizados foram capazes de observar um padrão de relação entre os gêneros de plantas estudadas e a taxa de colonização das raízes, sendo que algumas espécies vegetais foram, inclusive, descritas como não micorrizadas, sendo o caso da família das Lecitidáceas que representa um das poucas exceções na Amazônia (MOREIRA *et al.*, 1997).

Sendo uma região de predominância de espécies vegetais perenes e sujeita a dois períodos climáticos distintos, um com maior precipitação pluviométrica no chamado inverno regional (ocorrendo de dezembro a maio) e, outro, com menor precipitação no chamado verão regional (ocorrendo de agosto a outubro), a sazonalidade foi considerada como um fator significativo na ocorrência e colonização de FMA, sendo observada maior colonização durante o período do verão regional para a maioria das espécies estudadas, considerando espécies vegetais avaliadas em mata nativa e sistemas agroflorestais (DE OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2004; DA SILVA JUNIOR & CARDOSO, 2006; OLIVEIRA & DE OLIVEIRA, 2016). Essa variação sazonal pode ser relacionada ao fato de que, no período de maior colonização, as plantas podem estar emitindo mais raízes novas e finas, altamente suscetíveis a nova colonização (DA SILVA JUNIOR & CARDOSO, 2006; OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2010).

## 2.4 As formas de húmus e sua relação com a floresta amazônica

O termo “formas de húmus” refere-se às camadas de material orgânico não decomposto acumulado sobre o solo, assim como ao material orgânico já misturado com partículas minerais do horizonte A (KROGH, 2010). À vista disso, pode-se subdividir as formas de húmus em horizontes exclusivamente orgânicos, sendo também chamados de horizontes holorgânicos; e horizontes organo-minerais, denominados de hemiorgânicos (KINDLEL & GARAY, 2001). A diferenciação entre as composições e perfis das formas de húmus, leva em consideração a presença ou ausência de alguns horizontes e serve como base para sua classificação (KINDLEL & GARAY, 2001; KINDLEL & GARAY, 2002; KROGH, 2010; GARAY *et al.*, 2016).

A camada orgânica do solo já é reconhecida como o local onde ocorre o maior número de processos biológicos e de caráter físico-químico responsáveis pela formação do solo e pelo funcionamento de ecossistemas terrestres (KROGH, 2010). A estrutura e composições dos perfis de forma de húmus refletem um conjunto de processos bastante complexos que envolvem diversas espécies de microrganismos e animais que conduzem a decomposição bioquímica e mecânica da matéria orgânica presente sobre o solo, de modo a transformá-la em diversos tipos de nutrientes (KINDLEL & GARAY, 2001; KINDLEL & GARAY, 2002; GARAY *et al.*, 2016). Grande parte da produção primária, relativa à matéria e energia estocadas pelos vegetais, é perdida para os subsistemas decompositores (KINDLEL *et al.*, 2003).

Existem algumas estratégias utilizadas pelos ecossistemas para melhor aproveitamento dos nutrientes disponíveis nas camadas orgânicas sobre o solo, estratégias estas que se refletem na forma de húmus e que são dependentes de fatores como a biodiversidade do solo, o clima do local, o tipo de solo subjacente, a composição da matéria orgânica e a geologia do local. Dessa forma, existem três principais formas de húmus que ocorrem em ecossistemas terrestres, sendo elas chamadas de Mull, Moder e Mor (KINDLEL & GARAY, 2002; KINDLEL *et al.*, 2003; ZANELLA *et al.*, 2010; KROGH, 2010).

A forma Mor é descrita como uma forma de húmus onde a decomposição ocorre lentamente, ocorrendo um grande acúmulo de matéria orgânica sobre uma camada inorgânica, havendo nítida transição entre os horizontes orgânicos e mineral. Essa forma de húmus é predominantemente descrita em ambientes com temperaturas mais baixas ou ocorrendo sobre solos com menos nutrientes, ácidos e com menor biodiversidade, principalmente no que se diz respeito à fauna do solo, levando em consideração que o papel de misturar o solo é realizado pela mesofauna edáfica (GARAY, *et al.*, 2016).

A forma de húmus classificada como Moder é um estado intermediário entre Mor e Mull, no qual a decomposição da matéria orgânica já ocorre em um ritmo um pouco mais acelerado, havendo presença de fauna no solo e tendo a decomposição da matéria orgânica principalmente mediada por fungos; entretanto, ainda ocorre o acúmulo de uma camada nitidamente composta por matéria orgânica distinta do solo mineral, podendo existir uma camada organo-mineral entre o húmus e o solo.

A classe Mull é descrita como uma forma de húmus que ocorre em ambientes ricos em nutrientes no solo, onde existe uma maior produção de matéria orgânica com consequente acúmulo sobre o solo. Contudo, sua decomposição acontece mais rapidamente, havendo uma melhor distribuição dos nutrientes liberados pela decomposição entre as porções do solo mineral (ZANELLA *et al.*, 2010; KROGH, 2010). No Mull, a fauna do solo mistura a matéria orgânica no horizonte mineral superficial de modo que não existe a estratificação da matéria orgânica observada nas formas Mor e Moder.

Em florestas temperadas e boreais as formas de húmus já foram bem descritas e classificadas, sendo a base para todo o conhecimento para a classificação das formas de húmus. Entretanto ao estender os conhecimentos dessas classificações para os ecossistemas tropicais, observou-se que a diversidade e características morfológicas das formas encontradas acompanham a grande diversidade de situações próprias a esses ecossistemas e suas dinâmicas (GARAY *et al.*, 2016).

## 2.5 Glomalina

A identificação de FMA em amostras ambientais de estudos ecológicos sempre apresentou dificuldades. Por isso, diferentes abordagens foram utilizadas para facilitar esse processo. Uma destas tentativas foi realizada por Whight *et al.* (1987), que utilizaram anticorpos para detectar FMA, obtendo resultados positivos no registro de ocorrência embora não tenha tido bons resultados na identificação de espécies. Os estudos neste campo avançaram tentando entender a natureza dos antígenos ligantes com estes anticorpos utilizados. Whight *et al.* (1996) utilizaram o anticorpo monoclonal MAb32B11 isolado de *Glomus intraradices*, obtendo resultado de imunofluorescência indireta e revelando a glomalina em amostras de solo, raízes colonizadas, esporos, e em matéria orgânica. Destacou-se nestes trabalhos a natureza proteica da glomalina, a busca por técnicas para sua extração do solo e do micélio dos FMA e a correlação dos resultados com proteínas já antes descritas no solo pelo método de Bradford (WHIGHT & UPADHYAYA, 1996; WHIGHT & ANDERSON, 2000; PURIN & RILLING,

2007). O termo glomalina só pode ser utilizado quando se fala do produto de um gene, quando no solo costuma ser referida como proteína do solo relacionada a glomalina (PSRG), pois tanto a metodologia de ELISA quanto o método de Bradford são sensíveis às diversas formas que estas proteínas podem se encontrar no ambiente.

A principal atividade no solo atribuída à glomalina é a agregação de partículas do solo, podendo ser até utilizada como um indicador de boa qualidade do solo, uma vez que é uma característica sensível a qualquer alteração proveniente do uso do solo (SCHINDLER, F. V., 2007). A ecologia de FMA é um campo limitado à mensuração de abundância e atividade de FMA, que normalmente depende da identificação e quantificação dos esporos de amostras de campo e da avaliação de potencial de inoculação e colonização radicular, tendo limitações em todas as técnicas. Neste contexto, a quantificação da glomalina e proteínas relacionadas é uma metodologia rápida, objetiva e prática de ser conduzida (PURIN & RILLING, 2007; SILVA, C. F. *et al.*, 2014).

## 2.6 Micoheterotrofismo na família das Gentianaceae

A família Gentianaceae possui 1.100 espécies pertencentes a 75 gêneros distribuídas pelo mundo. No Brasil, a Família está representada por 31 gêneros e 121 espécies, sendo 14 pertencentes ao gênero *Voyria* e uma pertencente ao gênero *Voyriella*. As espécies desses dois gêneros são plantas micoheterotróficas especializadas em se relacionar com FMA (GUIMARÃES *et al.*, 2018; BIDARTONDO *et al.*, 2002). O micoheterotrofismo é uma estratégia nutricional utilizada por plantas que perderam sua capacidade fotossintetizante ou não possuem condições de manter sua própria nutrição durante um certo período (MERCKX, *et al.*, 2013b). Algumas plantas, como é o caso das pertencentes a família Orchidaceae, possuem características micoheterotróficas de forma obrigatória pelo menos em uma fase de sua vida; outras espécies dependem de fontes de carbono disponibilizadas pelos fungos durante todo o seu ciclo de vida, como é o caso dos gêneros *Voyriella* e *Voyria* que se relacionam principalmente com FMA do gênero *Glomus* (MERCKX, *et al.*, 2013a; BIDARTONDO *et al.*, 2002). Desta forma, essas plantas podem ser consideradas parasitas de FMA ou epiparasitas, pois parasitam outros vegetais autotróficos que estão, por sua vez, nutrindo os FMA associados (BIDARTONDO *et al.*, 2002).

Fatores que influenciam na atividade dos fungos como, por exemplo, a concentração de fosfato solúvel, também acabam influenciando a dispersão dos vegetais da família Gentianaceae (SHELDRAKE *et al.*, 2017). Sheldrake *et al.* (2017) observaram uma correlação

entre menores concentrações de fosfato e a ocorrência de plantas do gênero *Voyria*. Levando em consideração que os vegetais autotróficos regulam o investimento nos FMA em forma de carbono fotoassimilado de acordo com a concentração de fosfato (KONVALINKOVÁ *et al.*, 2017) e que a planta micoheterotrófica depende de carbono disponibilizado por esses fungos, é fácil entender por que a dispersão destes vegetais está relacionada a este nutriente. É importante salientar que a relação mais comum entre vegetais e FMA não envolve a troca de carbono entre indivíduos vegetais distintos, sendo um fluxo unidirecional de carbono no sentido planta-fungo (PFEFFER, *et al.*, 2004). Entretanto, esses vegetais micoheterotróficos trapaceiam esse mecanismo para obterem carbono dos FMA, demonstrando que alguns vegetais podem ser capazes de inverter esse fluxo.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Devido à importância do bioma Amazônia, sua conservação e estudos que busquem compreender as dinâmicas ecológicas que ocorrem nestes ambientes são fundamentais para direcionar planos de recuperação de áreas degradadas, assim como conservação e manejo florestal. A produção primária por parte dos vegetais que ocorrem na Amazônia depende dos nutrientes e dos microrganismos enriquecedores do solo presentes no material orgânico depositado sobre o solo. E, dentre os microrganismos responsáveis pela promoção do crescimento vegetal, os FMA possuem destaque pela grande variedade de espécies vegetais que se relacionam com esses organismos que estão inseridas neste ecossistema, existindo espécies que compõem a diversidade da Amazônia que dependem de sua ocorrência para conduzirem seu ciclo de vida, como é o caso das plantas da família Gentianaceae dos gêneros *Voyria* e *Voyriella*. Desta forma, entender melhor o papel ecológico da comunidade de FMA que ocorre na camada orgânica da floresta amazônica justifica-se pelo fato de nesta camada ocorrerem a maior parte dos processos responsáveis pela manutenção deste ecossistema.

## REFERÊNCIAS

- BIDARTONDO, Martin I. et al. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 389, 2002.
- CAMPOS, Catarina et al. Symbiosis specificity of the preceding host plant can dominate but not obliterate the association between wheat and its arbuscular mycorrhizal fungal partners. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2920, 2018.
- CARVALHO, Joaquim Francisco de. **O Declínio da era do petróleo e a transição da matriz energética brasileira para um modelo sustentável**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CESÁRIO, F. V. et al. Descrição morfo-funcional de formas de húmus em solos tropicais: Estudo em florestas manejadas da Amazônia. In: **Embrapa Solos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 35., 2015, Natal. O solo e suas múltiplas funções: anais. Natal: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2015.
- DA SILVA JUNIOR, José Pereira; CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira. Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo na Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 819-825, 2006.
- DE OLIVEIRA, Luiz Antonio; DE OLIVEIRA, ARLEM NASCIMENTO. **Associação micorrízica e teores de nutrientes nas folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e guaranazeiro (*Paullinia cupana*) de um sistema agroflorestal em Manaus, Amazonas**. 2004.
- DOS SANTOS, Humberto Gonçalves et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- FITTER, A. H. Darkness visible: reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 231-243, Apr. 2005.
- GARAY, Irene et al. Formas de húmus como indicador funcional de ecossistemas emergentes na floresta de tabuleiro. **Embrapa Solos-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.
- GERDEMANN, J. W.; TRAPPE, J. M. **The endogonaceae in the Pacific Northwest**. Bronx: Mycological Society of America, 1974. 76 p. (Mycologia Memoir, 5).
- GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: physiological and genetic aspects. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. (Ed.). **Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function**. Wageningen: Springer, 2010. p. 3-32.
- GOI, Silvia Regina; DE SOUZA, Francisco A. Diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2006.

- GUIMARÃES, Elsie Franklin; SILVA, Nílber Gonçalves da; MENDES, Thalita dos Santos. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Gentianaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1125-1133, 2018.
- GUPTA, M. Differential response of arbuscular mycorrhizal sporocarps in long-term trap culturing. **Phytomorphology**, v. 67, n. 3&1, p. 1-11, 2017.
- HERRERA, Rafael et al. Amazon ecosystems. Their structure and functioning with particular emphasis on nutrients. **Interciencia**, v. 3, n. 4, p. 223-231, 1978.
- IMHOF, S.; WEBER, H. Chr. Root anatomy and mycotrophy (AM) of the achlorophyllous *Voyria truncata* (Standley) Standley & Steyermark (Gentianaceae). **Botanica Acta**, v. 110, n. 2, p. 127-134, 1997
- KINDEL, A.; GARAY, I. Caracterização de ecossistemas da Mata Atlântica de Tabuleiros por meio das formas de húmus. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 3, 2001.
- KINDEL, Andreia; GARAY, Irene. Humus form in ecosystems of the Atlantic Forest, Brazil. **Geoderma**, v. 108, n. 1-2, p. 101-118, 2002.
- KINDEL, A. et al. Quantificação dos horizontes húmicos e dinâmica da decomposição de material foliar em solos florestais. **Embrapa Solos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.
- KONVALINKOVÁ, T., PÜSCHEL, D., ŘEZÁČOVÁ, V., GRYNDLEROVÁ, H., & JANSKA, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. **Plant and Soil**, 419(1-2), 319-333.
- KROGH, Paul Henning. **European atlas of soil biodiversity**. European Commission, 2010.
- LINDAHL, Björn D.; IHRMARK, Katarina; BOBERG, Johanna; TRUMBORE, Susan E.; STENLID, Jan; FINLAY, Roger. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. **New Phytologist**, v. 173, n. 3, p. 611-620, 2007.
- MERCKX, Vincent S. F. T. et al. Phylogenetic relationships of the mycoheterotrophic genus *Voyria* and the implications for the biogeographic history of Gentianaceae. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 4, p. 712-721, 2013a.
- MERCKX, V. S. F. T. Mycoheterotrophy. **Springer, New York, NY. doi**, v. 10, p. 978-1, 2013b.
- MOREIRA, Adônis; MALAVOLTA, Eurípedes. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1103-1110, 2004.
- MOREIRA, Fatima M. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ufla, 2006.
- MOREIRA, Francisco Wesen; OLIVEIRA, Luiz Antonio; BECKER, Peter. **Ausência de micorrizas vesículo-arbusculares efetivas em lecytidaceas numa área de floresta primária da Amazônia Central**. 1997.

- OLIVEIRA, Arlem N.; DE OLIVEIRA, Luiz Antonio. Características químicas do solo, esporulação e colonização micorrízica em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunheira na Amazônia Central. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, n. 40, p. 33-44, 2016.
- OLIVEIRA, Arlem N.; DE OLIVEIRA, Luiz Antonio. **Colonização por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes em cinco cultivares de bananeiras em um latossolo da Amazônia**. 2005.
- OLIVEIRA, Arlem N.; OLIVEIRA, Luiz Antonio. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia. In: SIQUEIRA, José O. *et al.* **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. P. 583-613.
- OLIVEIRA, Arlem N.; DE OLIVEIRA, Luiz Antonio. Sazonalidade, colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunheira na Amazônia Central. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, n. 40, p. 145-154, 2016.
- PFEFFER, Philip E. et al. The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 617-627, 2004.
- PURIN, S.; RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress and a new hypothesis for its function. **Pedobiologia** 51: 123-130. 2007.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 73-80, Mar. 2000.
- REDECKER, Dirk et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, n. 7, p. 515-531, 2013.
- SANCHEZ, Pedro A. et al. Amazon Basin soils: management for continuous crop production. **Science**, v. 216, n. 4548, p. 821-827, 1982.
- SCHINDLER, Frank V.; MERCER, Erin J.; RICE, James A. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 320-329, 2007.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Glomeromycota rRNA genes: the diversity of myths? **Mycorrhiza**, Berlin, v. 13, n. 4, p. 233-236, May 2003.
- SHELDRAKE, Merlin et al. A phosphorus threshold for mycoheterotrophic plants in tropical forests. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162093, 2017.
- SILVA, Cristiane Figueira da et al. Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares: diversidade, composição e glomalina em área revegetada com sesbânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 423-431, 2014.

SIQUEIRA, José Oswaldo; SOUZA, Francisco A.; CARDOSO, Elke J. B. N.; TSAI, Siu Mui. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Editora UFLA, Brasil, 2010.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic, 2008. 800 p.

SOUZA, Francisco Adriano; SILVA, Isabel Cristina Lima; BERBARA, Ricardo Luís Louro. Fungos micorrízicos Arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, Fatima M. S.; SIQUEIRA, José O.; BRUSSAARD, Lijbert. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, 2008. cap. 15, p. 483-536. v. 1.

STÜRMER, S. L. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 247-258, May 2012.

STÜRMER, Sidney Luiz; SIQUEIRA, José Oswaldo. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255-267, 2011.

TADINI, Amanda M. et al. Characterization of organic matter in spodosol amazonian by fluorescence spectroscopy. **Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

WRIGHT, S. F.; ANDERSON, R. L. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. **Biology and Fertility of Soils**, 31 (3-4): 249-253. 2000.

WRIGHT, S. F.; J. B. MORTON, AND J. E. SWOROBUK. Identification of a vesiculararbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, 53:2 222-2225. 1987.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**. 161(8): 575–586, 1996.

ZANELLA, A. et al. **A European Reference Base for Humus Forms: Proposal for a morpho-functional classification**. 2010.

## SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

### ARTIGO 1

## FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E SUA DISTRIBUIÇÃO NAS CAMADAS ORGÂNICAS DO SOLO DA AMAZÔNIA

### RESUMO

Embora possua uma grande diversidade vegetal, a floresta amazônica se localiza em uma região onde predominam solos de baixa fertilidade. Pode-se afirmar que a manutenção desse ecossistema seria impossível sem microrganismos transformadores e enriquecedores presentes nas chamadas formas de húmus, que incluem matéria orgânica vegetal em diferentes estádios de decomposição. Dentre esses microrganismos estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que formam a associação mutualística mais comum dentre os seres vivos. Sua diversidade e abundância são diretamente relacionadas com a diversidade e produtividade de sistemas florestais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade e distribuição de FMA em camadas orgânicas de um fragmento de floresta no município de Baião (PA), Amazônia Oriental. Adicionalmente, avaliou-se a diversidade desses fungos em área onde a cobertura orgânica foi perdida com a conversão da floresta a pastagem. O horizonte orgânico foi dividido em camadas de acordo com a sua composição. O material foi coletado e utilizado para montagem de vasos de cultivo armadilha e quantificação de proteínas do solo relacionadas à glomalina (PSRG). A identificação dos FMA foi realizada com base em caracteres morfológicos e moleculares. Foram observadas 26 espécies na área de floresta e 18 na área de pastagem; entretanto, não foi encontrada diferença significativa na riqueza e na distribuição das espécies entre as camadas e áreas avaliadas. A quantificação de PSRG mostrou que a maior concentração dessas proteínas está nas camadas orgânicas FH, H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, que são dominadas por raízes finas das plantas da floresta. Os resultados mostram que as camadas orgânicas na área avaliada são colonizadas por esses fungos e tem uma grande importância para o sequestro de carbono realizado por estes organismos.

Palavras chaves: Formas de Húmus, Micorrizas, Nutrição vegetal, Ciclagem de nutrientes.

## ABSTRACT

Despite its great plant diversity, low fertility soils predominate in the Amazon Forest. The maintenance of this ecosystem would be impossible without the presence of transforming and enriching microorganisms in the so-called humus forms, which include decaying plant material at different decomposition stages. Among these microorganisms are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which form the most common mutualistic association in nature. Its diversity and abundance are directly related to the diversity and productivity of forest systems. Thus, the objective of this work was to evaluate the diversity and distribution of AMF in organic layers of a forest fragment in the municipality of Baião (PA), eastern Amazon. Additionally, the diversity of these fungi was evaluated in an area where the organic cover has been lost after the conversion of the forest into pasture. The organic horizon was divided into layers according to its composition. The material was collected and used to capture AMF with *Uruchloa decumbens*. Soil proteins related to glomalin were also quantified. AMF identification was carried out based on morphological and molecular characters. Twenty-six and eighteen species were observed in the forest and pasture, respectively. Nevertheless, no significant differences were found in species richness and distribution between the layers and areas evaluated. Glomalin quantification showed that the highest concentration of these proteins is in the organic layers FH, H<sub>1</sub>, and H<sub>2</sub>, which are dominated by thin roots of forest plants. The results show that the organic layers in the evaluated area are colonized by these fungi and are of great importance for the carbon sequestration carried out by these organisms.

Key words: Humus forms, mycorrhizae, plant nutrition, nutrient cycling.

## 1 INTRODUÇÃO

O bioma amazônico é reconhecido mundialmente por ser um dos ecossistemas mais diversos e de maior importância ecológica. Embora seja formado em sua maior parte por uma floresta tropical densa e de alta diversidade vegetal, ele ocorre predominantemente sobre solos ácidos, saturados em alumínio (Al) e de baixa fertilidade (SANCHEZ *et al.*, 1982; MOREIRA E MALAVOLTA, 2004). Desta forma, atribui-se o papel de sustentar a nutrição desse ambiente a uma complexa rede de relação entre plantas e microrganismos transformadores e enriquecedores do solo que atuam principalmente utilizando nutrientes depositados na liteira e material orgânico em decomposição (OLIVEIRA E OLIVEIRA, 2010; JANZEN, 1980). A camada orgânica do solo é reconhecida como o ambiente onde ocorrem processos físicos e químicos importantes para a formação do solo, e nela também ocorrem inúmeros processos biológicos que contribuem com a ciclagem de nutrientes dentro deste contexto (GARAY *et al.*, 2016; KROGH, 2010; KINDLEL & GARAY, 2002).

Alguns autores relataram a formação, na Amazônia, de uma densa camada de raízes que se misturam à matéria orgânica em diferentes estádios de decomposição (HERRERA *et al.*, 1978). Essa formação se assemelharia às formas de húmus do tipo Mor, observadas em florestas de regiões temperadas, as quais se caracterizam por um acúmulo abundante de matéria orgânica devido à lenta decomposição desse material (HERERRA *et al.*, 1978). A distribuição das raízes em meio à liteira bem como a associação dessas raízes à fungos simbióticos, são alguns dos mecanismos propostos como forma de se aumentar a eficiência das plantas na utilização dos nutrientes. Uma floresta com tais características foi encontrada na Amazônia Paraense, sobre solos arenosos classificados como espodosolos (DOS SANTOS, *et al.*, 2018). A transição entre a matéria orgânica acumulada e o solo mineral ocorre de forma abrupta, indicando uma decomposição lenta, havendo pouca mistura entre as porções orgânicas e minerais do solo (TADINI, A. M. *et al.*, 2017). Algumas árvores localizadas nessa floresta são de grande porte, o que é incomum nesses tipos de solo. Na Amazônia, os espodosolos são encontrados em campinas e campinaranas, e quando sob floresta, esta tem árvores com caule de pequeno diâmetro, o que não é o caso da área em questão (DO VALLE, C. M. *et al.*, 2005). Em alguns pontos, as camadas orgânicas alcançam mais de 20 cm de profundidade, com uma grande quantidade de raízes finas inseridas na matéria orgânica, formando uma cobertura fofa sobre o solo. Este fato levou à formulação da hipótese de que FMA estão presentes nessa camada uma vez que está densamente ocupada pelas raízes das plantas do fragmento florestal. Além disso, plantas micoheterotróficas do gênero *Voyriella*, que se associam a FMA (IMHOF & WEBER,

1997) foram observadas na serapilheira, o que indica que esses fungos também estão se associando a outras plantas da floresta na camada orgânica do solo.

Neste contexto o presente estudo teve como objetivo avaliar a distribuição da comunidade de FMAs presente nesse fragmento florestal, realizando um levantamento da riqueza de espécies distribuídas em um gradiente vertical. A fim de compreender o papel da camada orgânica sobre o ecossistema dessa região, a riqueza de espécies de FMAs também foi avaliada em uma área de pastagem próxima ao fragmento florestal, uma vez que no processo de conversão da floresta em pastagem, as camadas mais superficiais do solo são removidas.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material e área de amostragem**

As amostras foram coletadas em um sítio localizado no distrito de São Joaquim de Itaquara, município de Baião (PA). Trata-se de uma propriedade que possui uma área de floresta nativa além de uma área de pastagem adjacente, o que a torna um local ideal para a observação da influência antrópica na diversidade microbiana do solo por se tratar de uma área de fronteira agrícola.

A coleta das amostras foi realizada seguindo o protocolo descrito por Muys e Wandeler, (2013) para descrição e coleta de formas húmicas no campo. Para isso, foram delimitados dois transectos, um na floresta e outro no pasto, cada um contendo 250 metros e cinco pontos de amostragem com 50 metros de distância entre si, sendo o georreferenciamento dos pontos realizado no momento da coleta. Em cada ponto de coleta foram dispostos 3 gabaritos (25 x 25 cm), sendo cada um equidistante 40 cm um do outro. As camadas de material orgânico e de solo foram coletadas dentro dessa área de forma manual e distribuídas em sacos plásticos de polietileno devidamente identificados. Na floresta, as camadas foram separadas, de acordo com seu nível de decomposição em:

- Camada L: Constituída por folhas inteiras recém depositadas sobre a serapilheira;
- Camada F: Constituída por folhas com início de decomposição, já com sinais de fragmentação por ação da microbiota e da fauna edáfica;
- Camada FH: Camada de folhas decompostas contando fragmentos de aproximadamente 1,5 cm onde raízes finas podem ser encontradas crescendo junto às folhas depositadas nessa camada. Início da colonização por raízes;

- Camada H<sub>1</sub>: Camada com amplo crescimento de raízes que formam um emaranhado que pode ter entre 10 a 15 cm de profundidade. Entre as raízes, encontra-se matéria orgânica na forma de partículas finas de cor escura.
- Camada H<sub>2</sub>: Camada de raízes mais espaçadas entre si, menos abundantes e com diâmetro maior do que aquelas encontradas na camada H<sub>1</sub>. Também com matéria orgânica na forma de partículas finas de cor escura entre as raízes.
- Camada H<sub>3</sub>: Camada de transição onde a matéria orgânica decomposta começa a se misturar com partículas arenosas do solo subjacente.
- Solo mineral da floresta (SM): Primeiros 10 cm do horizonte mineral superficial.

No pasto, as camadas foram divididas em:

- Camada L<sub>p</sub>: Constituída por folhas inteiras recém depositadas;
- Camada F<sub>p</sub>: Constituída por folhas com início de decomposição já com sinais de fragmentação por ação da microbiota e da fauna edáfica;
- Solo mineral pastagem (SP): Primeiros 10 cm do horizonte mineral superficial.

Destas, todas as camadas contendo raízes ou solo foram secas ao ar e utilizadas na montagem de culturas armadilha para recuperação e esporulação de FMA. Desta forma as camadas L e F não foram avaliadas.

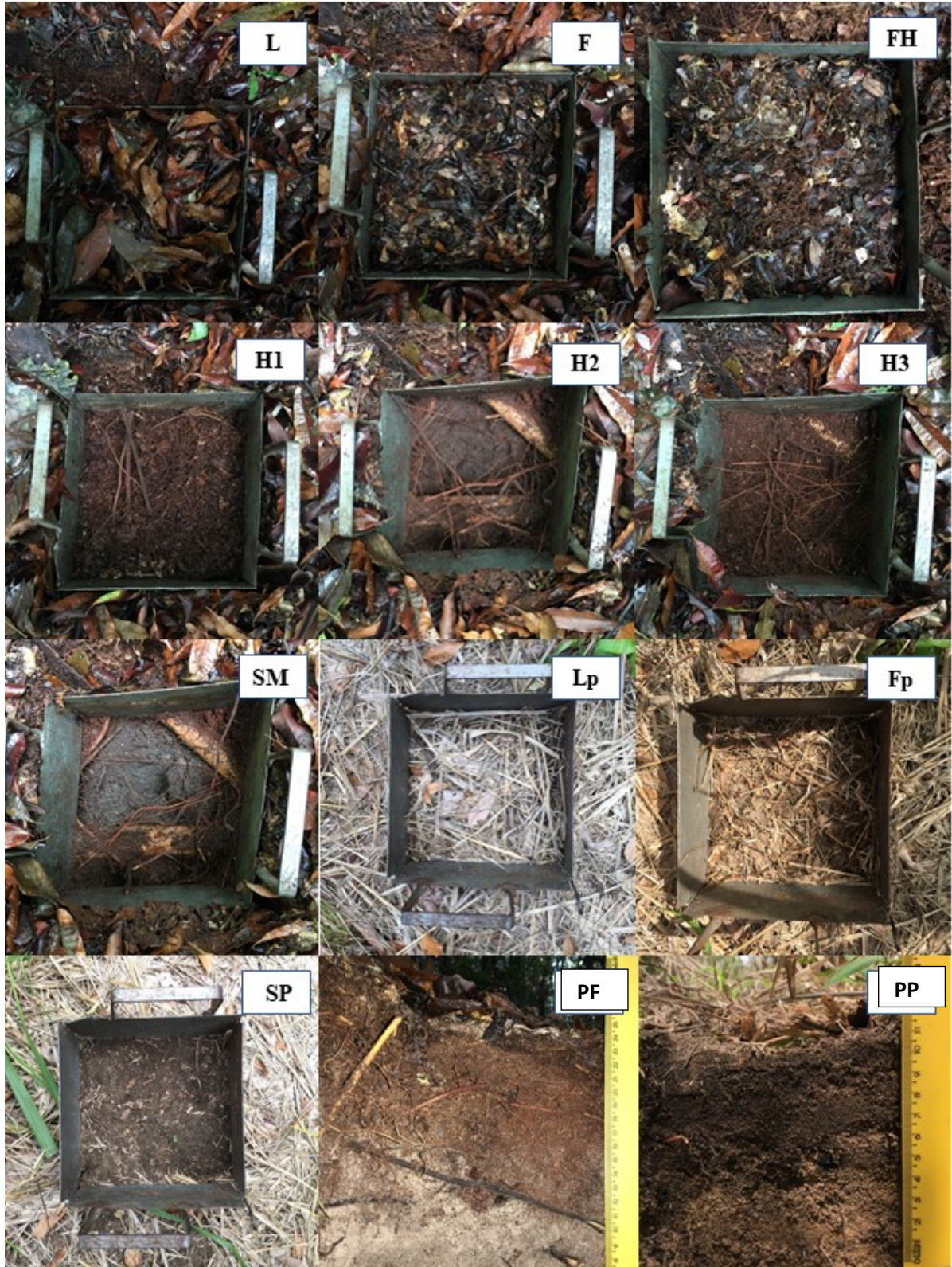


Figura 1 – Camadas orgânicas coletadas na floresta (L, F, FH, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e solo mineral) e na pastagem (Lp, Fp e solo mineral). Os painéis PF e PP mostram o perfil vertical no solo da floresta e da pastagem, respectivamente. Fonte: Do Autor (2020).

## 2.2 Cultivo armadilha de FMA

As culturas armadilha foram estabelecidas em vasos de 500 mL, onde as amostras das camadas coletadas foram dispostas entre duas camadas de substrato esterilizado (Novais et al., 2017). Resumidamente, foi utilizado um substrato consistindo de uma mistura de solo superficial de mata, solo argiloso (Cambissolo Vermelho Amarelo) e solo arenoso (Planossolo) (1:1:1 v/v) autoclavado por dois dias consecutivos por 60 minutos a 120°C, 1,2 kgf/cm<sup>2</sup>, e mantidos por 15 dias em repouso para oxidação de possível manganês solúvel. Utilizou-se como planta hospedeira isca *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (syn. *Brachiaria decumbens*) a partir de sementes previamente desinfestadas (LEAL, et al., 2009). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, durante dois ciclos de seis meses.

## 2.3 Extração de esporos e identificação morfológica de FMA

Após cada ciclo de multiplicação, amostras de 50 mL foram tomadas e os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugações em água e solução de sacarose. Após verificação microscópica da presença de esporos de FMA, os esporos foram fixados em lâminas para microscopia com PVLG (polivinil lacto glicerol) e/ou PVLG + reagente de Melzer (1:1). A identificação das espécies foi realizada por meio de análise morfológica dos esporos utilizando das descrições originais das espécies publicadas na literatura especializada e sites especializados como, INVAM, (international culture collection of arbuscular mycorrhizal fungi), BLASZKOWSKI e TWAMF (the world of arbuscular mycorrhizal fungi). Os resultados obtidos da identificação dos FMA foram utilizados para construir um dendograma utilizando o programa R com índice Jaccard (R Core Team, 2019) a fim de observar o padrão de dispersão das espécies encontradas entre as camadas e os pontos avaliados.

## 2.4 Identificação molecular de FMA

A fim de apoiar a prévia identificação morfológica dos morfotipos obtidos nas culturas armadilha, o DNA foi extraído de esporos únicos ou amostras de esporos múltiplos (de 5 a 10 esporos) e o gene 18S RNAr foi sequenciado. Os esporos foram separados de acordo com seu morfotipo (cor, forma, tamanho, presença de hifa de sustentação ou célula esporogênica, cicatriz e escudo germinativo) selecionados sob microscópio estereoscópico e limpos por meio de quatro sessões de ultrassom de 15 s, intercaladas por lavagens em água destilada estéril.

Esporos limpos, intactos e saudáveis pertencentes a um mesmo morfotipo, foram esmagados dentro de um tupo de centrífuga de 1000  $\mu\text{L}$  com um micropistilo estéril, adicionando-se imediatamente 10  $\mu\text{L}$  de PrepMan Ultra<sup>®</sup> Sample Preparation Reagent. Após a maceração dos esporos, os tubos foram incubados a 95°C por 10 minutos sem agitação e, em seguida, mantidos a temperatura ambiente por 2 minutos. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 15000 rpm por 5 minutos e 5-8  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram cuidadosamente pipetados e transferidos para um novo tubo. Esses sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1:10 v:v de tampão TE e, posteriormente, armazenados a -20°C.

O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro “*Nano-Drop*” e em seguida as sequências parciais do gene 18S rDNA foram amplificadas em 25  $\mu\text{L}$  de um mix de reação de PCR contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. Para reação de PCR, utilizou-se a enzima JumpStart<sup>™</sup> Taq DNA Polymerase, seguindo as recomendações do fabricante. Para amplificação parcial do 18S rDNA, utilizou-se o protocolo de amplificações Nested-PCR, onde, na primeira reação o DNA extraído foi amplificado utilizando os pares de iniciadores descritos por Lee *et al.* (2008) AML1 (5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3') e AML2 (5'-GAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3') produzindo um fragmento com aproximadamente 800 pares de base (pb). A reação foi conduzida no termociclador com as seguintes condições: 94°C por 3min seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 1min, 72°C por 1min com extensão final de 72°C por 10 minutos.

Em seguida, uma nova reação, denominada de Nested-PCR foi realizada, usando 2 $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR da primeira reação (AML1-AML2) como DNA molde. Para a segunda reação utilizou-se o par de iniciadores NS31 e AM1 em um volume final de 25 $\mu\text{L}$ . A PCR foi conduzida com as seguintes condições: 95 °C por 5 min; 35 ciclos a 95 °C por 30seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio (0,5 mg / mL). Os produtos de PCR foram purificados e o sequenciamento de Sanger foi conduzido no aparelho Hitachi Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. As sequencias obtidas foram confrontadas com as disponibilizadas nos bancos de dados GenBank e MAARJAM utilizando a ferramenta BLASTn para caracterização molecular dos esporos dos morfotipos encontrados.

## 2.5 Proteína do solo relacionada a glomalina

A glomalina foi quantificada através de uma metodologia sensível a proteína do solo relacionada a glomalina (PSRG). Foi extraído e quantificada a glomalina total (PSRG – GT)

das camadas orgânicas e das amostras de solo coletadas. Para a extração foi realizada no autoclave utilizando 1 g de solo e 8 ml de citrato de sódio 50mM com pH 8,0 a 121°C por 60 min. São necessários diversos ciclos de autoclavagem seguidos por centrifugação a 15.000 Rpm por 20 minutos para extrair a GT (SILVA *et al.* 2014; RILLIG, 2004; WRIGHT & UPDAHYAYA, 1998). No caso das amostras avaliadas foram necessários de 3 a 18 ciclos até que a amostra atingisse uma cor amarelo-clara que indica que se atingiu o máximo resultado da extração. O sobrenadante proveniente de cada ciclo foi recolhido e armazenado a -20°C até que todas as amostras tivessem atingido a coloração desejada. Posteriormente o material proveniente dos diversos ciclos para cada amostra foram misturados e homogeneizados, seu volume foi avaliado e uma amostra da solução de cada ponto avaliado foi utilizada para a quantificação. A quantificação da PSRG foi realizada pelo método de Bredford (1976) modificada por Wright et al. (1996), usando soro-albumina bovina (BSA) como padrão para construção da curva. As concentrações de glomalina foram corrigidas para mg/g de solo considerando o volume de sobrenadante obtido nos ciclos, a massa seca e o volume de amostra utilizado no preparo da placa que foi avaliada em espectrofotômetro.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 FMA observados nas camadas orgânicas e no solo da Amazônia

Foi possível recuperar, através do método de cultivo armadilha, fungos micorrízicos arbusculares mesmos nas camadas húmicas mais superficiais do solo, logo abaixo da liteira, demonstrando sua presença em forma de propágulos viáveis presentes na área amostrada. Foram obtidas 26 espécies distintas pertencentes aos principais gêneros de FMAs sendo que destas 24 ocorreram em área da floresta e 18 na pastagem (Tabela 1). Importante destacar a ocorrência das espécies *A. excavata*, *A. Foveata*, *Acaulospora* sp.1, *Ambispora leptoticha*, *G. aggregatum* e *G. multicaule* que ocorreram em todas as camadas avaliadas, sendo que *Glomus multicaule* ocorreu em quase todos os vasos. Algumas espécies não puderam ser identificadas nem por sua morfologia nem por métodos moleculares, sendo possível que algumas destas sejam espécies ainda a serem descritas (Figura 2).

Tabela 1 – Registro da ocorrência de FMAs nas camadas avaliadas. R (espécie rara com ocorrência <20%); C (espécie comum com ocorrência entre 20 e 40%); MC (espécie mais comum ocorrendo entre 40 e 60%); D (espécie dominante ocorrendo entre 60 a 100%). Camadas FH, H1, H2, H3, SM (solo mata), SP (solo pastagem)

Espécies	FH	H1	H2	H3	SM	SP
<i>Acaulospora brasiliensis</i>	R	-	-	-	-	-
<i>Acaulospora excavata</i>	C	D	C	R	C	R
<i>Acaulospora foveata</i>	C	C	D	R	C	R
<i>Acaulospora laevis</i>	-	R	D	C	MC	D
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	-	R	R	-	-	R
<i>Acaulospora</i> sp.1	MC	C	D	C	D	C
<i>Acaulospora spinosa</i>	-	-	-	-	-	R
<i>Acaulospora tuberculata</i>	C	-	-	-	R	C
<i>Ambispora leptoticha</i>	D	C	D	R	D	MC
<i>Ambispora</i> sp.1	-	-	R	R	-	C
<i>Ambispora</i> sp.2	-	-	-	-	R	-
<i>Archeospora</i> sp.	-	-	R	R	R	R
<i>Diversispora</i> sp.1	-	-	R	-	-	-
<i>Gigaspora</i> sp.	-	R	-	-	C	MC
<i>Glomus aggregatum</i>	MC	R	C	R	C	C
<i>Glomus microagregatum</i>	-	-	C	R	MC	D
<i>Glomus multicaule</i>	D	MC	D	D	D	D
<i>Glomus</i> sp.1	-	-	-	-	R	-
<i>Glomus</i> sp.2	R	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp.3	-	-	-	-	-	R
<i>Glomus</i> sp.4	-	R	R	-	R	R
<i>Racocetra persica</i>	C	R	C	-	R	R
<i>Rhizophagus fasciculatum</i>	D	C	MC	-	D	R
<i>Scutelospora</i> sp.	-	-	-	R	MC	-
Sp. não identificada (parede grossa laminar)	R	-	-	-	-	-
Sp. não identificada	R	-	-	-	-	-
<b>Riqueza total de espécies</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>18</b>

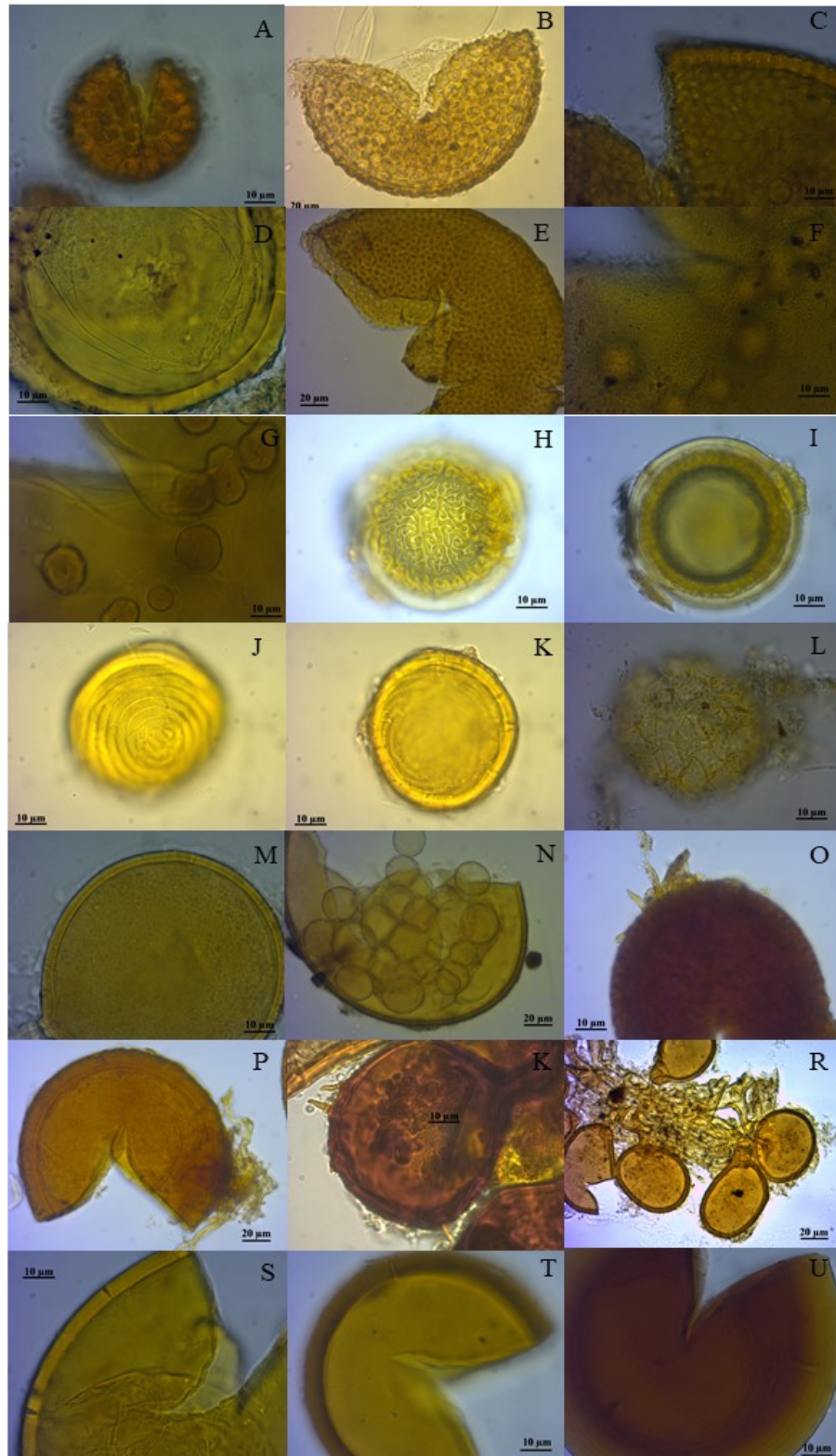


Figura 2 – Prancha esporos observados em microscópio. *Acaulospora brasiliensis* (A); *Acaulospora excavata* (B); *Acaulospora foveata* (C); *Acaulospora laevis* (D); *Acaulospora scrobiculata* (E); *Acaulospora* sp.1 (F e G); *Ambispora* sp.2 (H e I); *Archeospora* sp. (J e K); *Diversispora* sp. (L); *Glomus aggregatum* (M); *Glomus microagregatum* em *A. laevis* (N); *Glomus multicaule* (O e P); *Glomus* sp.1 (K); *Glomus* sp.4 (R); *Racocetra persica* (S); *Rhizophagus fasciculatum* (T); espécie não identificada com parede grossa laminar (U). Fonte: Do Autor (2020).

Os resultados obtidos através do sequenciamento do fragmento da região SSU do rDNA dos morfotipos observados serviram para corroborar com o observado na avaliação morfológica (Tabela 2). Entretanto, o sucesso na amplificação do fragmento NS31-AM1 e em obter sequências confiáveis não ocorreu para todos os morfotipos encontrados na análise morfológica. A tabela 2 indica os resultados mais relevantes do BLASTn que foi realizado entre as sequências obtidas quando comparadas ao banco de dados do MAARJAM.

Ao analisar o padrão de dispersão das espécies nos pontos avaliados, observou-se que não há um efeito das camadas na dispersão das espécies encontradas. O dendograma apresentado na Figura 3 apresenta a dissimilaridade entre as diferentes amostras e foi construído com base na presença ou ausência de cada espécie nas amostras avaliadas e utilizando o programa R (R Core Team, 2019).

Tabela 2 – Resultados mais relevantes obtidos no BLASTn para as sequências geradas

Morfologia	Resultado BLASTn	n° acesso	Cobertura Identidade		Tamanho (pares de base)
				(%)	
<i>Acaulospora laevis</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	LT216810	100.0	95.6	229
<i>Acaulospora</i> sp.1	<i>Acaulospora</i> sp.	KC588984	52.0	98.2	545
<i>Acaulospora spinosa</i>	<i>Acaulospora spinosa</i>	JX461239	50.8	98.3	531
<i>Acaulospora tuberculata</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	LT216810	92.3	96.1	203
<i>Ambispora leptoticha</i>	<i>Ambispora leptoticha</i>	AB047302	100.0	98.8	515
<i>Ambispora</i> sp.1	<i>Ambispora</i> sp.	LT158717	100.0	99.3	402
<i>Archeospora</i> sp.	<i>Archeospora</i> sp.	HG975690	100.0	92.1	355
<i>Gigaspora</i> sp.	<i>Gigaspora</i> sp.	LN622303	99.8	99.8	519
<i>Glomus aggregatum</i>	<i>Glomus</i> sp.	LT935650	46.1	100.0	482
<i>Glomus</i> sp.2	<i>Glomus</i> sp.	LT158705	99.3	99.5	553
<i>Scutelospora</i> sp.	<i>Scutelospora</i> sp.	LN890625	51.4	99.8	539

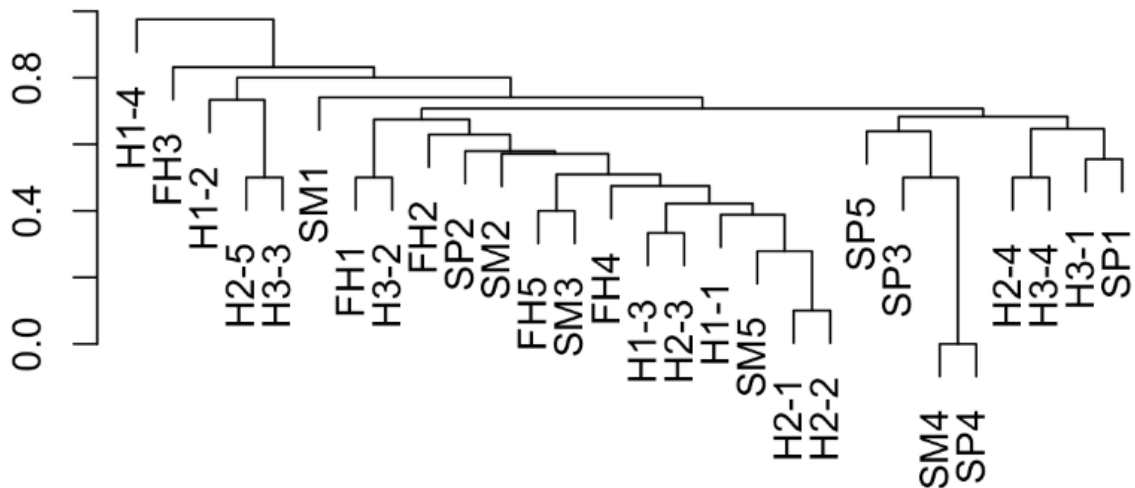


Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade construído tendo como base a distribuição das espécies nos pontos avaliados. A distância de Jaccard e o algoritmo “average linkage” foram utilizados para a construção do dendrograma. FH, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e SM se referem às camadas FH, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e do solo da floresta. SP se refere ao solo da pastagem. Os números de 1 a 5 indicam o ponto de coleta das amostras. Fonte: Do Autor (2020).

### 3.2 Proteína no solo relacionada a Glomalina (PSRG)

As PSRG totais extraídas a partir do material coletado indicaram uma concentração de GT por grama de solo maior nas camadas orgânicas do que na fração mineral dos solos, tanto da floresta quanto da pastagem. As amostras que possuíam material orgânico precisaram de 18 ciclos para esgotarem o rendimento da reação e foi possível observar que a camada H<sub>2</sub> foi a que possuiu maior concentração média de GT. Não houve diferença estatísticas entre as camadas FH, H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>. Contudo, a diferença da concentração de GT nas camadas orgânicas em relação ao solo foi significativa (Figura 4), sendo que a maior concentração encontrada no solo mineral ocorreu na floresta e foi de 7,15 mg g<sup>-1</sup>; as concentrações obtidas nas camadas FH, H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> foram ao menos dez vezes maiores.

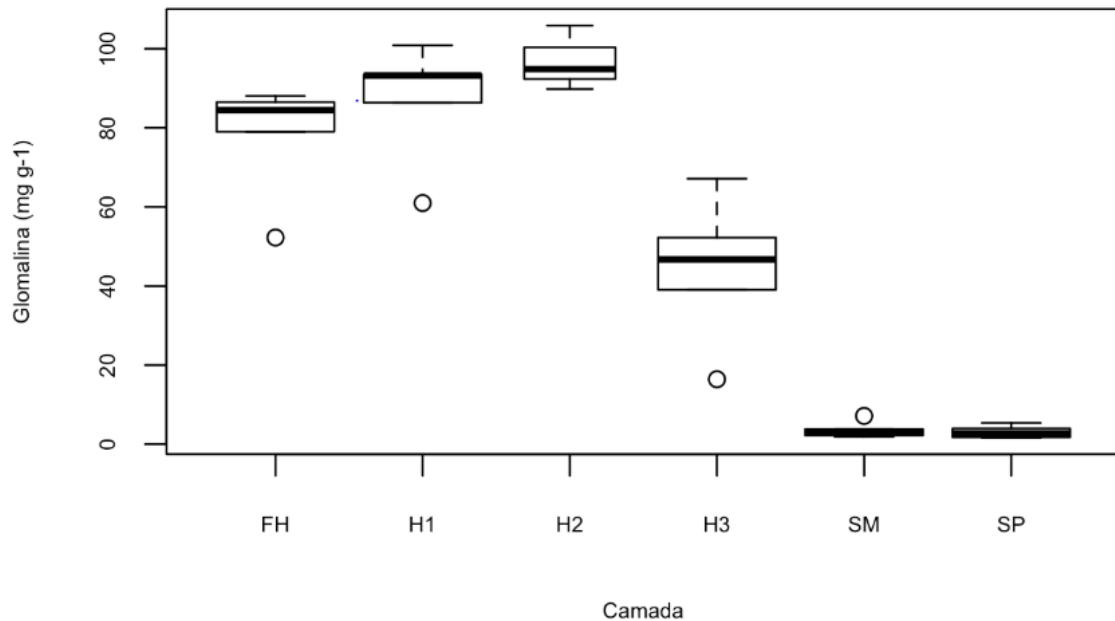


Figura 4 – Concentração de proteínas no solo relacionadas à glomalina totais (PSRG-GT) nas diferentes camadas orgânicas e no solo analisados. FH, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e SM se referem às diferentes camadas orgânicas e ao solo (SM) da floresta e SP se refere ao solo da pastagem. Fonte: Do Autor (2020).

#### 4 DISCUSSÃO

Com base nos resultados aqui obtidos, a atividade de FMA se refletiu em um acúmulo de glomalina (PSRG) significativamente maior nas camadas orgânicas com maior abundância de raízes. Embora sua concentração não seja suficiente para inferir a abundância de uma única espécie de FMA, neste caso a glomalina pode ser usada para confirmar que nas camadas orgânicas há uma maior abundância de FMA de uma forma geral (PURIN & RILLING, 2007). Essa proteína se acumula no solo através da decomposição das hifas e tem uma grande importância na estabilização de agregados, atuando como um ligante orgânico (SILVA, C. F. *et al*, 2014; SCHINDLER, F. V., 2007). Os fatores que interferem em sua produção nos diversos ambientes ainda não foram elucidados. Entretanto o clima, a biota do solo, a disponibilidade de nutrientes, a planta hospedeira e a produtividade geral do sistema, assim como a diversidade de FMA, são fatores que podem influenciá-la (SILVA, C. F. *et al*, 2014). Existe, também, uma correlação positiva entre o conteúdo de carbono orgânico e a PSRG, havendo relatos de que essa proteína pode contribuir com até 52% do carbono orgânico encontrado no solo (SCHINDLER, F. V., 2007). Desta forma, levando-se em consideração o fato de possuir camadas densamente ocupadas por raízes, os resultados encontrados são compatíveis pois são

camadas onde o crescimento de micélio extrarradicular ocorre de forma mais acelerada (GIOVANNETTI, M., 2008).

A diferença em abundância nas camadas com mais raízes não se refletiu na distribuição e riqueza de espécies, que foram similares para todas as camadas, incluindo a porção mineral do solo. Do mesmo modo, a floresta e a pastagem compartilharam as mesmas espécies, indicando que a conversão da floresta para pastagem afetou a abundância, mas não a riqueza de FMAs. Embora, o número de espécies de FMA tenha sido levemente menor no solo da pastagem, deve-se ser cauteloso ao afirmar uma que houve uma redução na riqueza visto que esta variável é sensível ao esforço amostral, que foi maior na floresta (RICKLEFS e RELYEA, 2016). A rede micelial destes organismos pode se estender muito além da rizosfera, podendo chegar a um comprimento de hifa total de 54 metros por grama de solo e até 40 cm de hifas por centímetro de raiz colonizada em um intervalo de apenas 7 dias, havendo uma correlação positiva entre a quantidade de raiz colonizada e o comprimento do micélio disperso no solo (GIOVANNETTI, M., 2008). Por isso sua atividade não se restringe às camadas ocupadas pelas raízes mais finas. Como as camadas se encontravam bem próximas no solo, é possível que as espécies de FMA que estivessem colonizando as raízes em uma camada, tenham alcançado as outras através do micélio extrarradicular, depositando nelas fontes de propágulos viáveis que foram multiplicados nos vasos armadilha.

A identificação das espécies recuperadas dos vasos armadilha é compatível com aquela observada em outros trabalhos realizados no bioma Amazônia, em sistemas de uso de terra similares (LEAL et al., 2009; LEAL et al., 2013). Os gêneros de FMA mais representados foram *Glomus* e *Acaulospora*, que totalizaram 57% das espécies encontradas neste trabalho. *Acaulospora foveata* foi uma espécie comum a todos os sistemas de uso de terra avaliados por Stürmer *et al.* (2011) e foi encontrada em todas as camadas aqui avaliadas.

Os trabalhos realizados na Amazônia por meio da extração de esporos diretamente da amostra de campo encontraram uma riqueza de espécies maior do que aquela aqui descrita (STÜRMER *et al.*, 2011). Porém, outro trabalho que observou a abundância de esporos em área de floresta primária obteve uma baixa contagem de esporos em relação a área de pastagem, registrando maior dificuldade para multiplicação em vasos armadilha de amostra proveniente da floresta (LEAL, P. L., SIQUEIRA, J. O., STÜRMER, S. L., 2009). Ambos os trabalhos demonstraram uma grande discrepância entre as técnicas utilizadas. O exame direto das amostras de campo permitiu se detectar uma riqueza maior de espécies, indicando que a metodologia de cultivo armadilha pode não representar a diversidade alfa da área estudada

(LEAL et al., 2009). Essa tecnologia foi utilizada aqui em função da natureza do material coletado e da dificuldade logística de se amostrar um volume maior de amostras, de modo que o método de cultura armadilha foi o mais adequado.

Desta forma, conclui-se que não existe uma distribuição de espécies diferente de FMA entre as camadas e sistemas de uso avaliados. Entretanto os resultados para PSRG demonstraram uma diferença significativa na liberação destas proteínas nas camadas orgânicas, indicando que as camadas orgânicas do solo da floresta são importantes neste contexto, servindo como um sítio atuante no sequestro de carbono atmosférico e na ciclagem de nutrientes na floresta amazônica.

## REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May. 1976.
- DO VALLE, Cláudia M. et al. Speciation and quantification of mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). **Chemosphere**, v. 58, n. 6, p. 779-792, 2005.
- DOS SANTOS, Humberto Gonçalves et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- GARAY, Irene et al. Formas de húmus como indicador funcional de ecossistemas emergentes na floresta de tabuleiro. **Embrapa Solos-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. Hs. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, Manuela. Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular mycorrhizal networks. In: **Mycorrhiza**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 59-72.
- HERRERA, Rafael et al. Amazon ecosystems. Their structure and functioning with particular emphasis on nutrients. **Interciencia**, v. 3, n. 4, p. 223-231, 1978.
- IMHOF, S.; WEBER, H. Chr. Root anatomy and mycotrophy (AM) of the achlorophyllous *Voyria truncata* (Standley) Standley & Steyermark (Gentianaceae). **Botanica Acta**, v. 110, n. 2, p. 127-134, 1997
- JANZEN, D. H. (1980) Ecologia vegetal nos trópicos. São Paulo, EPU: Ed. Da USP. **Temas de biologia**, v. 7. 79 p.
- KINDEL, Andreia; GARAY, Irene. Humus form in ecosystems of the Atlantic Forest, Brazil. **Geoderma**, v. 108, n. 1-2, p. 101-118, 2002
- KROGH, Paul Henning. **European atlas of soil biodiversity**. European Commission, 2010
- LEAL, Patricia Lopes; SIQUEIRA, José Oswaldo; STÜRMER, Sidney Luiz. Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community. **Applied Soil Ecology**, v. 71, p. 72-80, 2013.
- LEAL, Patricia Lopes; STÜRMER, Sidney Luiz; SIQUEIRA, José Oswaldo. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 111-121, 2009.

MOREIRA, Adônis; MALAVOLTA, Eurípedes. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1103-1110, 2004.

OLIVEIRA, Arlem N.; OLIVEIRA, Luiz Antonio. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia. In: SIQUEIRA, José O. *et al.* **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 583-613.

PURIN, S.; RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress and a new hypothesis for its function. **Pedobiologia**, v. 51, p. 123-130, 2007.

R Core Team (2019). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RICKLEFS, R.; RELYEA, R.. **A economia da natureza**. 7. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 2018 v, xxiii, 606 p.

RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 84, p. 355-363, 2004.

SANCHEZ, Pedro A. et al. Amazon Basin soils: management for continuous crop production. **Science**, v. 216, n. 4548, p. 821-827, 1982.

SCHINDLER, Frank V.; MERCER, Erin J.; RICE, James A. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 320-329, 2007.

SILVA, Cristiane Figueira da et al. Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares: diversidade, composição e glomalina em área revegetada com sesbânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 423-431, 2014.

STÜRMER, Sidney Luiz; SIQUEIRA, José Oswaldo. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255-267, 2011.

TADINI, Amanda M. et al. Characterization of organic matter in spodosol amazonian by fluorescence spectroscopy. **Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v. 198, p. 97-107, 1998.

WRIGHT, S.; UPADHYAYA, A. A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, p. 575-586, 1996.

**ARTIGO 2**  
**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS A UMA PLANTA**  
**MICOHETEROTRÓFICA DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**RESUMO**

A relação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é a simbiose mais comum entre plantas vasculares e microrganismos. O registro fóssil indica que estes fungos foram essenciais para a colonização do ambiente terrestre por plantas primitivas. Os FMA promovem o crescimento vegetal através da mobilização de nutrientes e água, enquanto as plantas fornecem carbono fotoassimilado aos fungos. Algumas plantas tomaram um caminho evolutivo alternativo, no qual perderam sua capacidade fotossintetizante para depender exclusivamente do carbono disponibilizado pelos FMA que, por sua vez, dependem de uma planta fotossintetizante. Este tipo de nutrição é chamado de micoheterotrofismo. Plantas micoheterotróficas de *Voyriella parviflora* e o material orgânico diretamente associado ao seu sistema radicular foram coletadas no município de Baião, Pará, na região amazônica, a fim de isolar e caracterizar os FMA associados. Utilizando-se do método de cultivo armadilha, vasos foram preparados utilizando raízes de *V. parviflora* e o material de liteira ao seu redor. Replicatas foram utilizadas para cada fonte de inóculo, e *Urochloa decumbens* foi utilizada como planta isca. Apenas duas espécies de *Glomus* e *Racocetra* foram recuperadas a partir das raízes. Por outro lado, diferentes representantes de *Glomus*, *Acaulospora* e *Gigaspora* foram recuperados do material de liteira. Baseado neste relato, pode-se concluir que, embora outros fungos estejam presentes na liteira, a habilidade de promover a conexão entre uma planta fotossintetizante e as raízes de *V. parviflora* é atribuída a estas espécies de *Glomus* e *Racocetra*. Além disso, este é o primeiro relato de FMA isolados desta planta micoheterotrófica no estado do Pará.

**Palavras-chave:** Micoheterotrofismo. *Voyriella parviflora*. Fungos micorrizicos arbusculares. Amazônia.

## ABSTRACT

The relationship with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is the most common symbiosis between vascular plants and microorganisms. The fossil record indicates that these fungi were essential for the successful colonization of terrestrial environments by primitive plants. AMF promote plant growth through the mobilization of nutrients and water, while the plant provides fungi with photoassimilated carbon. Some plants took an alternative evolutionary path in which they lost their photosynthetic capacity to depend exclusively on carbon supplied through AMF, which in turn, depend on a photosynthetic plant. This type of nutrition is called mycoheterotrophism. Microheterotrophic plants of *Voyriella parviflora* and the organic material directly associated with their root systems were collected in the county of Baião, Pará, in the Amazon region, to isolate and characterize their associated AMF. By using the trap cultivation technique, pots were prepared using the roots of *V. parviflora* and their surrounding litter material. Replicates were used for each inoculum source, and *Urochloa decumbens* was used as a trap host. Only two species of *Glomus* and *Racocetra* were recovered from the roots. On the other hand, different representatives of *Glomus*, *Acaulospora*, and *Gigaspora* were recovered from the litter material. Based on these findings, we can conclude that, although other fungi are present in the litter, the ability to promote the connection between a photosynthetic plant and the roots of *V. parviflora* is attributed to species of *Glomus* and *Racocetra*. Besides, this is the first report of AMF isolation from this mycoheterotrophic plant in the state of Pará.

**Keywords:** Mycoheterotrophism. *Voyria parviflora*. Mycorrhizal arbuscular fungi. Amazon.

## 1 INTRODUÇÃO

A associação com fungos micorrízicos é o tipo de simbiose mais comum entre plantas terrestres e microrganismos (MOREIRA, 2006; SEQUEIRA *et al.*, 2010). Essa simbiose possui uma grande relevância para o funcionamento de ecossistemas e pode formar redes complexas de interdependência entre dezenas ou até centenas de indivíduos (GIOVANNETTI, 2010; SMITH & READ, 2008). Normalmente, a planta disponibiliza carbono fotoassimilado para os fungos em um fluxo unidirecional. Como contrapartida, o fungo atua promovendo o crescimento vegetal pela mobilização de água e nutrientes, sendo o fósforo o nutriente de maior relevância quando a micorrização é promovida por FMAs (SMITH & READ, 2010; OLIVEIRA *et al.* 2010). Esse tipo de microrganismo possui ainda maior importância em biomas como a Amazônia, que ocorre predominantemente sobre solos pobres e onde se atribui à matéria orgânica e aos microrganismos que atuam nessa camada a sustentação desse ecossistema tão importante a nível mundial (HERRERA, R. *et al.* 1978; MOREIRA E MALAVOLTA, 2004; OLIVEIRA *et al.* 2010).

Slavíková *et al.* (2017) e Pfeffer *et al.* (2004) utilizaram isótopos estáveis de carbono para monitorar o fluxo de carbono na relação micorrízica, e descobriram que, além de unidirecional, o fluxo de carbono não ocorre entre plantas próximas. Esse é, de certa forma, um processo regulado pela planta hospedeira, uma vez que se observou uma resposta à concentração de fósforo disponível. O investimento da planta na forma de fotoassimilados aumentou quando a concentração de fosfatos era baixa no solo (KONVALINKOVÁ *et al.*, 2010). Como os FMAs são organismos cosmopolitas e estão presentes em todos os ecossistemas terrestres, algumas plantas tomaram um caminho evolutivo no qual passaram a depender desses fungos para a obtenção de carbono em um metabolismo que trapaceia a interação micorrízica convencional. Essas plantas foram, durante muito tempo, consideradas saprofíticas, sendo que o termo micoheterotrofismo só veio a ser sugerido por Jonathan Leake, em 1994, para esse tipo de nutrição (apud. MERCKX, *et al.* 2013).

O micoheterotrofismo é uma estratégia nutricional utilizada por plantas que perderam sua capacidade fotossintetizante ou não possuem condições de manter sua própria nutrição durante certo período de seu ciclo de vida (Leake, J. R., 1994). Algumas espécies vegetais, como é o caso daquelas pertencentes à família Orchidaceae, possuem características micoheterotróficas de forma obrigatória pelo menos em uma fase de sua vida; outras, dependem de fontes de carbono disponibilizadas através dos fungos durante todo o seu ciclo, sendo consideradas micoheterotróficas estritas, como é o caso de algumas espécies da família

Gentianaceae. Das 1.100 espécies pertencentes a essa família, 121 ocorrem no Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Quatorze delas pertencem ao gênero *Voyria* e uma ao gênero *Voyriella*. Os gêneros *Voyria* e *Voyriella* e sua distribuição são geralmente associados a ambientes tropicais da América do sul, oeste Africano e África central, geralmente ocorrendo sob a floresta (GUIMARÃES *et al.*, 2018, MERCKX, 2013b). Esse tipo de metabolismo que obtém carbono dos FMAs possibilitou o sucesso destes vegetais na ocupação de ambientes com baixa incidência de luz solar (GUIMARÃES, *et al.* 2018; IMHOF, S. *et al.* 2000). Segundo Bidartondo *et al.* (2002), estes gêneros se associam preferencialmente a FMAs do gênero *Glomus*.

Além de existirem poucos estudos sobre o micoheterotrofismo como estratégia nutricional, ainda não existem relatos quanto aos fungos associados a estas espécies de plantas no Brasil. Dentro deste contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a relação entre fungos micorrízicos arbusculares e a *Voyriella parviflora*, uma espécie de planta micoheterotrófica que ocorre na Amazônia oriental. Adicionalmente, foi avaliada a presença de outras espécies de fungos nas raízes do entorno destas plantas de modo a comparar a comunidade de fungos disponíveis àqueles capazes de se relacionar com a planta micoheterotrófica em questão.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material

O material foi coletado em um fragmento da floresta Amazônica localizado no distrito de São Joaquim do Itaquara, no município de Baião, estado do Pará (Brasil). As coordenadas do local de amostragem são 2°59'13''S 49°33'30''W. O clima do local é caracterizado pela classificação de Koppen como AFI segundo Bastos (1982). A floresta estudada possui um grande acúmulo de matéria orgânica sobre o solo, havendo uma transição abrupta entre o material orgânico e o solo mineral. Este acúmulo ocorre devido ao tipo de solo presente no local, caracterizado como espodossolo. Além disso, foi observado que, nesta área, a camada orgânica possui uma densa quantidade de raízes finas que formam um emaranhado de raízes e material orgânico decomposto sobre o solo.

As plantas amostradas foram observadas próximas umas das outras e sobre a liteira, sendo que suas raízes estavam inseridas na matéria orgânica logo abaixo da liteira, estando a uma profundidade que permite o contato com a camada de raízes finas de outras espécies dotadas de metabolismo fotossintetizante. As amostras vegetais, assim como o material orgânico e as raízes de plantas próximas a seu sistema radicular, foram coletados e armazenados

em tubos de centrifuga estéreis de 50 mL e mantidos em temperatura de 4°C. Os exemplares de plantas coletados foram separados e armazenados de duas formas distintas. Alguns indivíduos foram imersos em álcool 70% e mantidos a -10°C para posterior extração de DNA; outros foram apenas mantidos a 4°C até o momento do preparo dos vasos armadilha.

## 2.2 Preparo de vasos armadilha

Parte do material coletado foi utilizado para o preparo de vasos de cultivo armadilha, a fim de multiplicar os fungos micorrízicos arbusculares associados ao sistema radicular da planta micoheterotrófica em questão. Para isso, quatro plantas tiveram suas raízes desinfestadas superficialmente em imersão por 1 minuto em álcool 70% seguido por 30 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 10M. O material desinfestado foi então colocado em vasos de 300 mL contendo solo estéril, sendo então montados 4 vasos com a raiz desinfestada, além de quatro vasos com raízes que não passaram pela desinfestação e foram apenas lavadas com água corrente. Outros quatro vasos armadilhas foram preparados utilizando as raízes de plantas autotróficas presentes na liteira e o material orgânico que estava junto às raízes amostradas. Como planta isca foram utilizadas a *Urochloa* sp. e *Mimosa pudica*, que tiveram suas sementes desinfestadas superficialmente. Os vasos então foram colocados em casa de vegetação, onde ficaram de junho de 2018 a março de 2019 sendo molhados apenas com água filtrada. As plantas isca foram submetidas a estresse hídrico e podas periodicamente (De Novais, C. B. *et al.* 2017).

## 2.3 Extração e identificação de esporos multiplicados nos vasos armadilhas

A fim de obter propágulos viáveis de FMA, o solo proveniente dos vasos armadilha começou a ser avaliado sete meses após o desenvolvimento dos fungos. Foram então amostrados 50 mL de solo do vaso armadilha. O solo foi suspenso em água e peneirado utilizando-se peneiras de 0,5 mm e 38 µm, seguido de duas centrifugações, uma em água e outra em uma solução de 60% de sacarose, conforme descrito por Gerdemann e Nicolson (1963). O material extraído foi submetido a um outro peneiramento em água passando por um conjunto de peneiras com diferentes tamanhos de malha variando de 400 µm a 38 µm. Os esporos com características morfológicas similares foram então agrupados em morfotipos e armazenados em tubos de centrifuga de 1 ml a temperatura de -20°C. Os esporos foram utilizados para montar lâminas com PVLG e PVLG acrescido de reagente de Melzer, onde foram rompidos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente durante 7 dias e observadas em microscópio Zeiss® AXIO scope A1. As fotos foram obtidas utilizando-se uma câmera AxioCam ERc5S e

o software AxioVision Rel. 4.8.2. As estruturas observadas foram comparadas com as imagens e as descrições depositadas no INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi), além das descrições disponíveis na literatura.

## 2.4 Análise molecular das plantas coletadas

A extração de DNA foi realizada com o DNeasy® PowerPlant® Pro Kit (Qiagen) conforme as especificações do fabricante. A identificação das plantas seguiu a metodologia proposta por Merckx (2013). A região mitocondrial matR foi amplificada utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores matR26F-matR1002R e matR879F-matR1858R nas seguintes condições da PCR: 1 min a 94°C seguido por 35 ciclos com 30s a 94°C, 45s a 52°C e 1 min a 72°C, seguido por 7 min a 72°C. O gene atp1 foi amplificado com os primers Atp1F-Atp1R nas seguintes condições: 3 min a 95°C seguido por 35 ciclos com 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, seguido por 10 min a 72°C de extensão final. O sequenciamento foi realizado com a metodologia Sanger no aparelho Hitachi Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

### 2.4.1 Análise filogenética

As sequências foram editadas no programa ChromasPro, onde os *contigs* foram construídos utilizando os dois sentidos do sequenciamento e a transformação para o formato fasta. As sequências dos genes matR e atp1 foram comparadas com as existentes no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLASTn otimizando por *Highly similar sequences* (megablast).

As sequências do gene atp1 foram utilizadas para construir a árvore filogenética a fim de confirmar a identificação dos vegetais coletados. As sequências utilizadas para construção da árvore filogenética para a família das Gentianaceae por Merckx *et al.* (2013) foram utilizadas como base para a construção da filogenia das plantas coletadas. O programa MEGA X (Kumar, S. et al., 2018) foi utilizado para definir a filogenia e o método de máxima parcimônia foi empregado com *bootstrap* e 500 replicatas da árvore filogenética foram criadas gerando uma árvore consenso (Kumar, S. et al., 2018; Felsenstein, J., 1985; Nei M. e Kumar S., 2000).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Filogenia e identificação molecular de *Voyriella parviflora*

Os resultados do sequenciamento para as regiões codificantes dos genes MatR e Atp1, ao serem confrontados com a base de dados do NCBI através da ferramenta BLASTn,

confirmaram a identificação das plantas coletadas como *Voyriella parviflora*. As sequências geradas foram analisadas em conjunto com aquelas utilizadas por Merckx *et al.* (2013) para descrever a filogenia da família das Gentianaceae. A análise filogenética do gene *atp1* confirmou os resultados do BLASTn, posicionando as plantas amostras em um clado separado juntamente com o indivíduo de *Voyriella parviflora* (KC535916.1) (Figura 1).

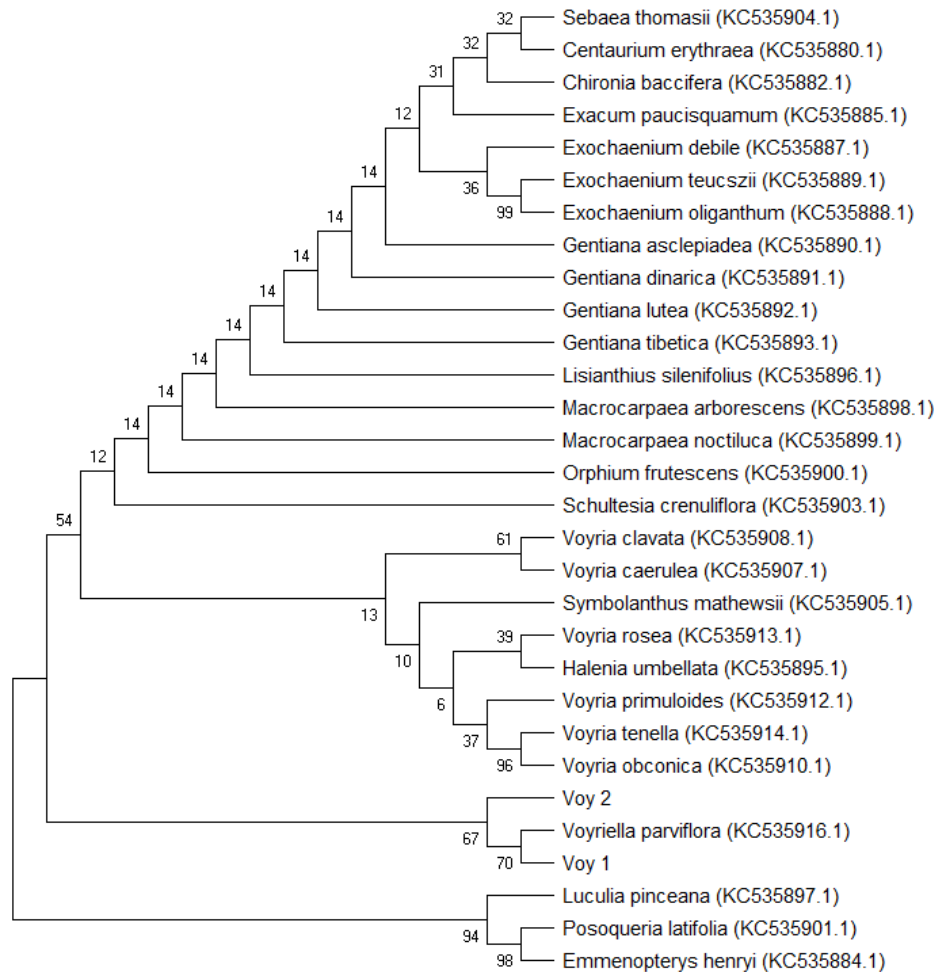


Figura 1 – Árvore filogenética com representantes da família Gentianaceae inferida pelo método da máxima parcimônia. A primeira das sete árvores mais parcimoniosas é apresentada (comprimento = 63). Os índices de consistência, de relacionamento e composto foram, respectivamente, 0,710526; 0,770833; e 0,636243 (0,547697) para todas as posições informativas. O algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) foi utilizado (Nei M. e Kumar S., 2000). Todas as posições de códons foram incluídas na análise. Utilizou-se um total de 441 posições. Fonte: Do Autor (2020).

### 3.2 FMAs associados à planta micoheterotrófica e disponíveis na camada orgânica

Foi possível observar esporos de FMAs em apenas dois vasos preparados utilizando a raiz de *Voyriella* como fonte de propágulo. Ambos os vasos foram montados com a raiz sem o processo de desinfestação superficial. Em um desses vasos foi observada uma cultura pura de

*Glomus aggregatum*, enquanto no outro foi registrada a presença de *Racocetra fulgida* além de *G. aggregatum*. Os vasos montados com as raízes das plantas circundantes e a matéria orgânica associada tiveram rendimento similar quanto à multiplicação de FMA, embora a riqueza de espécie tenha sido maior. Foram observadas seis espécies pertencentes aos gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Gigaspora* (Tabela 1 e Figura 2). Ao se examinar a raiz da planta sob microscópio estereoscópio e microscópio óptico foi possível observar uma maior presença de hifas na parte superficial do que no interior das raízes. Isso justifica o fato de não ter ocorrido multiplicação nos vasos montados com raízes que passaram pela desinfestação superficial. Estes resultados demonstram que entre uma comunidade de fungos disponíveis, apenas *Glomus aggregatum* e *Racocetra fulgida* foram capazes de criar a ponte necessária entre a planta micoheterotrófica e outros vegetais autotróficos ao seu redor.

Tabela 1 – Registro de presença de FMAs observados nos vasos preparados utilizando a raiz de *Voyriella parviflora* e o material orgânico como fonte de propágulos

Espécies	Liteira	<i>Voyriella</i>
<i>Glomus multicaule</i>	x	
<i>Acaulospora laevis</i>	x	
<i>Acaulospora brasiliensis</i>	x	
<i>Glomus aggregatum</i>	x	x
<i>Racocetra fulgida</i>		x
<i>Gigaspora sp.</i>	x	
<i>Glomus microagregatum</i>	x	

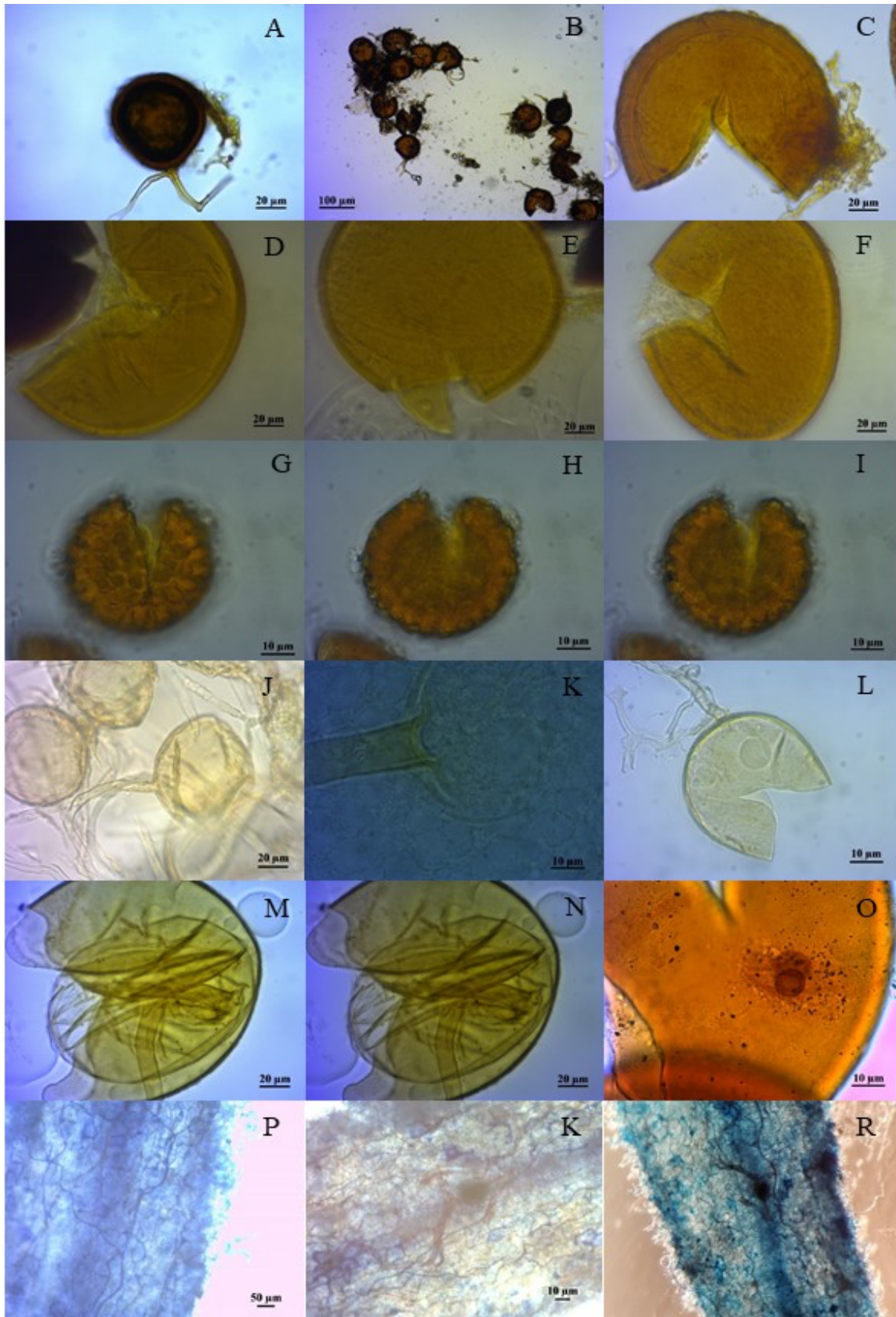


Figura 2 – Fotos dos esporos das espécies observadas. *Glomus multicaule* (A, B e C); *Acaulospora laevis* (D, E e F); *Acaulospora brasiliensis* (G, H e I); *Glomus aggregatum* (J, K, L), *Racocetra fulgida* (M e N), *Glomus microagregatum* dentro do espora de uma *Gigaspora* sp. (O). Hifas sobre as raízes de *Voyriella parviflora* (P, K e R). Fonte: Do Autor (2020).

#### 4 DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam a presença do gênero *Voyriella* no município de Baião no estado do Pará ocorrendo na serapilheira de uma floresta sobre um espodossolo, o que favoreceu a formação de uma camada espessa de raízes com acúmulo de matéria orgânica. A consulta ao banco de dados Flora do Brasil 2020, gerido pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro apresentou cinco registros de ocorrência de *Voyriella parviflora* já existentes no estado do Pará. Entretanto, esse é o primeiro trabalho que registra a ocorrência de FMA associados a essa planta no Brasil.

Plantas micoheterotróficas da família Gentianaceae foram, até o momento, pouco estudadas em sua simbiose com FMAs. Os resultados aqui apresentados mostram que a espécie estudada apresenta preferência por fungos dos gêneros *Glomus* e *Racocetra*, enquanto outros gêneros foram observados nas raízes de plantas autotróficas adjacentes, os quais não foram multiplicados quando a raiz de *V. parviflora* foi utilizada como fonte de propágulo no vaso armadilha. A preferência por fungos do gênero *Glomus* já foi descrita para espécies micoheterotróficas dos gêneros *Voyria* e *Voyriella*, ambos pertencentes a família Gentianaceae, existindo apenas uma descrição de espécies de FMAs associadas à *Voyriella* (BIDARTONDO *et al.*, 2002). Esta é a primeira descrição de *Racocetra* associada à *Voyriella*. Cabe destacar que este gênero de FMA pertence à família Gigasporaceae, que inclui gêneros como *Gigaspora* e *Scutellospora*, enquanto *Glomus* faz parte da família Glomeraceae (REDECKER *et al.*, 2013).

O estudo da relação de plantas micoheterotróficas e FMAs pode se mostrar promissor, uma vez que essas plantas são capazes de trapacear estes fungos e inverter o fluxo de carbono que costuma ocorrer exclusivamente no sentido planta-fungo, não ocorrendo fluxo de carbono entre plantas distintas em condições normais, como descrito por Pferffer *et al.* (2004). Desta forma esse tipo de estratégia nutricional pode no futuro auxiliar no entendimento que temos sobre a interação e os mecanismos de transporte de nutrientes que estão presentes na interface entre os fungos e as plantas.

Estudos que investigaram a morfologia e a colonização das raízes de plantas do gênero *Voyria* observaram pouca colonização interna das raízes, sendo que a colonização ocorreu apenas em locais de contato imediato entre as raízes da planta micoheterotrófica e um vegetal autotrófico (IMHOF, S. *et al.* 2000). As raízes desse gênero não costumam se desenvolver muito, sendo realmente curtas e possuindo pouca superfície de contato (IMHOF, S. *et al.* 2000). Entretanto, observou-se que o desenvolvimento radicular ocorre em direção a raízes de plantas autotróficas associadas com FMAs (IMHOF, S. *et al.* 2000). No caso das plantas coletadas, observou-se um sistema radicular curto, se desenvolvendo com um geotropismo negativo e

inserido em uma camada contendo folhas em decomposição e raízes finas de outras espécies de plantas crescendo sobre elas. Isso sugere que estas raízes sejam novas devido ao pouco tempo em que as folhas deveriam estar na serrapilheira para estarem neste estado de decomposição. A ocorrência de *G. aggregatum* associado a *Voyriella parviflora* corrobora os resultados já obtidos em plantas micoheterotólicas da família das Gentianaceae, enquanto a relação entre *V. parviflora* e *Racocetra fulgida* ainda não havia sido descrita.

## REFERÊNCIAS

- BASTOS, Terezinha Xavier. **O clima da Amazônia Brasileira segundo Köppen**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982.
- BIDARTONDO, Martin I. et al. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 389, 2002.
- DE NOVAIS, Cândido Barreto; BORGES, Wardsson Lustrino; SBRANA, Cristiana; GIOVANNETTI, Manuela; JÚNIOR, Orivaldo José Saggin; SIQUEIRA, José Oswaldo **Técnicas Básicas em Micorrizas Arbusculares**. 1 Ed. Lavras: Editora UFLA, 2017. 132 p. v.1.
- FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 16 Jan. 2020.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. Hs. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.
- GUIMARÃES, Elsie Franklin; SILVA, Nílber Gonçalves da; MENDES, Thalita dos Santos. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Gentianaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1125-1133, 2018.
- HERRERA, Rafael et al. Amazon ecosystems. Their structure and functioning with particular emphasis on nutrients. **Interciencia**, v. 3, n. 4, p. 223-231, 1978.
- IMHOF, S.; WEBER, H. Chr. Root anatomy and mycotrophy (AM) of the achlorophyllous *Voyria truncata* (Standley) Standley & Steyermark (Gentianaceae). **Botanica Acta**, v. 110, n. 2, p. 127-134, 1997.
- KONVALINKOVÁ, T., PÜSCHEL, D., ŘEZÁČOVÁ, V., GRYNDLEROVÁ, H., & JANSA, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. **Plant and Soil**, 419(1-2), 319-333.
- KROGH, Paul Henning. **European atlas of soil biodiversity**. European Commission, 2010.
- KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LEAKE, Jonathan R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v. 127, n. 2, p. 171-216, 1994.
- MERCKX, V. S. F. T. Mycoheterotrophy. **Springer, New York, NY. doi**, v. 10, p. 978-1, 2013b.

- MERCKX, Vincent S. F. T. et al. Phylogenetic relationships of the mycoheterotrophic genus *Voyria* and the implications for the biogeographic history of Gentianaceae. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 4, p. 712-721, 2013a.
- MOREIRA, Adônis; MALAVOLTA, Eurípedes. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1103-1110, 2004.
- NEI, Masatoshi; KUMAR, Sudhir. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford university press, 2000.
- OLIVEIRA, Arlem N.; OLIVEIRA, Luiz Antonio. Micorrizas arbusculares no bioma Amazônia. In: SIQUEIRA, José O. *et al.* **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. P. 583-613.
- PFEFFER, Philip E. et al. The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 617-627, 2004.
- REDECKER, Dirk et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, n. 7, p. 515-531, 2013.
- Slavíková, R., Püschel, D., Janoušková, M., Hujslová, M., Konvalinková, T., Gryndlerová, H., ... & Jansa, J. (2017). Monitoring CO<sub>2</sub> emissions to gain a dynamic view of carbon allocation to arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, 27(1), 35-51.
- SMITH, Sally E.; READ, David J. **Mycorrhizal symbiosis**. Academic press, 2010.