

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CATARINA MARIA ARAGÃO DE MELLO

**RIQUEZA E DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM
AGROSSISTEMAS COM MILHO, NO NORDESTE DO BRASIL**

RECIFE

2015

CATARINA MARIA ARAGÃO DE MELLO

**RIQUEZA E DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM
AGROSSISTEMAS COM MILHO, NO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Leonor Costa Maia

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Mello, Catarina Maria Aragão de

Riqueza e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas com milho, no Nordeste do Brasil/ Catarina Maria Aragão de Mello– Recife: O Autor, 2015.

112 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

- 1. Micorriza 2. Milho 3. Brasil, Nordeste I. Maia, Leonor Costa (orientadora) II. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-214

RIQUEZA E DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM AGROSSISTEMAS COM MILHO, NO NORDESTE DO BRASIL

CATARINA MARIA ARAGÃO DE MELLO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Aprovada em 29/05/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Leonor Costa Maia - Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Francisco Adriano de Souza
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dra. Danielle Karla Alves da Silva
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Prof^ª. Dra. Elaine Malosso
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

**Dedico aos meus avôs, Maria e Valfredo
Aragão.**

(In memorian)

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado saúde, discernimento e oportunidade de realizar o trabalho e por ter concebido a oportunidade de ser mãe.

À minha orientadora, Dra. Leonor Costa Maia, pela orientação e confiança.

A Gladstone Alves da Silva, pela compreensão, pela força que me deu em todos os momentos, por ser minha "alavanca" profissional, pela paciência que teve e tem comigo, pela nossa filha e, principalmente, por todo amor e carinho.

Aos meus pais Bernadete e José Rogério, meus irmãos Carla, Carine e José Rogério Filho, pelo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

Ao Dr. Fritz Oehl, por me ensinar o maravilhoso caminho da taxonomia dos fungos micorrízicos.

Às colaboradoras Paola Bonfante, Valeria Bianccioto e Erica Lumini, por colaborar na realização do trabalho durante o período do doutorado sanduíche.

Ao Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio, pelas sugestões e disponibilidade em ajudar.

À professora Uided Maaze e Renata Souza pelas sugestões e disponibilidade em ajudar.

Aos membros da banca Tereza Correia, Francisco de Souza, Danielle Silva e Elaine Malosso pela sugestões.

A Inácio Pascoal e Mário Rocha pela ajuda nas coletas.

À Iolanda, um anjo, que além de amiga ajudou bastante durante a realização do trabalho.

À Josiane, Frederico, Roberta e Danielle Magna, pelo auxílio na realização do trabalho.

A Roberto Borriello, Andrea Berruti e Alessandro Desirò, pela ajuda durante o trabalho na Itália.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Aos colegas do Laboratório de Micorrizas; Larissa, Juliana, Ângelo, Vilma, Ingrid, Indra, Natália, Bruno, Heloísa, Araeska, Camilla, Joana, Adelmo, Daniela, Débora, João Jorge, Lyssandra e Anuska pela companhia e momentos descontraídos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**"Nenhum obstáculo é grande demais
quando confiamos em Deus".**

Aristóteles

RESUMO

O conhecimento da diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de plantas cultivadas é um pré-requisito para o manejo efetivo e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi determinar qualitativa e quantitativamente as comunidades de FMA em agrossistemas plantados com milho, em Pernambuco. Na primeira etapa do trabalho foram realizadas coletas em três estações experimentais do Instituto Agrônomo de Pernambuco: uma localizada em área úmida (Zona da Mata - Itambé) e duas no semiárido (Agreste – Caruaru; Sertão - Serra Talhada) em 2010 e 2011. A análise morfológica dos esporos permitiu a diferenciação de 57 espécies de FMA, das quais duas novas para a ciência. Maior densidade de esporos ocorreu na área do agreste, que apresentou menor riqueza de espécies de FMA. Na área mais úmida foi registrada maior riqueza. A estrutura das comunidades de FMA diferiu entre os locais, segundo o teste de procedimento de permutação multi-resposta (MRPP), em função de diferenças nos atributos químicos e granulométricos dos solos. Duas novas espécies foram descritas: *Fuscutata aurea*, registrada em Itambé e *Paraglomus pernambucanum*, encontrada em amostras coletadas em Caruaru e Serra Talhada. Foi proposta uma nova combinação para *Paraglomus* (*P. bolivianum*) e revisada a ocorrência mundial dos representantes de *Paraglomus* e *Pacispora*. Na segunda etapa do estudo (2012) foram realizadas coletas em três propriedades privadas irrigadas, localizadas também nas Zonas da Mata, Agreste e Sertão, respectivamente nos municípios de Igarassu, Passira e Serra Talhada, em dois períodos de desenvolvimento do milho (60 – floração e 90 dias – colheita). A análise morfológica dos esporos revelou a presença de 43 espécies de FMA. Também foram realizadas análises moleculares da raiz, sendo sequenciados 433 clones do SSU rDNA, dos quais 93 pertencentes a indivíduos das ordens Diversisporales, Gigasporales, Glomerales e Paraglomerales. Dentre os 259 clones do LSU rDNA, 153 corresponderam a gêneros incluídos em Diversisporales, Gigasporales e Glomerales. Os demais clones foram relacionados a outros grupos de eucariotas. Em todas as áreas predominaram representantes de *Acaulospora* e *Glomus*. Houve diferença significativa entre as áreas para a maioria dos atributos químicos e composição granulométrica dos solos. A estrutura das comunidades de FMA foi significativamente diferente entre as áreas, de acordo com a ordenação (NMS) e o método estatístico (PERMANOVA). A maior porcentagem de raiz colonizada ocorreu em plantas coletadas em Igarassu (Mata), enquanto a maior riqueza de espécies foi encontrada em solos de Passira (Agreste). A diversidade de FMA no solo difere daquela encontrada no sistema radicular de plantas colonizadas. Representantes dos gêneros *Claroideoglomus*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Intraornatospora*, *Redeckera* e *Rhizoglomus* não foram identificados no solo rizosférico, enquanto *Ambispora* e *Paradentiscutata* foram observados apenas a partir da análise morfológica dos esporos presentes no solo, não sendo obtidas sequências desses gêneros. A rizosfera de plantios de milho, mesmo em áreas com diferentes características edafoclimáticas, abriga diversificada comunidade de FMA, com dominância dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora*. O estágio fenológico do milho pode influenciar a diversidade, e a composição das comunidades de FMA pode ser melhor determinada com o uso conjunto de ferramentas moleculares e morfológicas para identificação dos fungos.

Palavras-chave: Agricultura, gradiente edafoclimático, Glomeromycota, micorriza, análise molecular, *Zea mays*

ABSTRACT

The effective management and sustainability of agricultural systems depends on the knowledge of the diversity of AMF in roots of cultivated plant. The aim of this study was to determine qualitatively and quantitatively the AMF communities in corn agrosystems, in Pernambuco, Northeast Brazil. In the first stage of this work collections were carried out in three experimental stations of the Agronomic Institute of Pernambuco: one located in an Atlantic rain forest area (Forest Zone - Itambé) and two in semiarid areas ("Agreste" - Caruaru and "Sertão" - Serra Talhada), in 2010 and 2011. Fifty seven taxa were found, two of which are new species. In the "agreste" area we found higher number of spores and lower richness of AMF species. The highest species richness was registered in the most humid area. The structure of the AMF communities differed among the sites, according to the multi-response permutation procedure test (MRPP), due to differences in chemical and physical soil attributes. The new species described are: *Fuscutata aurea*, registered in Itambé (humid area) and *Paraglomus pernambucanum* found in samples from the semiarid areas. A new combination for *Paraglomus* (*P. bolivianum*) was proposed, and a survey of the global occurrence of *Paraglomus* and *Pacispora* was performed. In the second stage of this study (2012), samples were taken in three private properties, with irrigated fields of corn also located in the three areas: rain Forest (Igarassu), "Agreste" (Passira) and "Sertão" (Serra Talhada). The collections were performed in two periods of corn development (60 days – flowering, and 90 days - harvest). The morphological analysis revealed the presence of 43 AMF taxa. Molecular root analyses were performed, and 433 clones sequenced (SSU rDNA), of which 93 belonged to individuals of the orders Diversisporales, Gigasporales, Glomerales and Paraglomerales. Among the 259 clones of the LSU rDNA, 153 corresponded to genera included in Diversisporales, Gigasporales and Glomerales. The remaining clones were related to other eukaryotic groups. Species of *Acaulospora* and *Glomus* predominated in the areas. Significant differences among the areas for most chemical and physical soil attributes were found. The structure of the AMF communities was significantly different among the areas, according to the ordination (NMS) and the statistical method (PERMANOVA). The highest percentage of root colonization occurred in plants collected in Igarassu (Forest), while the highest species richness was found in Passira soils (Agreste). The diversity of AMF in the soil differs from that found in the root system of colonized plants. The genera *Claroideoglomus*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Intraornatospora*, *Redeckera* and *Rhizoglomus* were only detected through molecular analysis, while *Ambispora* and *Paradentiscutata* were observed just from morphological analysis. The rhizosphere of corn crops in areas with different soil and climatic characteristics has a diverse community of AMF, with dominance of *Glomus* and *Acaulospora* species. The growth stage of corn plants can influence the diversity of AMF fungi, which decreased in the rhizosphere of older plants. The simultaneous use of morphological and molecular approaches can improve the knowledge about the composition of AMF communities.

Key-words: Agriculture, climatic gradient, Glomeromycota, mycorrhiza, molecular analyses, *Zea mays*

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Mapa das mesorregiões de Pernambuco.....	14
Figura 2 – Classes, ordens, famílias e gêneros de Glomeromycota.....	17
Figura 3 – Estratégia da amostragem nas áreas de coleta.....	27
Figura 4 – Número de glomerosporos de FMA em áreas cultivadas com milho em duas épocas de coleta (60 e 90 dias), em Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST), no estado de Pernambuco.....	31
Figura 5 – Composição das comunidades de FMA, de acordo com a ordenação do escalonamento multidimensional não métrico (NMS), em áreas de plantio de milho, nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu -IG), Agreste (Passira - PA) e Sertão (Serra Talhada - ST), em Pernambuco.....	34
Figura 6 - Posicionamento dos clones em relação as espécies de Glomeromycota, gerada a partir de análises de sequências parciais do SSU rDNA. Valores de suporte são de máxima verossimilhança (acima dos ramos) e análise bayesiana (abaixo dos ramos). Sequências obtidas nesse estudo estão em negrito. apenas valores de suporte $\geq 60\%$ são mostrados. Ramos espessos representam clados com ao menos 90% de suporte nas análises. Os códigos para os clones representam: ZM - Zona da Mata, AG - Agreste, ST - Sertão.....	37
Figura 7 - Posicionamento dos clones em relação as espécies de Glomeromycota, gerada a partir de análises de sequências parciais do LSU rDNA. Valores de suporte são de máxima verossimilhança (acima dos ramos) e análise bayesiana (abaixo dos ramos). Sequências obtidas nesse estudo estão em negrito. Apenas valores de suporte $\geq 60\%$ são mostrados. ramos espessos representam clados com ao menos 90% de suporte nas análises. Os códigos para os clones representam: ZM - Zona da Mata, AG - Agreste, ST - Sertão.....	39

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 – Análise química e granulométrica do solo nas áreas plantadas com milho, nos municípios de Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST).....	27
Tabela 2 – Colonização micorrízica das raízes de milho, em duas épocas de coleta, nas três áreas de estudo: Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST), em Pernambuco.....	32
Tabela 3 – Espécies de FMA, abundância relativa e frequência de ocorrência em cultivos de milho, em duas épocas de coleta (60 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu - IG), Agreste (Passira - PA) e Sertão (Serra Talhada - ST), em Pernambuco.....	33
Tabela 4 – Índices ecológicos das comunidades de FMA nas áreas cultivadas com milho, em duas épocas de coleta (30 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu), Agreste (Passira) e Sertão (Serra Talhada), em Pernambuco.....	35
Tabela 5 – Gêneros de fungos micorrízicos arbusculares detectados com análises morfológicas e moleculares nas áreas cultivadas com milho, em duas épocas de coleta (30 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu), Agreste (Passira) e Sertão (Serra Talhada), em Pernambuco.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1.OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	12
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1. AGRICULTURA.....	13
3.2. MILHO.....	15
3.3. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.....	16
3.4. FERRAMENTAS PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE DE FMA.....	19
3.5. DIVERSIDADE DE FMA EM ÁREAS CULTIVADAS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO A - Artigo a ser enviado para publicação.....	61
ANEXO B - Normas do periódico Acta Botanica Brasilica.....	83
ANEXO C - Artigo publicado.....	91
ANEXO D - Artigo publicado.....	100

1. INTRODUÇÃO

A agricultura tem grande importância devido à oferta de produtos agrícolas e serviços ecossistêmicos que são essenciais para a existência humana e a qualidade de vida. Diversas práticas agrícolas que visam o aumento do fornecimento de alimentos têm causado impactos prejudiciais ao meio ambiente (GIANINAZZI et al., 2010). Essas ações resultam na degradação e perda progressiva da fertilidade do solo, além da perturbação das populações dos microrganismos benéficos, reduzindo seu potencial (JEFFRIES; BAREA, 2001). O uso de organismos promotores de crescimento de plantas constitui alternativa viável, que pode garantir a manutenção da qualidade edáfica, a saúde e a nutrição das plantas (GIANINAZZI et al., 2010).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), simbioses presentes na interface entre o solo e as raízes, constituem um grupo funcional importante da biota edáfica que, por suas atividades nutricionais e não-nutricionais, influencia profundamente os processos do ecossistema (GIANINAZZI et al., 2010). Práticas agrícolas modernas interferem na comunidade de FMA, diminuindo a diversidade e selecionando grupos de indivíduos mais capazes de colonizar as raízes, e o conhecimento sobre as espécies associadas a raízes de plantas cultivadas é um pré requisito para o manejo efetivo e a sustentabilidade de sistemas agrícolas (DANIELL et al., 2001).

A impossibilidade de cultivar os FMA em meios artificiais impede um estudo mais aprofundado que determine quais as preferências na associação entre as espécies fúngicas e as vegetais. Além disso, não é possível identificar morfologicamente os FMA em nível específico a partir do sistema vegetativo do fungo e assim a determinação de espécies de FMA presentes nas raízes, com base em estudos morfológicos, fica prejudicada (SHI et al., 2012). A biologia molecular pode auxiliar na identificação dos FMA encontrados nas raízes colonizadas e que estão efetivamente associados aos vegetais (BORRIELLO et al. 2012; ALGUACIL et al., 2008; APPOLONI et al., 2008; Farmer et al., 2007; vallino et al., 2006), determinando inclusive o seu papel funcional na associação (CESARO et al., 2008). Esse conhecimento possibilita que isolados de FMA mais efetivos possam ser selecionados para produção de inóculo e aplicação em culturas de interesse econômico.

Considerando as lacunas no conhecimento em relação à diversidade de FMA, à associação micorrízica e a importância desses fungos para o equilíbrio edáfico pretendeu-se,

com esse estudo, determinar qualitativa e quantitativamente as comunidades de FMA que ocorrem em cultivos de milho e aquelas efetivamente associadas ao vegetal. Os dados obtidos são importantes para a ampliação do conhecimento da diversidade e distribuição dos FMA em cultivos de milho. Além disso, contribuem para a definição de estratégias de produção de inóculo específico para a cultura estudada, servindo como subsídio para nortear políticas para elaboração de novos produtos que permitam diminuir a utilização de insumos agrícolas, principalmente fosfatados, melhorando a produção em agrossistemas da região.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar qualitativa e quantitativamente as comunidades de FMA em agrossistemas plantados com milho, identificando os FMA, com vistas à seleção de isolados com potencial para produção de bioinsumos.

2.2. Específicos

- Identificar as espécies e quantificar populações de FMA na rizosfera do milho;
- Comparar as populações de FMA dentro e fora da raiz hospedeira;
- Determinar a representatividade dos FMA em agrossistemas plantados com milho em Pernambuco;
- Determinar a condição micorrízica das plantas cultivadas nas áreas estudadas;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Agricultura

Para alimentar toda a população, a mecanização, a utilização de produtos químicos e o melhoramento genético de variedades de vegetais e raças de animais cresceram significativamente (SANTILLI, 2009), causando impactos prejudiciais sobre o meio ambiente e serviços dos ecossistemas (GIANINAZZI et al., 2010). Esses problemas foram chamados de "doenças ecológicas" e divididas em duas categorias: doenças do ecótopo, relacionadas a problemas edáficos e poluição do sistema hídrico, e doenças da biocenose que incluem perda de colheitas e recursos genéticos, resistência genética aos pesticidas e contaminação química (ALTIERI; NICHOLLS, 2000).

Devido a esses problemas, há uma preocupação maior com o meio ambiente e estudos que visam a proteção de plantas em sistemas alternativos de cultivo com maior grau de sustentabilidade dos agroecossistemas e outros fatores que permitam um adequado manejo dos sistemas de cultivo estão sendo desenvolvidos (BETTIOL; GHINI, 2001). A agricultura em regiões tropicais tem se preocupado com produtos de qualidade, buscando diminuir o impacto ambiental com o uso racional de agrotóxicos e, principalmente, com a procura de produtos biorracionais e inimigos naturais, para controle de pragas (CRESTANA; SOUSA, 2008).

Isso também ocorre no Brasil, que hoje é o quinto maior produtor mundial de grãos, com capacidade de atender ao aumento da demanda por alimentos e é um dos principais fornecedores de proteínas no mercado internacional (BRASIL, 2011a) com produção de 186,8 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2013).

Apesar da seca ocorrida no final de 2011 e início de 2012, no Sul e no Nordeste do país, ter provocado perdas em diversas lavouras (BRASIL, 2012), em 2013 o Brasil superou os Estados Unidos na produção e exportação de soja, sendo o primeiro no ranking, seguido pela Argentina. Com relação ao milho, os Estados Unidos ainda lideram o mercado (GAZETA DO POVO, 2013); entretanto, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, totalizando 75 milhões de toneladas em 2014/2015, sendo a indústria de rações para animais o principal destino da safra (FIESP, 2015).

As regiões brasileiras que se destacam em áreas plantadas são o Centro e o Sul do país totalizando 44,1 milhões de hectares, enquanto as regiões Norte-Nordeste plantam apenas 9,1

milhões de hectares. Os Estados com maior representatividade são Mato Grosso, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul, onde há maior mecanização e mercado voltado para exportação. O estado de Pernambuco tem apenas 314,6 mil hectares ocupados com agricultura, voltada principalmente para o consumo interno e na grande maioria de natureza familiar (CONAB, 2013).

Pernambuco ocupa uma área de 98.938 Km², com 185 municípios e uma população superior a oito milhões de habitantes (IBGE, 2011). O Estado é dividido em quatro mesorregiões (Litoral, Zona da Mata, Agreste e Sertão) (Figura 1) e apresenta elevado desenvolvimento econômico, com o segundo maior PIB do Nordeste. Dentre outras atividades econômicas, a agricultura representa importante parcela, fundamentada no cultivo da cana-de-açúcar, na Zona da Mata, e na fruticultura irrigada, no sertão pernambucano. O Estado também possui cultivos de sequeiro, principalmente de feijão, mandioca, algodão e milho. Devido à importância da agricultura para o Estado e à demanda por alimentos a expansão é inevitável, acompanhada por acréscimo do uso de pesticidas e fertilizantes, acarretando aumento dos custos para produtores e intensas pressões bióticas e abióticas no solo.

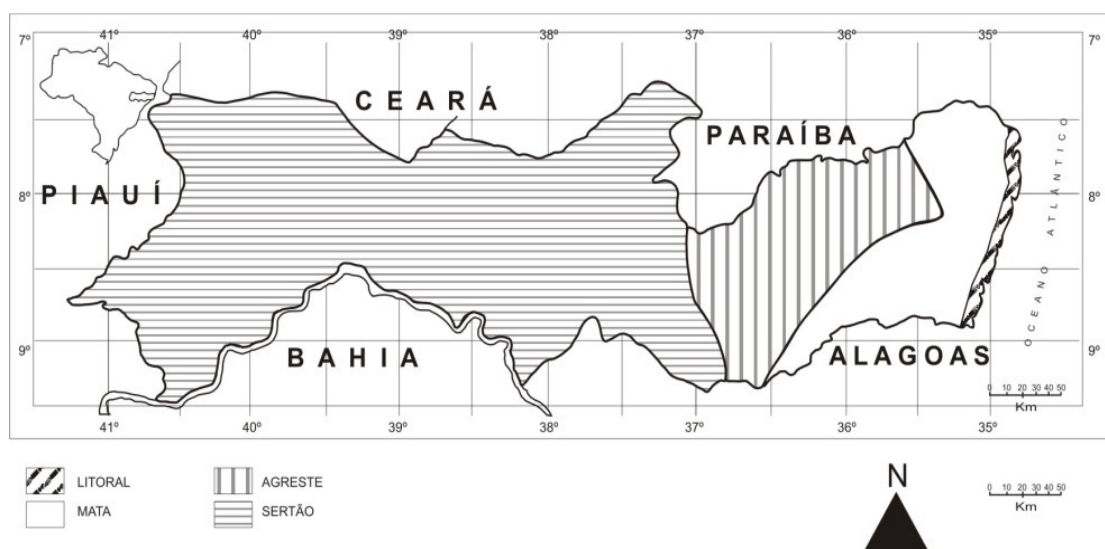


Figura 1: Mapa das mesorregiões de Pernambuco.

Por mais que a agricultura moderna tenha avançado em técnicas e a despeito da preocupação com o ambiente, os atuais sistemas de produção agrícola podem se tornar insustentáveis, pois causam impactos ambientais severos, como erosão, salinização, poluição das águas e dos solos por agrotóxicos e diminuição da biodiversidade e dos recursos genéticos (MAROUELLI, 2003).

3.2. Milho

O milho (*Zea mays* L.), nome provavelmente derivado de "Mahis", que significa "fonte de vida" (ABBASSIAN, 2007), é uma gramínea anual, robusta e ereta, variando de 1 a 4 metros de altura, de origem americana, tendo como parentes selvagens mais próximos o teosinto e espécies de *Tripsacum*. As primeiras evidências do milho na América do Sul vêm do Peru (FREITAS, 2001), onde observou-se que os Incas construíam canais de irrigação destinados principalmente ao cultivo do grão, cujo excedente era exportado para outras zonas (MAZOYER; ROUDART, 2010).

O milho era cultivado desde o Canadá até a Argentina, tornando-se o principal cultivo dos maias, astecas e incas (PATERNIANI; CAMPOS, 2005). O grão era consumido cozido, grelhado ou em sêmola, ou ainda na forma de bebida fermentada, a *chicha* e era cultivado todo o ano (MAZOYER; ROUDART, 2010). Os indígenas americanos submeteram o milho a um processo contínuo de melhoramento, chamado de seleção massal, no qual os melhores grãos eram selecionados, separados e semeados novamente elevando a planta ao apogeu de domesticação (PEIXOTO, 2002). Assim, perdeu a capacidade natural de sobrevivência, necessitando do auxílio humano para propagação (PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

Adaptado a diferentes latitudes, o milho possui alta diversidade genética. Estudos indicam que os padrões genéticos da distribuição do milho ao longo da América do Sul se deram de forma heterogênea; nos Andes foram encontrados padrões na forma primitiva, enquanto nas terras baixas do restante da América encontraram-se padrões genéticos da espécie atual (FREITAS, 2001). Os povos mais antigos deixaram o legado de cerca de 300 raças de milho, caracterizadas pelas mais diversas adaptações, tanto para condições climáticas como para os vários usos do cereal (AQUINO, 2003).

O milho é um dos cereais com maior capacidade de produção de matéria seca e grãos; por essa característica tornou-se a mais importante cultura na alimentação animal e é indispensável no processo de rotação de culturas no plantio direto (PEIXOTO, 2002). Cerca de 70% do milho em grãos, no mundo, é usado para alimentação animal e no Brasil essa porcentagem varia de 60 a 80% (RIVERA, 2006). É a terceira planta mais cultivada no mundo, após o trigo e o arroz (ABBASSIAN, 2007) e apresenta grande valor econômico, destacando-se na produção mundial com aproximadamente 981 milhões de toneladas (USDA FAS GRAIN, 2014).

No Brasil, principalmente em regiões de baixa renda, como o semiárido nordestino, o milho é o principal alimento humano (RIVERA, 2006). Esse vegetal é plantado em duas épocas: primeira safra e segunda safra ou safrinha, sendo esta última referente ao milho de sequeiro plantado geralmente entre os meses de Janeiro a Março. No Nordeste a produtividade do milho na primeira safra foi de 2.410 Kg/ha, enquanto o de sequeiro foi de 3.595 Kg/ha (safra 2014/15). Os estados que contribuíram para essa produção foram Maranhão, Piauí, Sergipe, Bahia e Alagoas; Pernambuco só produziu na primeira safra (CONAB, 2015).

Na indústria o milho é transformado em vários subprodutos: álcool, óleo, margarina e amido que pode ser transformado em dextrina, dextrose ou frutose. O milho também está sendo utilizado na forma de polímeros biodegradáveis na indústria de embalagens e automobilísticas (PEIXOTO, 2002). Devido à importância, muitos estudos são realizados com essa planta, incluindo os efeitos e as interações com diferentes microrganismos (BALAKRISHNAN; SUBRAMANIAN, 2012; CELEBI et al., 2010).

3.3. Fungos micorrízicos arbusculares

Com a intensificação da agricultura nos últimos anos, houve aumento na demanda por fertilizante. No entanto, esses insumos são caros e podem ser prejudiciais se usados de forma inadequada. Assim, há interesse na aplicação de bioinsumos que auxiliam no melhoramento da fertilidade do solo, aumentando a capacidade do uso de nutrientes, assim como a produtividade do cultivo, tornando o sistema agrícola ecologicamente sustentável. Vários microrganismos são utilizados como bioinsumos, dentre os quais fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os FMA formam a mais ampla simbiose entre fungos e plantas na natureza (SMITH; READ, 2008). Através da rede de hifas externas os fungos captam nutrientes e água presentes no solo, transferindo-os à planta hospedeira. O micélio funciona como extensão da raiz, e a planta torna-se capaz de explorar maior volume de solo. As estruturas responsáveis pelas trocas entre hospedeiro e fungo são os arbúsculos, e os FMA formam também vesículas, na raiz, e células auxiliares, no solo, com função de armazenamento de lipídios (SILVEIRA, 1992). A principal estrutura de propagação é o glomerosporo, que pode ser formado isoladamente, em grupos ou em esporocarpos (SMITH; READ, 2008) e constitui a principal estrutura para estudos de taxonomia morfológica.

Os FMA pertencem ao filo Glomeromycota (SCHUESSLER et al., 2001) e atualmente são conhecidas cerca de 270 espécies, distribuídas em três classes, cinco ordens, 15 famílias e 38 gêneros (Figura 2) (<http://glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas#!c1/c229i>).

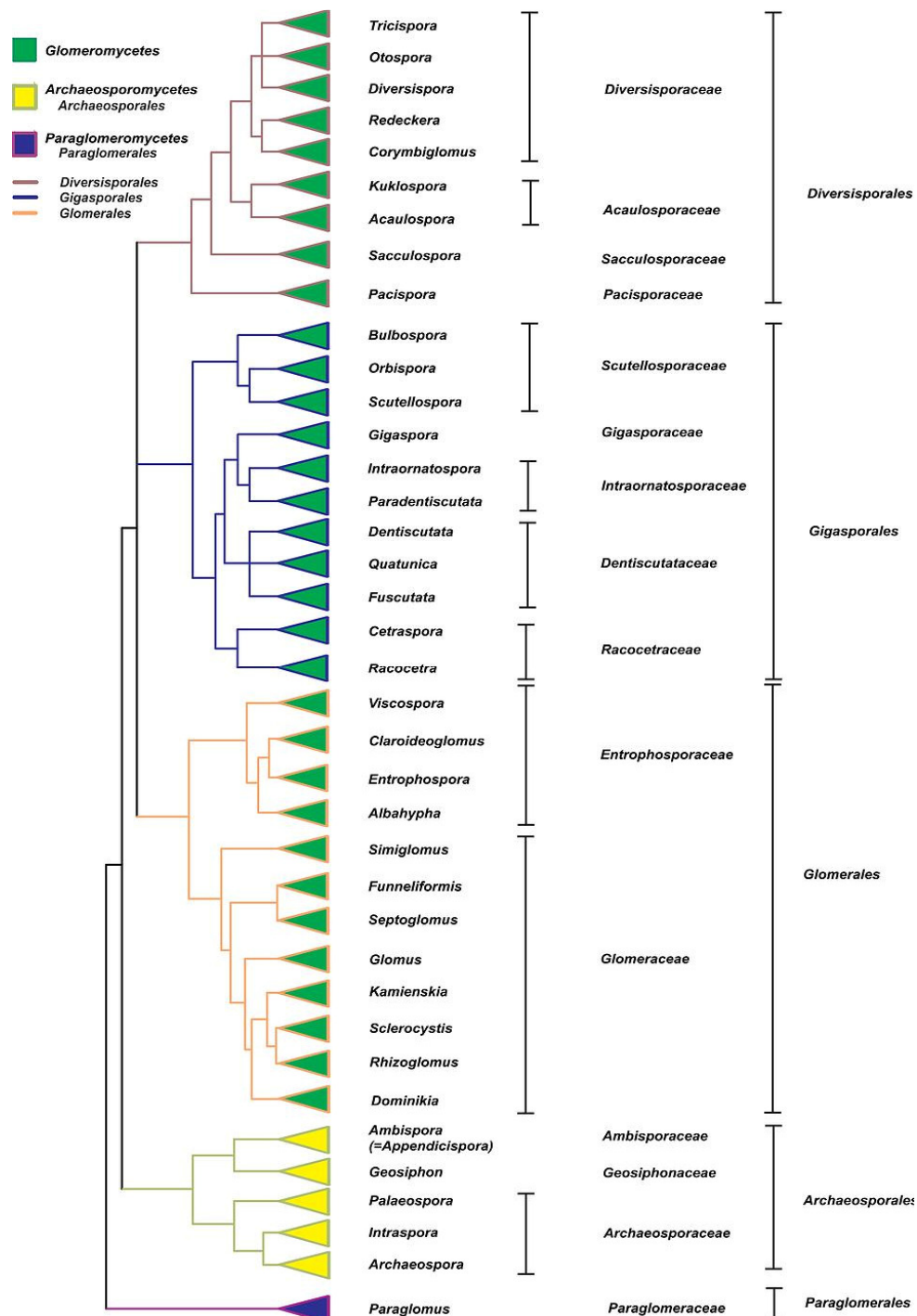


Figura 2. Classes, ordens, famílias e gêneros de Glomeromycota. Fonte: <http://glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas#!sistema-de-classificao/c1cmb>

Além de aumentar a capacidade produtiva e diminuir custos, os FMA ajudam a melhorar a ciclagem da matéria e energia, levando ao aumento na produtividade do solo e beneficiando os agroecossistemas (LIN et al., 2012) e os ecossistemas naturais. Os FMA também promovem a produtividade das plantas em ecossistemas naturais e cultivados (VAN DER HEIJDEN et al., 1998) e são importantes na estruturação do solo, contribuindo para a estabilidade de agregados (WRIGHT et al., 1998).

Constituindo um grupo funcional chave da biota do solo, por suas atividades nutricionais e não nutricionais, os FMA influenciam e contribuem para os serviços ecossistêmicos (GIANINAZZI et al., 2010). Esses fungos proporcionam numerosos benefícios para os hospedeiros, incluindo aquisição de fósforo e outros nutrientes, os FMA possuem a capacidade de suplementar o fósforo disponível de forma eficiente para as plantas em sistemas de produção agrícola (LEHMAN et al., 2012), aumento da tolerância à seca e proteção contra patógenos, além de contribuírem para a sustentabilidade agrícola (MEHROTRA, 2005; LEHMAN et al., 2012), uma vez que a simbiose pode aumentar a sobrevivência das plantas associadas (JEFFRIES et al., 2003).

Associações micorrízicas arbusculares podem ser encontradas nos mais variados biomas e ecossistemas, tais como desertos, savanas, pradarias, dunas, florestas tropicais, áreas degradadas e em agroecossistemas (STÜRMER; SIQUEIRA, 2008). Provavelmente os FMA são os fungos mais abundantes dos ecossistemas tropicais, principalmente nos agrícolas, onde podem representar aproximadamente 50% da biomassa microbiana (OLSSON et al., 1999), uma vez que a maioria das culturas tropicais formam micorrizas arbusculares em maior ou menor grau (CARDOSO et al., 2010).

A funcionalidade das micorrizas depende da adequada interrelação entre os fungos, as plantas e o ambiente. Contudo, práticas de agricultura intensiva, como a utilização de fertilizantes, pesticidas, contínuo revolvimento do solo e a monocultura impactam fortemente a estrutura e a composição da comunidade fúngica, assim como a presença e prevalência dos FMA e sua interação com as plantas (DOUDS JR; MILLNER, 1999; ALGUACIL et al., 2008; OEHL et al., 2010).

Práticas de agricultura sustentável em áreas tropicais têm resultado na melhoria da "saúde do solo" e no aprimoramento do funcionamento dos FMA (ALARCÓN et al., 2007), considerando a importância das micorrizas na nutrição das plantas em solos tropicais intemperizados e deficientes de P (CARDOSO et al., 2010).

Várias pesquisas apontam benefícios da micorrização em culturas de interesse, tais como café (ANDRADE et al., 2009), acerola (COSTA et al., 2001), mangaba (COSTA et al., 2005), maracujá (CAVALCANTE et al., 2001, 2002), banana (YANO-MELO et al., 2003), graviola (SILVA et al., 2008) e espécies arbóreas (LINS et al., 2006, 2007). Com relação ao milho, a micorrização auxilia a fortificação de sementes com Fe e Zn, contorna o impacto de fatores anti-nutricionais, uma vez que a fertilização com zinco promove a produção de raízes fibrosas altamente ramificadas que facilitam a colonização micorrízica (BALAKRISHNAN; SUBRAMANIAN, 2012).

Práticas de exploração edáficas, baseadas em tratamentos com FMA, podem representar um modo sustentável para aumentar a fertilidade do solo e a produtividade da cultura, uma vez que esses fungos parecem ser uma alternativa viável para fertilização com P ou, pelo menos, para reduzir a necessidade de aplicações de grandes quantidades desse nutriente (COZZOLINO et al., 2013).

A apesar de serem considerados potencialmente bons para a produtividade agrícola ainda não são inoculados rotineiramente no Brasil, devido a diversos fatores, entre eles: problemas para identificar e rastrear as espécies de fungos em campo, a má compreensão da biologia básica e a incapacidade destes em crescer em meio artificial e produzir cultura pura (HIJRI et al., 2006). Assim, estudar a biologia dos FMA é de fundamental importância para identificar aqueles que estão efetivamente associados, beneficiando os vegetais.

3.4. Ferramentas para estudo da diversidade de FMA

Tendo em vista a grande importância dos FMA nos diversos processos ecológicos, é necessário entender os fatores relacionados a esses processos e identificar os fungos envolvidos. A impossibilidade de cultivar os FMA em meios artificiais tem dificultado estudos mais aprofundados que determinem as preferências na associação entre as espécies de fungos e de plantas. Além disso, não se pode identificar morfologicamente os FMA em nível específico a partir do sistema vegetativo do fungo.

As ferramentas mais comuns para estudo da diversidade dos FMA são a identificação morfológica e a contagem de esporos no solo; com isso é possível estudar a riqueza e a equitabilidade de espécies (ZAK; WILLING, 2004) e aplicar índices de diversidade. Esses índices são expressos por um único número, que pode representar a redução ou a abundância de um conjunto complexo de táxons (MATOS et al., 1999). Embora não representem a

composição total de uma comunidade, permitem estudar a diversidade em diferentes ambientes (KENNEDY; SMITH, 1995). Apesar de todas as ferramentas disponíveis aos estudos de FMA, podem ocorrer limitações metodológicas e de deficiência de informações taxonômicas, ocasionando compreensão limitada da diversidade microbiana (MATOS et al., 1999).

Técnicas de avaliação de comunidades de FMA baseadas apenas nos esporos podem não refletir as comunidades que estão interagindo com as plantas, uma vez que o número de esporos nem sempre é correlacionado com a extensão de raiz colonizada, e a análise de esporos fornece apenas uma medida indireta da diversidade de FMA (REDECKER, 2000; APPOLONI et al., 2008). Essas avaliações refletem a história de esporulação acumulada no respectivo solo e não necessariamente os fungos simbioses que estão efetivamente atuando na cultura (HIJRI et al., 2006). Além disso, os FMA são diversos nas suas condições e habilidades de esporulação e colonização, de modo que os métodos de identificação baseados apenas na morfologia podem não refletir totalmente a riqueza de espécies no ecossistema (SHARMAH et al., 2010).

O uso de ferramentas moleculares na identificação dos FMA tem ajudado na obtenção de uma representação mais completa da comunidade (GAI et al., 2009) permitindo a identificação de FMA dentro das raízes (REDECKER, 2000; APPOLONI et al., 2008) e auxiliando no entendimento da diversidade (BEAUREGARD et al., 2013; ROSENDAHL; STUKENBROCK, 2004). Assim, têm sido utilizadas para auxiliar a revelar aspectos funcionais e ecológicos de FMA associados com diferentes plantas e/ou diferentes condições ambientais, sendo essencial detectar comunidades de FMA no campo, em nível de espécie (KRÜGER et al., 2009). A diferença entre a identificação morfológica de FMA e a análise molecular de raiz é que na primeira o procedimento de coleta, propagação e enumeração dos esporos mede o potencial de inóculo de um solo, enquanto na molecular a detecção de fungos dentro das raízes determina a comunidade simbiote em um determinado momento (HIJRI et al., 2006).

Para estudos de ecologia molecular de FMA, o gene do rRNA está entre os alvos mais promissores de sequenciamento do DNA, e este é extraído de raízes, esporos ou solo. O rRNA é bem estudado porque na maioria dos organismos encontra-se em cópias múltiplas no genoma e parte dele é altamente conservado (REDECKER et al., 1997). São três as regiões do rRNA utilizadas para estudos moleculares: a subunidade pequena (SSU rRNA), as regiões de transcritos internos (ITS1, 5.8S e ITS2) e a subunidade grande (LSU rRNA), que podem ser

utilizadas separadas ou em conjunto. Entretanto, possuem algumas limitações: a SSU rRNA é a região mais utilizada, mas possui baixa variabilidade quando comparada com a ITS (LEE et al., 2008); a região ITS oferece grande variabilidade de sequências dentro de Glomeromycota e alto poder de diferenciação até o nível de espécie (STOCKINGER et al., 2010), no entanto o número de amostras necessário para estudos ambientais pode ser inviável; a região do LSU rRNA (mais conservada que o ITS, porém menos que o SSU) é comparável com a região ITS, mas são necessários muitos pares de primers para englobar todos os gêneros do filo, e dependendo dos pares de primers utilizados, podem não demonstrar a variabilidade de algumas famílias (STOCKINGER et al., 2010; GAMPER et al., 2009).

Primers adequados para englobar ampla variedade de espécies de FMA ainda são necessários (LANDIS et al., 2004; OEHL et al., 2005). Kohout et al. (2014) compararam diferentes primers em estudos de comunidades de FMA e concluíram que a interpretação dos dados ecológicos à partir de resultados moleculares pode ser influenciada pela escolha dos primers e das regiões do rRNA.

Para estudos de diversidade por sequenciamento é necessária a amplificação do material selecionado por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando primers específicos para os táxons em estudo. Assim, diferentes técnicas podem ser utilizadas, entre as quais a clonagem. Como os FMA apresentam grande número de núcleos no micélio individual, a utilização desta técnica é necessária para assegurar uma representação adequada de espécies na amostra. No entanto, o método torna-se dispendioso porque é necessário sequenciar centenas de clones (LANDIS et al., 2004). Uma maneira conveniente para minimizar os custos é a utilização de padrões de polimorfismo nos fragmentos de restrição (RFLP) e um padrão específico de RFLP pode ser usado para sequenciar apenas clones selecionados (REDECKER et al., 2003). Apesar de apresentar baixo custo e bons resultados, essa técnica é muito laboriosa. Outros métodos utilizados para estudar a comunidade fungica são: eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE), padrões de polimorfismo nos fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) e "fingerprinting" oligonucleotídeo de genes de rRNA (OFRG). Atualmente, dentre as tecnologias mais avançadas está o sequenciamento de segunda geração, o chamado pirosequenciamento ou 454, que detecta espécies presentes nas amostras em baixa abundância (PATREZE et al., 2012), além de poder inferir tanto sobre a comunidade de FMA como sobre a sua função ecológica nos locais de estudo (LIN et al., 2012).

A diversidade de FMA no solo, em forma de esporos, é maior do que a diversidade no interior das raízes e, além disso, nem todos os táxons presentes como esporos são detectados por PCR de raízes, ou porque não são simbioticamente ativos no respectivo tempo ou colonizam raízes em níveis baixos, não sendo possível a detecção (HIJRI et al., 2006). A identificação morfológica a partir de esporos permite melhor diferenciação dos táxons de fungos e a detecção mais sensível de mudanças na composição e diversidade da comunidade no solo, quando comparada a métodos moleculares (WETZEL et al., 2014). A idade da planta também é fator importante para diferenciação da estrutura das comunidades de FMA. Dependendo do tipo de análise (DNA ou RNA), observam-se resultados diferenciados na comunidade de FMA: analisando o DNA é possível avaliar os fungos que estão associados às plantas, enquanto com o RNA é possível avaliar quais estão efetivamente ativos (KURAMAE et al., 2013).

Apesar da identificação molecular ainda apresenta problemas para detecção de táxons em pequenas quantidades de tecido de raiz que podem ser analisados, além do número limitado de clones a partir de cada produto de PCR (HIJRI et al., 2006), essa ferramenta juntamente com a identificação morfológica possibilita melhor entendimento da diversidade de FMA (REDECKER et al., 2003).

3.5. Diversidade de FMA em áreas cultivadas

A biodiversidade determina a funcionalidade e a estabilidade dos ecossistemas terrestres (VAN DER HEIJDEN et al., 1998). Quando ecossistemas naturais são convertidos em agrossistemas a diversidade de FMA tende a diminuir e isso decorre da intensidade das práticas agrícolas (ALARCÓN et al., 2007). Os solos cultivados sofrem intensas pressões de seleção devido as práticas de manejo (ROSENDAHL et al., 2009), com o revolvimento podendo reduzir a infectividade dos fungos e a colonização na fase inicial do crescimento da cultura (SCHALAMUK; CABELLO, 2010). Com isso as plantas são colonizadas por menor número de táxons de FMA que em áreas menos perturbadas, restando somente os fungos adaptados a condições de agricultura (OEHL et al., 2010).

A interação entre fertilização e a combinação de diferentes elementos do solo pode ter papel importante no desenvolvimento de FMA, principalmente sob diferentes condições de cultivo (WANG et al., 2009). Adubações fosfatada e nitrogenada de longo prazo diminuem significativamente a riqueza e a diversidade da comunidade de FMA mudando sua estrutura,

além de afetar a porcentagem de colonização (WANG et al., 2009; LIN et al., 2012; VERBRUGGEN et al., 2012a; GOSLING et al., 2013).

Práticas agrícolas impactam a simbiose micorrízica (GOSLING et al., 2006; CARRENHO et al. 2010) uma vez que a disponibilidade de recursos em ambientes que sofrem estresse devido aos diferentes sistemas de uso do solo é um dos fatores que controlam a natureza e as propriedades dos FMA nos solos superficiais, podendo influenciar a composição da comunidade (HIGO et al., 2013) e assim afetar a riqueza das espécies (WETZEL et al., 2014). De acordo com Jefwa et al. (2012) e Tian et al. (2011), solos aráveis podem apresentar alta diversidade de FMA, pois distúrbios ocasionados pela agricultura reduzem a densidade de esporos; no entanto, a riqueza e a diversidade de FMA permanecem mesmo com mudanças drásticas no uso do solo.

A diversidade de plantas, fatores edáficos (pH, teor de umidade, fósforo e disponibilidade de nitrogênio), tipo de manejo das culturas e a produtividade de um ecossistema influenciam significativamente a diversidade de FMA no solo (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; LUMINI et al., 2010; BEAUREGARD et al., 2013; GOSLING et al., 2013; HIGO et al., 2013). A densidade de esporos tende a ser maior em locais onde há mais de uma espécie de planta; no entanto, não é claro como espécies vegetais coexistindo afetam o crescimento e as funções de fungos micorrízicos (Chen et al., 2005).

Cada espécie de planta pode possuir comunidades diferentes de FMA (GOSLING et al., 2013); deste modo, dependendo do tipo ao qual esteja associada, a espécie de FMA apresenta nicho multidimensional específico (LUMINI et al., 2010).

Diferenças entre os tipos de solo influenciam mais a abundância relativa dos gêneros de Glomerales que plantas hospedeiras ou fertilidade do solo (BRUNDRETT et al., 1999; OEHL et al., 2010). Longo tempo de fertilização altera a riqueza de gêneros de FMA, e a adição de NPK faz com que a proporção de Acaulosporaceae e Gigasporaceae diminua no solo (LIN et al., 2012; Wang et al., 2009). Solos agrícolas são mais colonizados por espécies de *Glomus* (BEAUREGARD et al., 2013). *Funneliformis mosseae* tem distribuição global, o que possivelmente favorece o sucesso desse táxon em condições de agricultura (ROSENDAHL et al., 2009). Fatores como práticas culturais e vegetação podem também contribuir para determinar o domínio de um determinado táxon de FMA (SIVAKUMAR, 2013).

Estudos sobre a diversidade de FMA utilizando a morfologia dos esporos têm sido realizados em áreas cultivadas e com diferentes usos de solo. Em nível mundial, considerando

trabalhos realizados na Europa, Índia, China e África, a riqueza e o índice de diversidade de FMA tem variado desde 12 a 58 registros de espécies em cultivos diversos a 0,69 a 2,5 em índices de diversidade (OEHL et al., 2003; 2005; 2010; SIVAKUMAR, 2013; WANG et al., 2009; JEFWA et al., 2012; TIAN et al., 2011).

No Brasil, a riqueza de espécies de FMA tem variado de 16 a 50 e o índice de diversidade em cultivos diversos de 1,8 a 2,5 (MAIA; TRUFEM, 1990; SOUSA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014).

Certas espécies foram consideradas generalistas ou dominantes em diversas áreas (OEHL et al., 2003; 2005; 2010; SIVAKUMAR, 2013; WANG et al., 2009; JEFWA et al., 2012; TIAN et al., 2011) (Tabela 1). As seguintes espécies também são comuns em diferentes ambientes no Brasil, desde florestas a agrossistemas: *Acaulospora morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *A. tuberculata*, *Ambispora appendicula*, *Cetraspora pellucida*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporus*, *Gigaspora margarita*, *Rhizoglossum clarum*, *R. microaggregatum*, *Glomus diaphanum*, *G. macrocarpum*, *Sclerocystis sinuosa*, *Racocetra persica*, *Scutellospora calospora* e *Fuscutata heterogama* (De SOUZA et al. 2010)

Trabalhando com identificação morfológica e molecular em solo agrícola na Alemanha, Wetzel et al. (2014) registraram 25 espécies de FMA com a primeira técnica, sendo *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora calospora*, *F. geosporus* e *Rhizoglossum intraradices* os mais abundantes. Para a análise molecular utilizaram os primers LR1-FLR2 e FLR3-FRL4, amplificando DNA de raiz de trigo e observaram que, de acordo com as análises filogenéticas, *Glomus* foi representado pelo maior número de sequências de clones, seguido por *Funneliformis* e *Scutellospora*, enquanto *Claroideoglossum* e *Entrophospora* foram representados por apenas três sequências. Os autores concluíram que a identificação morfológica dos esporos permitiu melhor diferenciação dos táxons de fungos e detecção mais sensível de mudanças na composição e diversidade da comunidade, quando comparada aos métodos moleculares.

Com a utilização de ferramentas puramente moleculares, é possível a observação de menor número de representantes de FMA, como visto por Higo et al. (2013) em sistemas de rotação de soja, no Japão, no qual utilizaram os primers LR1-FLR2 e FLR3-FRL4 e registraram apenas 16 filotipos de FMA, dos gêneros *Glomus* (maioria), *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Diversispora* e *Paraglossum*. Em experimento em potes contendo cultivares de milho, Kuramae et al. (2013) utilizaram os primers FR1-FF390 modificados e registraram

sequências apenas de *Glomerales* e *Paraglomerales*, observando que a diversidade (índice de Shannon), a equitabilidade e a riqueza não diferiram entre os cultivares e tempos de cultivo.

A riqueza de FMA em áreas cultivadas com batata e milho, na Holanda, foi de 11 táxons, quando utilizaram-se para detecção os primers LR1-FLR2 e FLR3-FRL4 (VERBRUGGEN et al., 2012a). Borriello et al. (2012) utilizaram combinações de primers (NS31/AMmix, 28G1/28G2 e GOCC56/GOCC427) para amplificar DNA de raízes e solo de área cultivada com milho, na Itália, e observaram representantes dos gêneros *Glomus*, *Diversispora* e *Gigaspora*, e índices de diversidade (Shannon) de 1,1 a 1,7, que variaram dependendo das condições de manejo do solo.

Nos estudos mencionados, *Glomus* é o gênero com o maior número de espécies representadas (BORRIELLO et al. 2012; HIGO et al., 2013; Wetzl et al., 2014). A predominância de espécies pertencentes a Glomeraceae na maioria dos estudos indica que fungos dessa família apresentam ampla capacidade de tolerância e adaptação a condições de estresse, confirmando que podem ser encontrados em uma extensa faixa de habitats, tanto naturais como agrícolas (ÖPIK et al., 2006).

Alguns problemas ainda são encontrados com a identificação molecular por sequências ribossomais de FMA. No entanto, a combinação da identificação morfológica clássica de esporos e a análise molecular de raízes é altamente promissora, pois auxilia a caracterizar melhor as comunidades de FMA dentro do sistema radicular (REDECKER et al., 2003), identificando os fungos que estão efetivamente associados aos vegetais (APPOLONI et al., 2008; FARMER et al., 2007) e determinando inclusive o seu papel funcional na associação (CESARO et al., 2008). Dessa forma, isolados de FMA mais efetivos poderão ser selecionados para produção de inóculo e aplicação em culturas de interesse econômico. É importante que novas tecnologias sejam desenvolvidas para seleção de isolados de FMA efetivos nos agrossistemas brasileiros, permitindo a produção de inoculantes funcionais, que aumentem a produção agrícola gerando mais divisas para o país e proporcionando crescimento sustentável da produção vegetal.

4. Material e Métodos

4.1. Áreas de estudo

O estudo foi realizado em áreas cultivadas com milho, em propriedades de pequenos produtores, nos municípios de Igarassu (07°51'33,9"S e 34°59'04,5"W), Passira (07°59'51,6"S e 035°29'54,9"W) e Serra Talhada (07°52'32,5"S e 38°27'12,1"W), inseridos respectivamente nas zonas úmida - Mata (floresta tropical), e semiáridas - Agreste (seco) e Sertão (mais seco), no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Buscava-se associar a ocorrência de FMA ao gradiente edafoclimático representado pelas três áreas de coleta, mas devido ao período prolongado de seca todas as áreas foram irrigadas por gotejamento, durante o período de desenvolvimento do milho. Os plantios de Igarassu e Passira foram adubados com NPK antes da semeadura, nas proporções 20:10:20 kg ha⁻¹ e 60:60:20 kg ha⁻¹, respectivamente e em Serra Talhada o solo não foi adubado, possivelmente devido aos altos teores de P e K encontrados.

Igarassu está inserido na região metropolitana do Recife, no estado de Pernambuco e faz parte da unidade dos tabuleiros costeiros que acompanha o litoral de todo o nordeste, com altitude média de 100 metros. Compreende platôs de origem sedimentar, com vales estreitos, encostas abruptas e fundos com amplas várzeas. Os solos são profundos e de baixa fertilidade natural (CPRM, 2005). O clima é tropical chuvoso com verão seco (tipo As de Köppen-Geiger, KOTTEK et al., 2006). O período chuvoso tem início em fevereiro e término em outubro. A precipitação média anual é de 1.634 mm, mas no período de coletas a precipitação foi de apenas 329 mm. Os solos dessa unidade geoambiental são representados pelos Latossolos (CPRM, 2005). A área foi plantada com maracujá antes da introdução do cultivo de milho.

Passira está localizado no agreste do Estado na microrregião do médio Capibaribe, com altitude de 176 m; o clima é semiárido (tipo BShs' de Köppen-Geiger, KOTTEK et al., 2006). As chuvas ocorrem no outono e inverno, iniciando em fevereiro/março e podendo estender-se até agosto. A temperatura média anual é de 24°C e a precipitação média anual é de 604 mm; nos períodos de coleta a precipitação foi de apenas 125 mm. O relevo é geralmente movimentado, com vales profundos e estreitos e os solos são Planossolos (CPRM, 2005). A cultura anteriormente plantada era pimentão.

O município de Serra Talhada está inserido na unidade geoambiental da Depressão Sertaneja, na mesorregião do sertão a 500 m de altitude. O relevo é predominantemente plano e suave-ondulado, cortado por vales estreitos, com vertentes dissecadas (CPRM, 2005, TABOSA et al., 2010). O clima é tropical semiárido, com chuvas de verão (tipo Bsh de Köppen-Geiger, KOTTEK et al., 2006). O período chuvoso se inicia em novembro com

término em abril. A temperatura média anual é de 24 °C e a precipitação média anual normalmente é de 680 mm, no período de coletas a precipitação foi de 3 mm. Os solos predominantes são do tipo Argissolo (TABOSA et al., 2010). Antes do plantio do milho a área foi cultivada com algodão.

4.2. Coletas de amostras de solo e raízes

Foram coletadas em 2012 três amostras compostas (3 sub-amostras) de solo e raízes (Figura 1) na profundidade de 0-20 cm, em dois períodos de desenvolvimento do milho (60 e 90 dias, maturação e colheita, respectivamente), nas três áreas selecionadas. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos; parte foi enviada para análise físico-química (Tabela 1) na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e o restante usado para as análises micorrízicas. As raízes do milho foram lavadas, secas em temperatura ambiente, e uma parte usada para análise da colonização por FMA e a outra parte estocada em freezer (-20 °C) para análises moleculares.

Tabela 1. Análise química e granulométrica do solo nas áreas plantadas com milho, nos municípios de Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST).

Áreas	pH	Fe	Zn	Mn	P	K	Na	Al	Ca	Mg	H
		mg dm ⁻³				cmole dm ⁻³					
IG	5,5b	46,5a	5,0a	4,7b	48,0a	0,2a	0,1c	0 a	3,1b	0,3b	3,6a
PA	6,9a	6,7b	4,2a	79,1a	80,0a	1,0a	0,3b	0 a	8,7a	1,4b	0,9b
ST	7,4a	69,7a	5,0a	49,4a	130,0a	1,1a	1,6a	0 a	7,9a	2,7a	0,9b
Áreas	C	V	Composição granulométrica %				Classe Textural				
	%		AG	AF	Silte	Argila					
IG	1,8a	50,2b	54,9a	31,9a	5,2a	7,9a	Areia-franca				
PA	2,0a	92,3a	53,5a	32,7a	5,7a	7,9a	Areia-franca				
ST	1,3b	93,8a	59,6a	26,8a	5,7a	7,9a	Areia-franca				

V= saturação por base, AG= areia grossa, AF= areia fina. *fósforo disponível pelo método extrator de Mehlich1. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo de teste Tukey a 5%.

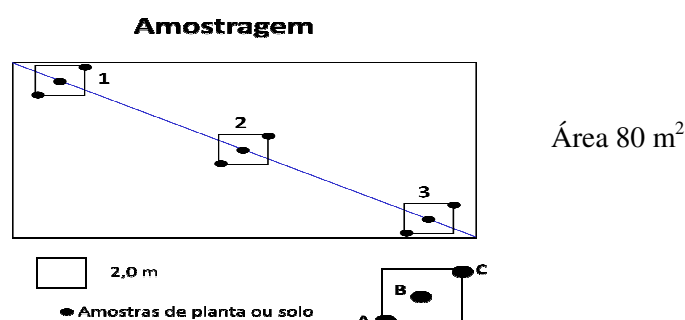


Figura 3. Estratégia da amostragem nas áreas de coleta.

4.3. Contagem de glomerosporos e identificação dos FMA

Glomerosporos e esporocarpos foram extraídos de 100 g de solo de cada área por peneiramento úmido e centrifugação em sacarose (GERDEMANN; NICOLSON, 1964, JENKINS, 1964), quantificados em placa canaletada e observados em estereomicroscópio (40 x). Os esporocarpos foram contados como uma unidade. Os glomerosporos foram montados em lâminas com polivinil lacto-glicerol (PVLG) e PVLG + reagente de Melzer (1:1) e as espécies foram identificadas a partir da análise morfológica dos esporos.

4.4. Colonização radicular

As raízes coletadas foram lavadas, diafanizadas com KOH (10%) e coradas com azul de tripano (0.05%) (PHILLIPS; HAYMAN, 1970). A porcentagem de arbúsculos, vesículas, hifas e a colonização total foram calculadas de acordo com McGonigle et al. (1990).

4.5. Extração do DNA das raízes

A extração do DNA das amostras de raízes foi realizada usando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK), de acordo com o protocolo do fabricante para amostras congeladas. Qualidade e quantidade do DNA isolado foi analisada com auxílio do Nanodrop.

4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR), análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), clonagem e sequenciamento

Foram amplificadas parte da subunidade ribossomal pequena (SSU) e da subunidade ribossomal grande (LSU). Para a região SSU do rDNA foi realizada uma nested PCR. Na primeira reação foram utilizados os primers NS1-NS4 (WHITE et al., 1990) e na segunda os primers AML1-AML2 (LEE et al., 2008) (Condições da PCR: 95 °C a 5 min., com 35 ciclos a 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min., 72 °C por 1 min. e um ciclo para a elongação final a 72 °C por 10 min.). As reações de PCR para os primers AML1/AML2 diferiram apenas na quantidade de ciclos (30) e na temperatura de anelamento (58 °C). Um controle negativo sempre foi incluído na PCR para verificação de possível contaminação. Para amplificação do LSU rDNA também foi realizada uma nested PCR. Na primeira reação foram utilizados os

primer ITS3 (WHITE et al., 1990) e LSU2 (SANTIAGO et al., 2014) e para segunda os primers LR1-28G2 (VAN TUINEN et al., 1998; SILVA et al., 2006). Os parâmetros de ciclagem para as PCRs foram os mesmos descritos acima para a amplificação do SSU rDNA, diferindo apenas na temperatura de anelamento, que para primeira reação foi de 60 °C e para a segunda 56 °C. Após a amplificação 5 µL do produto de PCR foi usado para corrida em gel de agarose (1%) e posterior visualização em transiluminador. Os produtos de PCR foram purificados usando o QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha), clonados com o pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, USA) em células de *Escherichia coli* (X11 blue), seguindo o protocolo do fabricante.

Foi realizado a triagem dos clones contendo o inserto para cada biblioteca de genes (SSU e LSU rRNA) resultantes, usando uma segunda amplificação com os primers AML1/AML2 (SSU) e os primers específicos para os clones do pGEM-T Easy - SP6-T7 (LSU) seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Vinte e quatro dos clones positivos, a partir de cada uma das amostras, foram testados para polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) por digestão com Hinf I e Hsp92II de acordo com protocolo do fabricante (Promega). Os produtos da digestão foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2,5% (em TBE, tris-borato-EDTA). Duas amostras de cada tipo de RFLP foram purificadas com ExoSAP-IT (Affymetrix, USB) e enviadas para sequenciamento na Universidade Ludwig Maximilian de Munique (Alemanha).

4.7. Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram comparadas com as presentes no NCBI usando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), sendo utilizados na análise filogenética apenas os fragmentos relacionados a Glomeromycota, os quais foram alinhados, com outros (do filo Glomeromycota) recuperados do GenBank, com o auxílio do programa Clustal X (LARKIN et al., 2007) e editados usando o programa BioEdit (HALL, 1999).

A caracterização molecular final se deu com a avaliação filogenética e construção de árvores. As análises bayesiana (5×10^6 gerações) e de máxima verossimilhança (1000 bootstraps) foram realizadas, respectivamente, com MrBayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) e PhyML (GUINDON; GASCUEL, 2003), executados a partir do programa Topali 2.5 (MILNE et al., 2004). O modelo de substituição nucleotídica usado (GTR + G) foi estimado usando Topali 2.5.

4.8. Diversidade de FMA

Os seguintes parâmetros ecológicos foram considerados: riqueza de espécies, abundância relativa (AR), frequência de ocorrência (FO), equitabilidade e diversidade, usando os dados da identificação morfológica dos glomerosporos extraídos do solo do campo. A riqueza de espécies foi definida como o número de espécies de FMA registradas em cada área de estudo, a abundância relativa foi definida como o número de esporos de uma espécie ou gênero em particular, dividido pelo número total de esporos e multiplicado por 100, a FO foi calculada pelo número de vezes que determinada espécie ou gênero foi isolada nas áreas, multiplicado por 100. De acordo com a frequência de ocorrência (FO), as espécies foram divididas em quatro categorias: dominantes ($D = FO > 50\%$), muito comuns ($MC = 30\% > FO \leq 50\%$), comuns ($C = 10\% > FO \leq 30\%$) e raras ($R = FO \leq 10\%$), segundo Zhang et al. (2004). A diversidade dentro da comunidade de FMA e a equitabilidade foram avaliadas pelo índice de Shannon ($H' = - \sum (Pi \ln Pi)$), onde $Pi = ni/N$, ni = número de glomerosporos da espécie i , e N = número total de glomerosporos de todas espécies. A equitabilidade foi calculada de acordo com a equação $E = H'/H'_{max}$, onde H' é o índice de Shannon e H'_{max} é dado pela expressão: $H'_{max} = \log s$.

4.9. Análise de similaridade

Foi calculado o índice de similaridade de Sorensen para os FMA entre os períodos de coleta para cada área (BROWER; ZAR, 1984).

4.10. Análises estatísticas

Os valores dos parâmetros obtidos a partir da análise do solo, o número de glomerosporos e a colonização micorrízica foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). Os parâmetros de diversidade, como índice de Shannon, equitabilidade e riqueza foram calculados usando o programa Past (HAMMER et al., 2001). Os dados de composição das comunidades de FMA foram ordenados usando escalonamento multidimensional não métrico (NMS) (KRUSKAL, 1964) e a distância de Sørensen. Foi

realizada a análise PERMANOVA com base na distância euclidiana para testar se os solos diferem entre os locais estudados. Antes da análise os dados foram relativizados na coluna para eliminar o efeito das diferenças entre as unidades dos atributos do solo. PERMANOVA também foi realizada para testar se havia diferenças na composição das comunidades de FMA entre as áreas com base na distância de Bray–Curtis.

5. Resultados

Os solos das áreas são eutróficos (Tabela 1). Com base na análise de variância constatou-se diferenças significativas entre as áreas na maioria dos atributos do solo, exceto para Zn, P, K e composição granulométrica. O teor de P foi alto nos três locais de coleta (>40) (Malavolta, 1992). O pH apresentou-se com acidez média no solo de Igarassu, chegando a neutro nas demais áreas. Maiores teores de Fe foram encontrados nos solos de Serra Talhada e Igarassu. A PERMANOVA mostrou que as características do solo diferiram entre as áreas ($F = 11,0$, $p < 0,01$).

Amostras de solo dos plantios continham de 78 a 748 glomerosporos 100g solo⁻¹, com diferenças significativas entre as áreas e os períodos de coleta de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,01$). O maior número de esporos foi registrado na área de Passira e o menor em Igarassu (Figura 2).

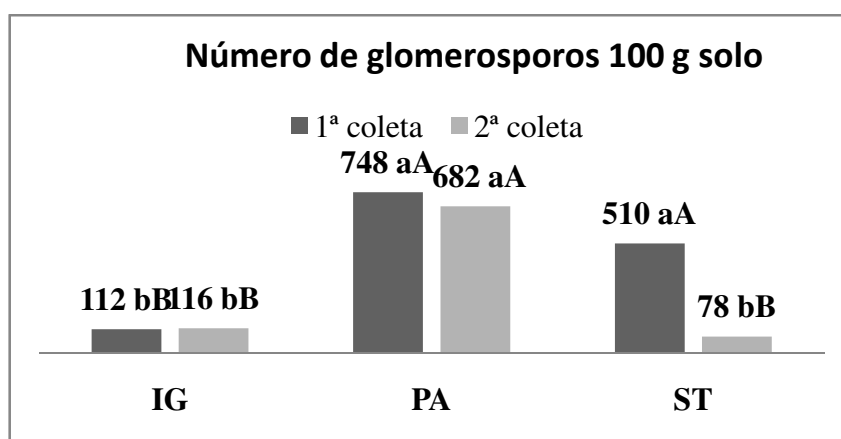


Figura 4. Número de glomerosporos de FMA em áreas cultivadas com milho em duas épocas de coleta (60 e 90 dias), em Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST), no estado de Pernambuco. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam os períodos de coleta da mesma área, letras maiúsculas comparam as áreas no mesmo período de coleta.

As amostras de raízes apresentaram média de colonização total variando de 3,9 a 64,1%. As maiores médias de vesículas, arbúsculos e hifas foram encontradas na área de Igarassu e as menores nas outras duas áreas (Tabela 2). Na segunda coleta houve diferença

significativa na colonização das raízes entre todas as áreas. Apenas em Serra Talhada houve diferenças na colonização em relação aos períodos de coleta.

Tabela 2. Colonização micorrízica das raízes de milho, em duas épocas de coleta, nas três áreas de estudo: Igarassu (IG), Passira (PA) e Serra Talhada (ST), em Pernambuco.

Áreas	Colonização %							
	1ª coleta				2ª coleta			
	Arb.	Ves.	Hifa	Total	Arb.	Ves.	Hifa	Total
IG	4,3 aA	16,0 aA	41,1 aA	61,4 aA	5,9 aA	16,6 aA	38,9 aA	61,4 aA
PA	1,3 bB	5,6 aB	16,7 aB	23,0 aB	3,8 aB	7,0 aB	16,6 aB	27,3 aB
ST	1,3 aB	2,5 aB	25,7 aB	29,5 aB	0 bC	0,8 bC	3,1 bC	3,9 bC

Arb.= arbúsculos, Ves.=vesículas. Médias seguidas pelas mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). Letras minúsculas comparam, na linha os períodos de coleta na mesma área, letras maiúsculas, comparam, na coluna, as áreas no mesmo período de coleta.

A identificação morfológica permitiu a diferenciação de 24 espécies de FMA em Igarassu (área úmida), 27 em Passira (área seca) e 17 em Serra Talhada (área mais seca). Incluindo os dois períodos de coleta e as três áreas estudadas foram reconhecidos 43 táxons (Tabela 3). Em termos de frequência de ocorrência, 25% das espécies foram dominantes em Igarassu (*Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora decipiens*, *G. margarita*, *Racocetra coralloidea* e *R. fulgida*), 41% em Passira (*Acaulospora excavata*, *A. longula*, *A. scrobiculata*, *Entrophospora infrequens*, *Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp. 1, *Glomus* sp. 2, *Paraglomus occultum* e *Septoglomus* sp.) e 41% também em Serra Talhada (*A. scrobiculata*, *Ambispora* sp., *Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp. 1, *Glomus* sp. 2, *Septoglomus* sp. e *Sclerocystis sinuosa*). A maioria das espécies foi comum ou muito comum em todas as áreas e não se registrou espécies raras (Tabela 3). Em todas as áreas *Acaulospora* e *Glomus* predominaram; em Igarassu representaram 45,5% da comunidade de FMA (*Acaulospora* com 33% e *Glomus* com 12,5%); em Passira esses gêneros representaram 44,4% da comunidade, enquanto em Serra Talhada constituíram 32,2% dos FMA presentes. *Acaulospora laevis*, *Glomus* sp. 5, *Paraglomus pernambucanum*, *Racocetra coralloidea* e *Septoglomus constrictum* foram observados apenas na segunda coleta, em Passira. Com a análise do NMS (Figura 3) foi possível explicar 77,7% da variância dos dados em 49,6% pelo eixo 1 e em 28,1% pelo eixo 2 e as análises estatísticas (PERMANOVA) mostraram que a composição das comunidades de FMA diferiu entre as áreas ($F = 6,63$, $P < 0,01$).

A idade da planta influenciou a riqueza de FMA nas áreas de Igarassu e Serra Talhada, com diminuição na 2ª coleta (Tabela 3); o mesmo número de espécies ocorreu em Passira. Em relação à similaridade (índice de Sorensen) de espécies em função dos períodos de coleta, em

Igarassu e Passira a similaridade dos táxons atingiu 77%, enquanto em Serra Talhada apenas 58% foram similares.

Tabela 3. Espécies de FMA, abundância relativa e frequência de ocorrência em cultivos de milho, em duas épocas de coleta (60 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu -IG), Agreste (Passira - PA) e Sertão (Serra Talhada - ST), em Pernambuco.

Espécies	Áreas/ Coletas					
	IG		PA		ST	
	AR / FO %		AR / FO %		AR / FO %	
	1	2	1	2	1	2
<i>Acaulospora excavata</i>	1,94 / MC	1,47 / C	0,80 / D	0,56 / D	0,38 / MC	0
<i>A. foveata</i>	0,43 / C	0,21 / C	0	0	0	0
<i>A. lacunosa</i>	0	0	0,06 / C	0,03 / C	0	0
<i>A. laevis</i>	0	0	0	0,06 / C	0	0
<i>A. longula</i>	0	0	40,24 /DM	47,00 / D	0	0
<i>A. mellea</i>	8,85 / D	12,60 / MC	0	0	0	0
<i>A. minuta</i>	0	0	0,03 / C	0	1,88 / MC	0
<i>A. morrowiae</i>	23,75 / MC	12,18 / MC	0	0	0	0
<i>A. punctata</i>	0	0	0,03 / C	0,13 / MC	0	0
<i>A. scrobiculata</i>	10,58 / D	2,31 / D	0,80 / D	0,72 / D	6,17 / D	0
<i>A. spinosa</i>	0,43 / C	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora</i> sp. 1	0,21 / C	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora</i> sp. 2	0,21 / C	3,15 / C	0,09 / C	0,03 / C	0	0
<i>Acaulospora</i> sp. 3	0	0	0	0	0,43 / C	0
<i>Ambispora</i>						
<i>appendicula</i>	0,43 / C	0	0,06 / MC	0,03 / C	0	0
<i>Ambispora</i> sp.						25,68 / D
	0,86 / C	0	0,03 / C	0	27,59 / D	
<i>Cetraspora pellucida</i>	0,43 / C	0,84 / C	0,24 / MC	0	0,19 / C	0
<i>Cetraspora</i> sp.	0	0	0,03 / C	0,06 / MC	0	0
<i>Corymbiglomus tortuosum</i>	0	0	0	0	0,33 / C	0
<i>Dentiscutata cerradensis</i>	0,21 / C	0	0	0	0,24 / C	0
<i>Entrophospora infrequens</i>	0	0	0,65 / D	0,52 / D	0	0
<i>Funneliformis mosseae</i>	0	0	13,05 /D	18,25 / D	1,88 / D	17,73 / D
<i>Fuscutata aurea</i>	0	0	0	0	0,04 / C	0
<i>Gigaspora decipiens</i>	4,96 / D	2,73 / MC	0,09 / C	0	0	0
<i>G. gigantea</i>	1,72 / MC	0	0	0	0	0
<i>G. margarita</i>	9,50 / D	10,50 /D	0	0	0,09 / C	0
<i>Glomus glomerulatum</i>	2,80 / MC	0,63 / MC	0	0	0	0
<i>G. macrocarpum</i>	7,34 / MC	4,20 / C	0,56 / MC	2,10 / MC	0	0
						21,71 / MC
<i>Glomus</i> sp. 1	0	0	20,40 /D	11,66 / MC	43,70 / D	
<i>Glomus</i> sp. 2						15,29 / D
	4,75 / MC	9,03 / D	9,59 / D	5,86 / D	13,16 / D	
<i>Glomus</i> sp. 3	0	0	1,49 / C	1,58 / MC	0	0
<i>Glomus</i> sp. 4	0	0	0	0,03 / C	0	0
<i>Paradentiscutata maritima</i>	1,94 / C	2,10 / MC	0	0	0	0
<i>Paraglomus bolivianum</i>	0	0	0	0	0,09 / C	0,91 / C
<i>P. occultum</i>	1,07 / C	0	2,05 / D	6,52 / D	1,73 / C	0
<i>P. pernambucanum</i>	0	0	0	0,16 / MC	0	0

Tabela 3. Continuação

<i>Paraglomus</i> sp.	0,64 / C	0	0	0	0	0
<i>Racocetra coralloidea</i>	4,96 / D	2,94 / D	0	0,03 / C	0	0
<i>R. fulgida</i>	11,44 / D	35,08 / D	0	0	0	0
<i>Septoglomus constrictum</i>	0	0	0	0,46 / C	0	0
<i>Septoglomus</i> sp.	0	0	9,56 / D	3,98 / D	1,35 / D	12,23 / D
<i>Sclerocystis clavispota</i>	0	0	0,03 / C	0	0	0
<i>S. sinuosa</i>	0,43 / C	0	0,03 / C	0,13 / MC	0,67 / D	6,42 / D
Riqueza de espécies por período	24	15	22	22	17	7
Riqueza de espécies por área	24	27		17		

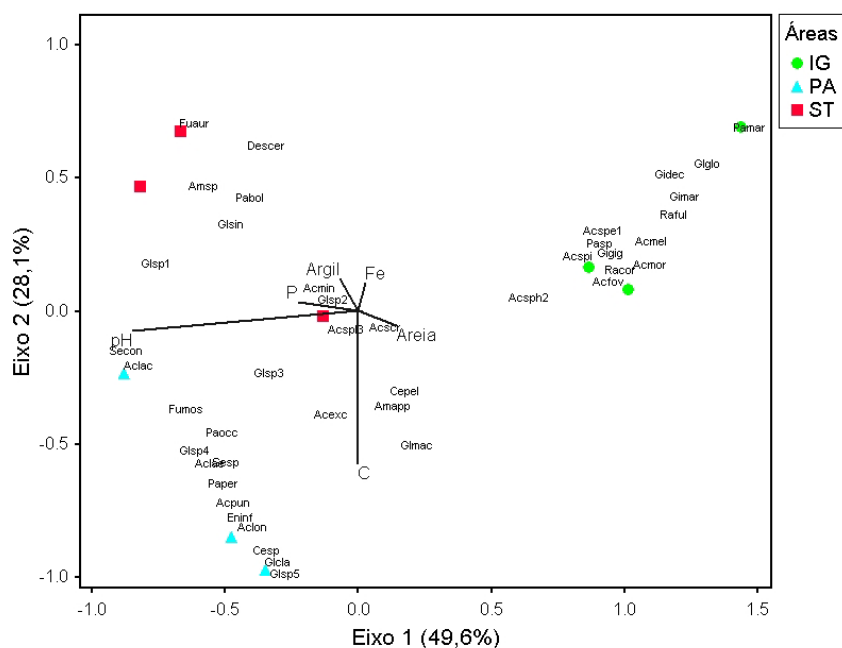


Figura 5. Composição das comunidades de FMA, de acordo com a ordenação do escalonamento multidimensional não métrico (NMS), em áreas de plantio de milho, nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu - IG), Agreste (Passira - PA) e Sertão (Serra Talhada - ST), em Pernambuco.

A maior diversidade de FMA, pelo índice de Shannon, foi encontrada na área mais úmida (Tabela 4). Com relação a fenologia da planta (60 e 90 dias), houve variação significativa para a diversidade dos FMA apenas em Igarassu. O número de indivíduos foi maior em Passira nos dois períodos de coleta, em relação às outras áreas. As comunidades de FMA nas áreas permaneceram equilibradas (Tabela 4).

Foram selecionados e sequenciados 423 clones (164 do SSU e 259 do LSU rDNA). Quando comparados com as sequências depositadas no NCBI (via BLASTn), os fragmentos

de DNA obtidos nesse estudo revelaram que das 164 sequências de SSU, 93 (57%) apresentaram elevado percentual de identidade com sequências de táxons pertencentes ao filo Glomeromycota, enquanto as 71 remanescentes (43%) foram relacionadas com outros grupos de fungos ou pertenciam ao milho. Das 259 sequências obtidas do LSU, 153 (59%) apresentaram alta similaridade com sequências de Glomeromycota, enquanto o restante (106 = 41%) estava relacionado a outros eucariotas. A família de FMA com maior representação nas sequências obtidas foi Glomeraceae (41 sequências do SSU e 35 do LSU rDNA). Alguns dos clones obtidos não se enquadraram em nenhum dos gêneros de Glomeromycota, podendo representar espécies que pouco esporulam ou que possivelmente são novos táxons.

Tabela 4. Índices ecológicos das comunidades de FMA nas áreas cultivadas com milho, em duas épocas de coleta (30 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu), Agreste (Passira) e Sertão (Serra Talhada), em Pernambuco.

Áreas	Índices ecológicos					
	R		H'		J'	
	1	2	1	2	1	2
Igarassu	24aA	15bA	2,5aA	2,0bA	0,78aA	0,77aB
Passira	22aA	22aA	1,7aB	1,7aB	0,56aB	0,55aC
Serra Talhada	17aA	7bB	1,5aC	1,7aB	0,55bB	0,89aA

R= riqueza, H'= diversidade de Shannon, J'= equitabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). Letras minúsculas, na linha, comparam os períodos de coleta na mesma área; letras maiúsculas, na coluna, comparam as áreas no mesmo período de coleta.

Os clones do SSU rDNA foram agrupados em subclados de Glomeromycota, correspondendo aos gêneros: *Claroideoglossum*, *Glomus*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Rhizoglossum*, *Septoglossum*, *Acaulospora*, *Diversispora*, *Redeckera*, *Racocetra*, *Dentiscutata*, *Fuscutata*, *Gigaspora* e *Paraglossum* (Figura 4). Os clones obtidos das raízes coletadas na área de Igarassu estão bem distribuídos entre vários gêneros de diferentes ordens de Glomeromycota (Diversisporales, Glomerales, Gigasporales e Paraglomerales); nas raízes de Passira a maioria dos clones correspondeu a *Funneliformis*, e em Serra Talhada, Glomeraceae foi a família mais representada, principalmente pelo gênero *Septoglossum*.

Os clones do LSU rDNA obtidos neste estudo foram agrupados em gêneros correspondentes a três ordens de Glomeromycota (Diversisporales, Gigasporales e Glomerales) (Figura 5). Esses gêneros foram praticamente os mesmos observados no SSU rDNA, com exceção de alguns, tais como: *Diversispora*, *Redeckera* e *Paraglossum*. Em Diversisporales foi encontrado um representante de *Corymbiglossum*, em Glomerales foram encontrados alguns clones relacionados a *Sclerocystis* e em Gigasporales foi registrado um

clone para *Intraornatospora*. Este último clone provavelmente corresponde à *Intraornatospora intraornata*, já que apresentou 99% de identidade com a sequência dessa espécie, agrupando-se na árvore com 100% de suporte. Muitos clones (LSU rDNA) da área de Passira e Igarassu foram relacionados a *Rhizoglosum*. A maioria das sequências pertencentes a Gigasporales tanto para o SSU, quanto para o LSU rDNA foi obtida das raízes de plantas cultivadas em Igarassu (zona da Mata), assim como as relacionadas a *Corymbiglomus tortuosum* (LSU rDNA) e *Redeckera fulva* (SSU rDNA).

Com a utilização de análise morfológica em associação com a molecular foi possível detectar a presença de 21 gêneros de FMA, o que representa 55% de todos os identificados. Representantes dos gêneros *Claroideoglomus*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Intraornatospora*, *Redeckera* e *Rhizoglosum* não foram identificados no solo rizosférico, enquanto *Ambispora* e *Paradentiscutata* foram observados apenas a partir da análise morfológica dos esporos presentes no solo, não sendo obtidas sequências desses gêneros (Tabela 5).

Tabela 5. Gêneros de fungos micorrízicos arbusculares detectados com análises morfológicas e moleculares nas áreas cultivadas com milho, em duas épocas de coleta (30 e 90 dias), nas três áreas de estudo: Mata (Igarassu), Agreste (Passira) e Sertão (Serra Talhada), em Pernambuco.

Gêneros	Análises		
	Morfológica	Molecular	
		SSU	LSU
<i>Acaulospora</i>	X	X	X
<i>Ambispora</i>	X		
<i>Cetraspora</i>	X		
<i>Claroideoglomus</i>		X	X
<i>Corymbiglomus</i>	X		X
<i>Dentiscutata</i>	X	X	X
<i>Diversispora</i>		X	
<i>Dominikia</i>		X	
<i>Entrophospora</i>	X		
<i>Funneliformis</i>	X	X	X
<i>Fuscutata</i>	X	X	X
<i>Gigaspora</i>	X	X	X
<i>Glomus</i>	X		
<i>Intraornatospora</i>			X
<i>Paradentiscutata</i>	X		
<i>Paraglomus</i>	X	X	
<i>Racocetra</i>	X	X	X
<i>Redeckera</i>		X	
<i>Rhizoglosum</i>		X	X
<i>Septoglosum</i>	X	X	X
<i>Sclerocystis</i>	X		X
Total	15	13	12

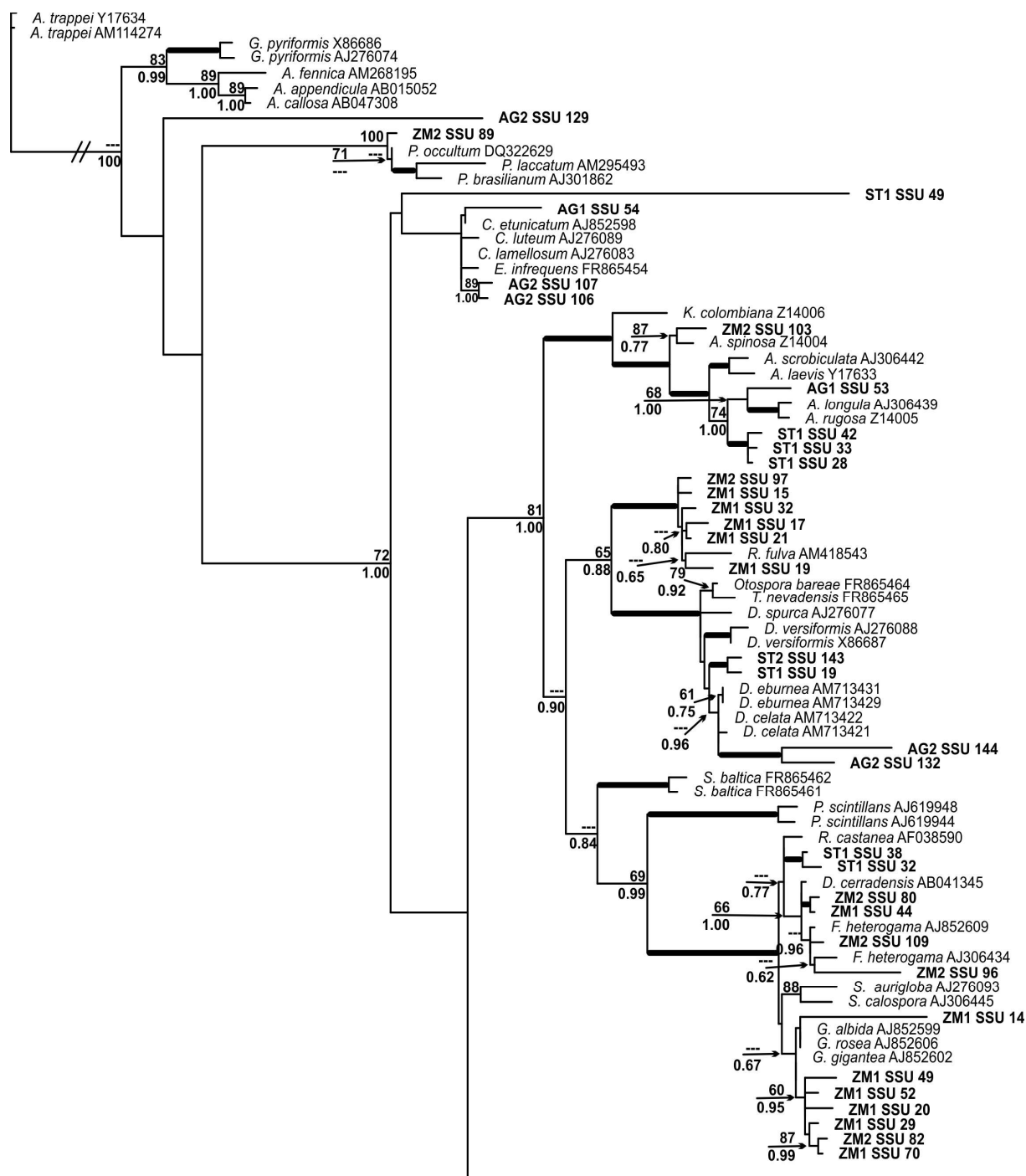
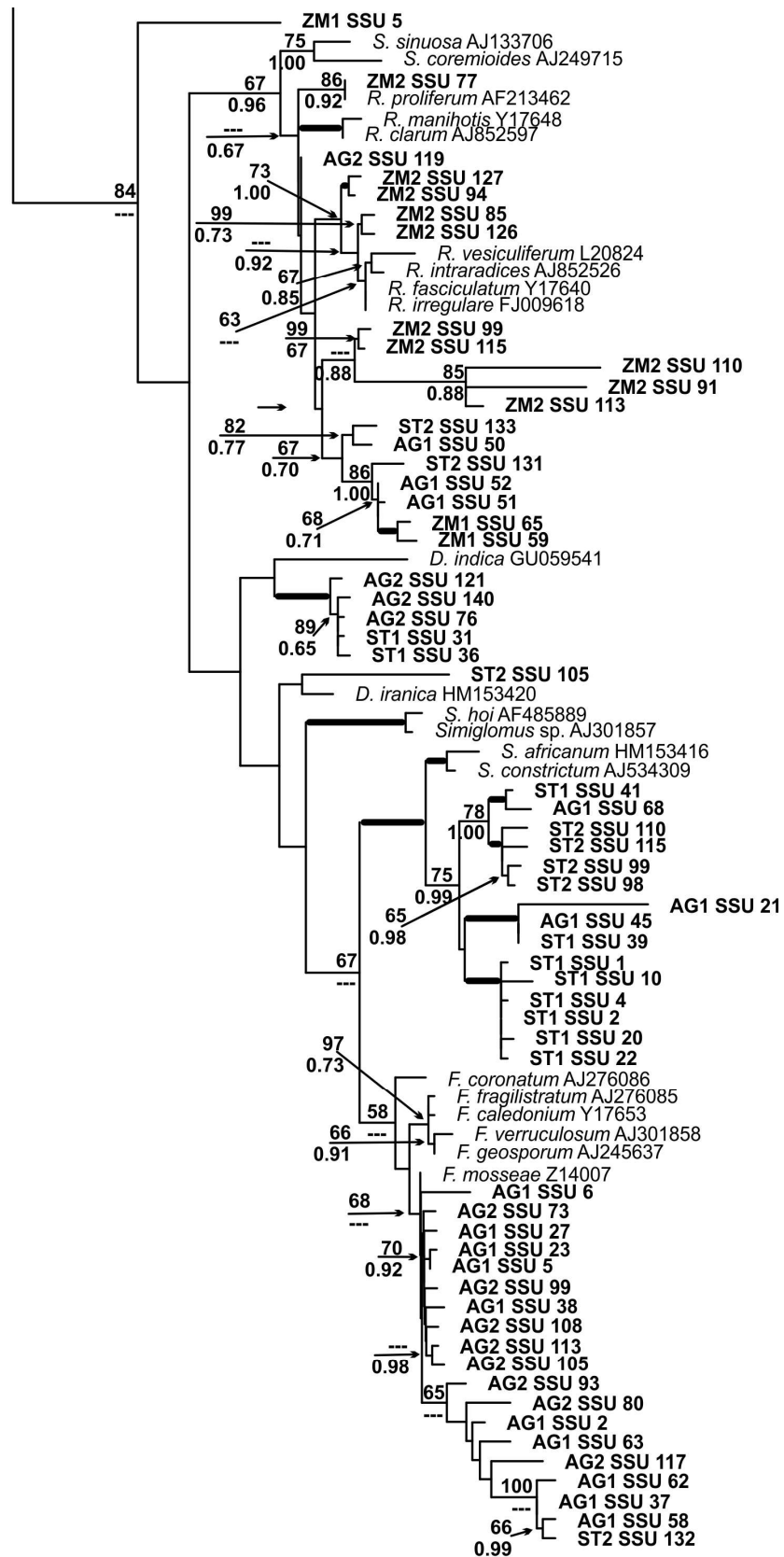


Figura 6. Posicionamento dos clones em relação as espécies de Glomeromycota, gerada a partir de análises de sequências parciais do SSU rDNA. Valores de suporte são de máxima verossimilhança (acima dos ramos) e análise bayesiana (abaixo dos ramos). Sequências obtidas nesse estudo estão em negrito. Apenas valores de suporte $\geq 60\%$ são mostrados. Ramos espessos representam clados com ao menos 90% de suporte nas análises. Os códigos para os clones representam: ZM - Zona da Mata, AG - Agreste, ST - Sertão.



0.1

Figura 6. Continuação.

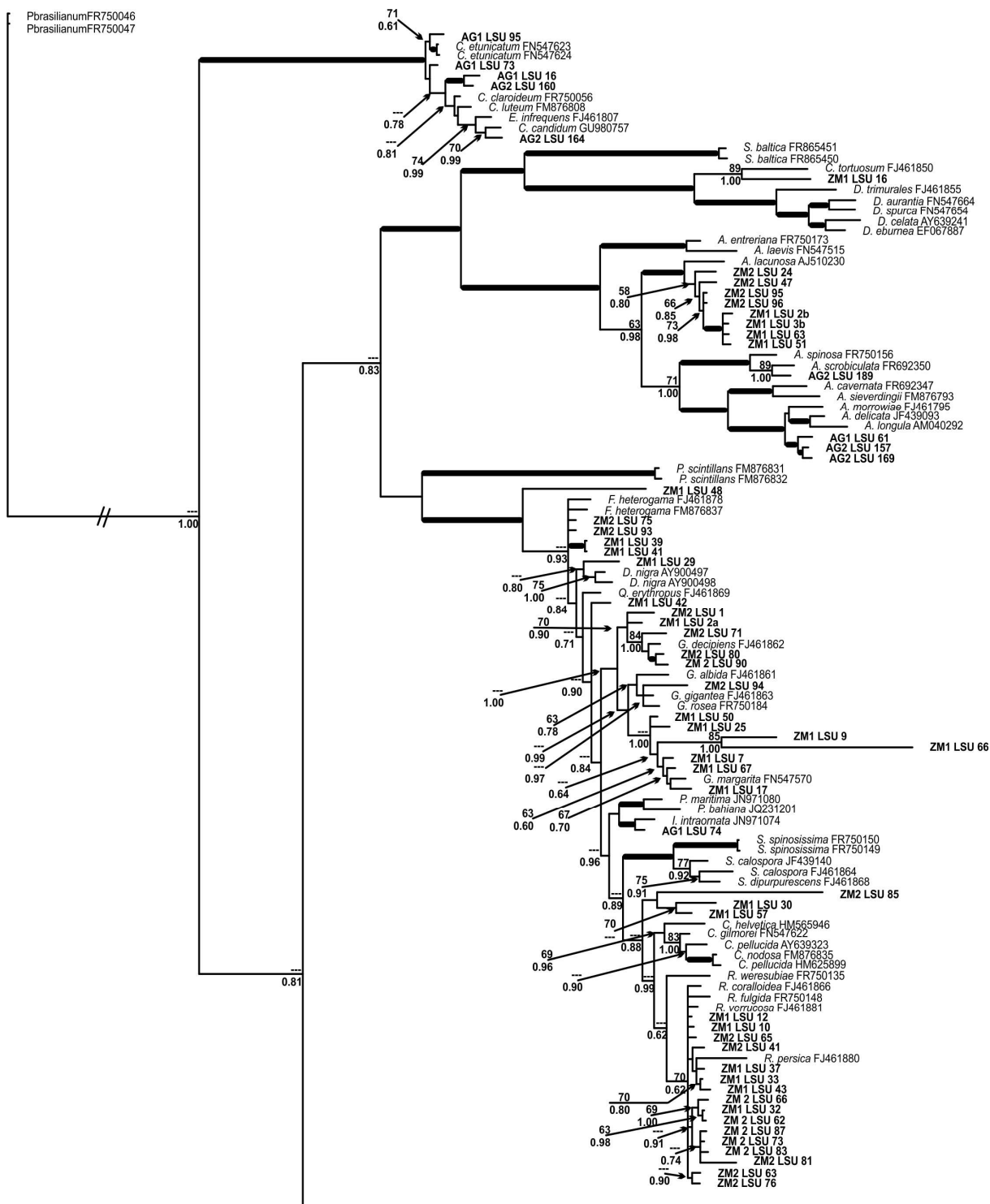
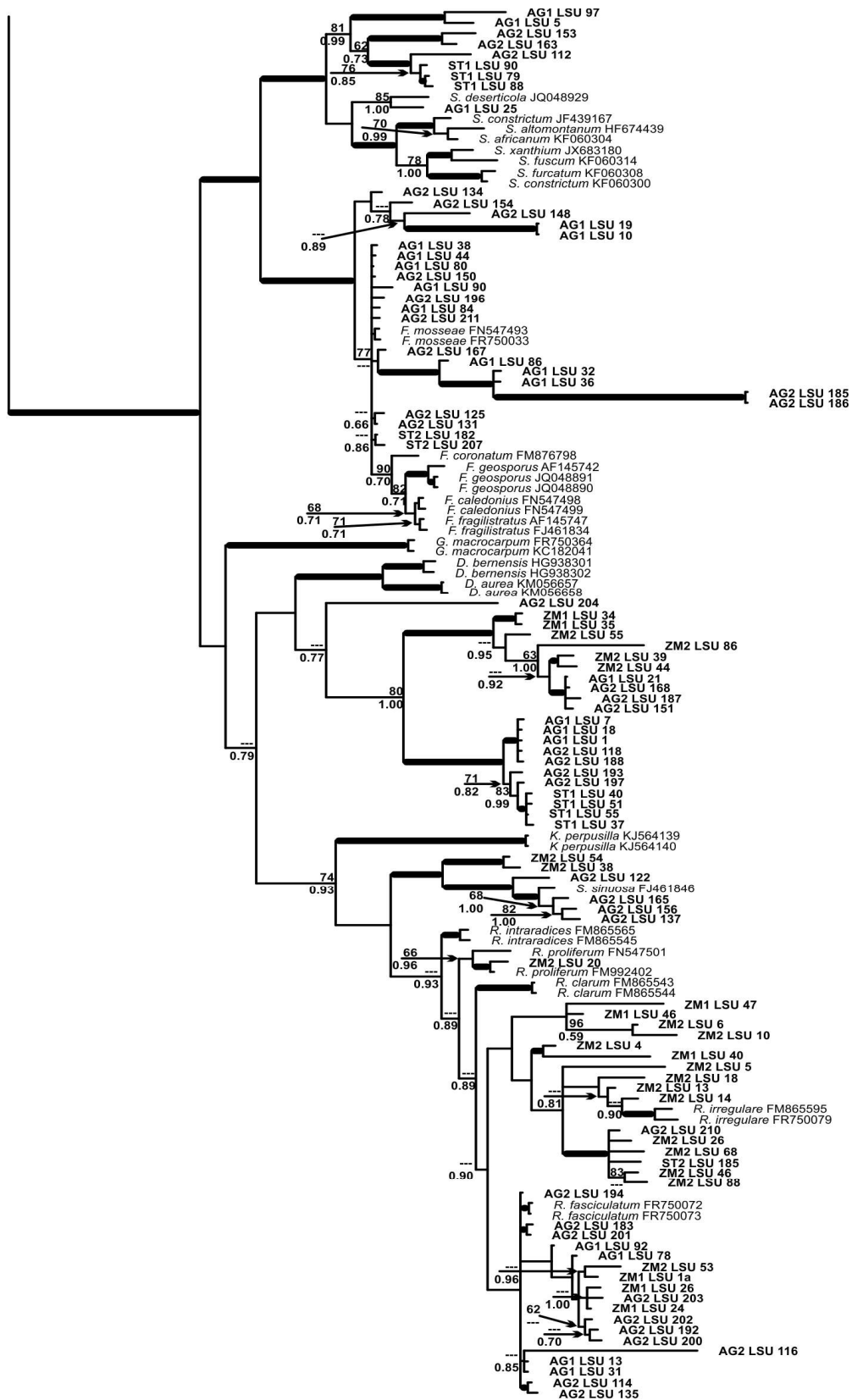


Figura 7. Posicionamento dos clones em relação às espécies de Glomeromycota, gerada a partir de análises de sequências parciais do LSU rDNA. Valores de suporte são de máxima verossimilhança (acima dos ramos) e análise bayesiana (abaixo dos ramos). Sequências obtidas nesse estudo estão em negrito. Apenas valores de suporte $\geq 60\%$ são mostrados. Ramos espessos representam clados com ao menos 90% de suporte nas análises. Os códigos para os clones representam: ZM - Zona da Mata, AG - Agreste, ST - Sertão.



0.1

Figura 7. Continuação.

6. Discussão

Houve grande variação no número total de glomerosporos de FMA nas três áreas. Em outros estudos realizados em áreas cultivadas no Brasil o número de glomerosporos variou de 26 a 276 100g solo⁻¹ (MAIA; TRUFEM, 1990; SOUSA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014) e em outros locais cultivados com cana-de-açúcar, na Índia (118 a 582 esporos 100g solo⁻¹) e com diferentes usos do solo, na Europa (200 a 6000 esporos 100g solo⁻¹) (SIVAKUMAR, 2013; OEHL et al., 2003, 2010). Provavelmente variações em número de glomerosporos ocorrem porque as comunidades de FMA que habitam agrossistemas apresentam padrões de esporulação temporais (PANWAR et al., 2011).

Na área de mata, mais úmida (Igarassu) havia menor número de glomerosporos que nas demais áreas, confirmando outros dados em área de mata, onde o número de glomerosporos geralmente é baixo variando de 7,8 a 308 100g solo⁻¹ (AIDAR et al., 2004; STÜRMER et al., 2006; BONFIM et al., 2013). Em regiões semiáridas esses valores costumam ser maiores, 100 a 1280 esporos 100g solo⁻¹ (SOUZA et al., 2003; MELLO et al., 2012; SHI et al., 2006; ZHAO; ZHAO, 2007). As condições ambientais encontradas nas regiões semiáridas, quente e seca, podem favorecer a esporulação (CARDOSO et al., 2003); de acordo com Lovelock et al. (2003), nessas condições os esporos de FMA são menos susceptíveis à predação e ao parasitismo. Foi demonstrado elevado número de esporos em solos de mata, com cultivo (PEREIRA et al., 2014); usualmente em solos de mata, com vegetação bem estabelecida, em clímax, os fungos podem gastar mais energia para o crescimento micelial do que para a produção de esporos (STÜRMER; SIQUEIRA, 2011). No entanto, com os cultivos a estratégia de vida dos FMA pode ser modificada, sendo priorizada a esporulação.

Em média, a colonização foi baixa (3,9 a 29,5%), quando comparada a trabalhos realizados por Carrenho et al. (2002, 2007) onde a colonização máxima para o milho chegou a 50,8%. As menores quantidades de vesículas, arbúsculos e hifas foram encontradas nos locais mais secos. Os resultados estão de acordo com os de Zhu et al. (2012) e Celebi et al. (2010), os quais afirmam que em áreas mais secas a colonização micorrízica pode diminuir. Elevados níveis de fósforo, como ocorreu nas três áreas, e micronutrientes também afetam negativamente a colonização micorrízica (LIU et al., 2000). Os níveis de fósforo nas áreas mais secas (Passira e Serra Talhada) foram bem maiores que aqueles encontrados em Igarassu, embora sem diferença estatística (80 e 120 mg dm⁻³, respectivamente). Outros

trabalhos comprovam que as plantas e os nutrientes disponíveis no solo afetam a abundância de FMA e a colonização das raízes (HE et al., 2002).

O número de espécies de FMA encontrado neste trabalho (43) foi próximo ao referido no Nordeste do Brasil em ecossistemas naturais (SILVA et al., 2014) e em áreas sob diferentes usos do solo (PEREIRA et al., 2014), ambos com 50 táxons. Solos alterados por atividade humana podem ter menor diversidade que os naturais (LUMINI et al., 2010); além disso, diferenças de esforço amostral para detectar as espécies de FMA podem influenciar o resultado com relação ao número de táxons encontrados (SILVA et al., 2014). Em estudos na rizosfera de milho, o número de espécies tem variado de 10 a 19 (MAIA ; TRUFEM, 1990; CARRENHO et al., 2002; OEHL et al., 2003; WANG et al., 2009; GONZÁLEZ-CORTÉS et al., 2012; SOUSA et al., 2013), mas no presente trabalho, em duas das três áreas o número de táxons foi superior (24 em Igarassu e 27 em Passira), corroborando dados registrados por Tian et al. (2011) na China, onde 27 táxons foram encontrados. O milho possui menor seletividade que amendoim e sorgo para espécies de FMA, possibilitando ampla propagação desses organismos em suas raízes, o que faz com que uma rica e variada comunidade se desenvolva (CARRENHO et al., 2002).

A área de Passira apresentou maior riqueza de espécies em relação às outras áreas; possivelmente a alta diversidade de FMA pode ser explicada devido às condições quente e seca no local, onde alta temperatura e elevada intensidade luminosa podem favorecer a esporulação (CARDOSO et al., 2003; KOIDE; MOSSE, 2004). Condições climáticas semelhantes são encontradas na área de Serra Talhada, a qual apresentou o menor número de táxons, entretanto o alto nível de P (130 mg dm^{-3} solo) e as condições ambientais mais severas podem ter influenciado negativamente o desenvolvimento dos FMA. Quantidades de P acima de 100 mg dm^{-3} solo inibem a formação da associação micorrízica e seus propágulos (LIU et al., 2000; KARANIKI et al., 2008), o que possivelmente interferiu no desenvolvimento dos FMA. Em Igarassu, foi registrado número maior de táxons (24). Cada fungo possui sua própria demanda por fotossintatos e as condições ambientais podem afetar a interação desses organismos com as raízes, influenciando indiretamente a atividade reprodutiva do fungo (PEARSON; SCHWEIGER, 1993).

Algumas das espécies registradas como dominantes (*Funneliformis mosseae*, *S. sinuosa*, *Gigaspora decipiens* e *G. margarita*) nas áreas estudadas têm se mostrado comuns e/ou generalistas em diversos ambientes (OEHL et al., 2003, 2005, 2010; SIVAKUMAR, 2013; WANG et al., 2009; de SOUZA et al., 2010; TIAN et al., 2011; JEFWA et al., 2012;

PEREIRA et al., 2014). Distinções entre as comunidades de FMA em diferentes locais e ambientes podem ser explicadas por fatores ambientais (GOSLING et al., 2013), e a região geográfica também pode ter forte efeito sobre a composição das comunidades de FMA, maior, inclusive, do que o uso da terra (GONZÁLEZ-CORTÉS et al., 2012).

Em todas as áreas predominaram espécies de *Acaulospora* e *Glomus*. Esses gêneros se destacam em áreas de vegetação nativa, no semiárido (SOUSA et al., 2014; SILVA et al., 2014; MELLO et al., 2012), em áreas de mata (AIDAR et al., 2004; STÜRMER et al., 2006; BONFIM et al., 2013) e sob diferentes usos do solo (OEHL et al., 2003; JEFWA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). *Acaulospora* e *Glomus* são comuns e adaptados a diferentes características de solos e ecossistemas (BONFIM et al., 2013), toleram ampla variação de pH (MAIA; TRUFEM, 1990), têm grande número de espécies conhecidas e os propágulos formados durante a colonização promovem alta infectividade, contribuindo para o sucesso desses táxons (HART; READER, 2002).

Acaulospora morrowiae, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *Ambispora appendicula*, *Cetraspora pellucida*, *Gigaspora margarita*, *G. macrocarpum* e *S. sinuosa* são comuns nos diferentes ambientes brasileiros, desde florestas a agrossistemas (de SOUZA et al., 2010). Muitas das espécies encontradas no presente trabalho também foram consideradas comuns de acordo com a classificação de Zhang et al. (2004), corroborando resultados com relação à plasticidade e adaptação de táxons de FMA (ZANGARO; MOREIRA, 2010).

Esporos de alguns táxons foram encontrados apenas na primeira coleta (ver tabela 3) enquanto outros como *Acaulospora laevis*, *Glomus* sp. 5, *Paraglomus pernambucanum*, *Racocetra coralloidea* e *Septoglomus constrictum* foram observados apenas na segunda coleta. De acordo com Oehl et al. (2009), alguns grupos de *Glomus* necessitam de mais de um período vegetativo para começar a esporular, e podem ser considerados representantes de fase tardia de sucessão, enquanto espécies de *Acaulospora* esporularam nas primeiras estações de crescimento e posteriormente diminuem drasticamente a esporulação. Isso significa que os FMA apresentam esporulação com dinâmica temporal (OEHL et al., 2009). A monocultura de milho representa forte perturbação na sobrevivência de espécies de FMA (OEHL et al., 2009), o que induz a produção frequente de propágulos como garantia de sobrevivência (CARRENHO et al., 2010) favorecendo os gêneros citados.

As diferenças na riqueza de espécies de FMA para as áreas de Igarassu e Serra Talhada entre os períodos de coleta demonstram que pode existir uma dinâmica da população

de FMA em áreas agrícolas, com alterações relacionadas também à idade do hospedeiro (TIAN et al., 2011).

Os primers AML1-AML2 são indicados para amplificar parte da região do SSU rDNA de muitos grupos de Glomeromycota, incluindo *Archaeospora* e *Paraglomus* (LEE et al., 2008), enquanto o primer AM1 não detecta sequências desses dois gêneros (ALGUACIL et al., 2008; REDECKER, 2000). No presente trabalho foram utilizados os primers AML1-AML2 para amplificar parte do SSU rDNA, sendo possível detectar quatro das cinco ordens de Glomeromycota e confirmar as afirmações citadas, já que foi encontrada uma sequência de *Paraglomus* nas raízes do milho. Utilizando os primers LR1-28G2 para amplificar parte do LSU rDNA, três ordens foram detectadas. Alguns autores têm usado esses primers com sucesso para amplificação de espécies de Paraglomerales e outros grupos de Glomeromycota (SILVA et al., 2006; BORRIELLO et al., 2012; MELLO et al., 2013).

O número de clones relacionados a espécies de Glomeromycota (59% para o LSU rDNA) foi baixo, se comparado ao obtido em pesquisa realizada na Europa em áreas com plantação de milho, onde a porcentagem de sequências relacionadas ao filo chegou a 94% para essa região (BORRIELLO et al., 2012). Apesar da obtenção de menor porcentagem de sequências relacionadas aos FMA (LSU rDNA), foi possível observar maior diversidade molecular. Enquanto no trabalho de Borriello et al. (2012) foram registrados apenas representantes de *Glomus*, *Diversispora* e *Gigaspora*, neste trabalho foram encontrados táxons de ao menos 16 gêneros de FMA: *Acaulospora*, *Claroideoglomus*, *Corymbiglomus*, *Dentiscutata*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Funneliformis*, *Fuscutata*, *Gigaspora*, *Intraornatospora*, *Paraglomus*, *Racocetra*, *Redeckera*, *Rhizoglomus*, *Sclerocystis* e *Septoglomus*. Normalmente em regiões tropicais, mesmo em solos manejados, a diversidade de FMA é maior que em solos temperados (CARDOSO et al., 2010).

Também se observou maior número de clones relacionados aos representantes de Glomeraceae, como relatado por outros autores (HEMPEL et al., 2007; BORRIELLO et al., 2012; WETZEL et al., 2014). A predominância de espécies de Glomeraceae na maioria dos estudos indica que esse grupo apresenta ampla capacidade de tolerância e adaptação a condições de estresse, podendo ser encontrados em uma extensa faixa de habitats, tanto naturais como agrícolas (ÖPIK et al., 2006). Dentre os representantes dessa família, sequências de *Rhizoglomus* se destacaram para o LSU rDNA; espécies desse gênero foram predominantes tanto em raízes como no solo (LUMINI et al., 2010), sugerindo que possuem um estilo de vida generalista e ruderal (JANSA et al., 2003; ÖPIK et al., 2006). No presente

trabalho, espécies de *Rhizoglyphus* não foram observadas esporulando, sendo encontradas apenas colonizando as raízes.

A idade da planta é fator importante para diferenciação da estrutura das comunidades de FMA (HIJRI et al., 2006), mas Beauregard et al. (2013) não observaram diferenças na comunidade desses fungos entre os estágios de crescimento dos vegetais. Esses autores afirmam que raízes e solo hospedam comunidades de FMA distintas e que não se alteram ao longo do tempo. Nossos dados refutam a essa última afirmação. A comunidade de FMA observada nas raízes do milho no presente trabalho sofreu alteração entre os períodos de coleta. Sendo observada maior riqueza desses fungos na primeira coleta para as áreas de Igarassu e Serra Talhada. Com relação a diversidade, apenas em Igarassu o índice de Shannon foi significativamente diferente entre a primeira e a segunda coleta.

De acordo com Boriello et al. (2012), a presença de *R. fulva* estaria associada com amostras de solo fertilizado. No presente trabalho foram encontrados vários clones relacionados a *R. fulva* na área de Igarassu, entretanto não podemos confirmar se essa espécie está realmente associada a solos fertilizados, uma vez que o solo de Passira também foi fertilizado e *R. fulva* não foi encontrada.

Algumas espécies e gêneros observados a partir da análise morfológica do solo da rizosfera do milho, não foram encontradas nas raízes, enquanto outras só foram identificadas através de sequências. O número de espécies de FMA detectados morfológicamente é geralmente maior do que aquele encontrado no interior das raízes; além disso, nem todos os táxons presentes como esporos são detectados por PCR nas raízes, ou porque não estão simbioticamente ativos ou porque colonizam raízes em níveis baixos, não sendo possível a detecção (HIJRI et al., 2006). Assim, estudos morfológicos juntamente com moleculares auxiliam na identificação dos FMA presentes no solo e raízes de plantas, uma vez que cada técnica contribui para suprir a deficiência de amostragem da outra (REDECKER et al., 2003).

7. Conclusões

Os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* são dominantes nos solos analisados, cujos atributos físicos e químicos determinam a distribuição das comunidades de FMA.

O estágio fenológico também pode influenciar a diversidade e riqueza de FMA juntamente com fatores edafoclimáticos.

A comunidade de FMA encontrada nas raízes (a partir de métodos moleculares) foi diferente daquela registrada no solo (a partir de análises morfológicas), o que confirma que análises moleculares complementam e possibilitam um estudo mais acurado desse trabalho.

As espécies presentes na rizosfera do milho, mas não detectadas nas raízes, podem estar colonizando outras plantas (ervas daninhas) ou apresentando baixa colonização no milho.

Algumas espécies presentes nas raízes podem não estar esporulando e dessa forma não podem ser detectadas pela análise morfológica de glomerosporos.

Para identificação mais acurada de FMA, análises moleculares devem complementar as morfológicas.

REFERÊNCIAS

- ABBASSIAN, A. **Text prepared for the competitive commercial agriculture in Sub-Saharan Africa (CCAA) study**. Maize International Market Profile. The World Bank - The United Nations Food and Agriculture Organization. 2007.
- AIDAR, M.P.M.; CARRENHO, R.; JOLY, C.A. Aspects of arbuscular mycorrhizal fungi in an Atlantic forest chronosequence in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 4, p. 1–15, 2004.
- ALARCÓN, A.; PÉREZ-MORENO, J.; FERRERA-CERRATO, R. Mycorrhizae in tropical agriculture. In: HAMEL, C. & OLENCHETTE, C. (eds.). **Mycorrhizae in crop production**. New York, Haworth Food & Agricultural Products Press, p. 197-238, 2007.
- ALBUQUERQUE, P.P. **Diversidade de Glomeromycetes e atividade microbiana em solos sob vegetação nativa do semi-árido de Pernambuco**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. 2008.
- ALGUACIL, M.M.; LUMINI, E.; ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCÍA, J.R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. **Ecological Applications**, v. 18, p. 527–536, 2008.
- ALTIERI, M.A.; NICHOLLS, C.I. **Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture**. University of California, Berkeley. 277p. ISBN 968-7913. 2000.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPTON, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANDRADE, S.A.L.; MAZZAFERA, P.; SCHIAVINATO, M.A.; SILVEIRA, A.P.D. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. **Journal of Agricultural Science**, v. 147, p. 105-115, 2009.
- APPOLONI, S.; LEKBERG, Y.; TERCEK, M.T.; ZABINSKI, C.A.; REDECKER, D. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). **Microbial Ecology**, v. 56, p. 649-659, 2008.
- AQUINO, S.S. **Associação micorrízica arbuscular com genótipos de milho**. Dissertação. UNESP. Ilha Solteira. 2003.
- AYRES, M.; AYRES, Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. 2007.

- BALAKRISHNAN, N.; SUBRAMANIAN, K.S. Mycorrhizal symbiosis and bioavailability of micronutrients in maize grain. **Maydica**, v. 57, p. 129-138, 2012.
- BEAUREGARD, M.S.; GAUTHIER, M.-P.; HAMEL, C.; ZHANG, T.; WELACKY, T.; TAN, C.S.; ST-ARNAUD, M. Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize–soybean rotation system. **Mycorrhiza**, v. 23, p.143–154, 2013.
- BETTIOL, W; GHINI, R. **Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Proteção de plantas na agricultura sustentável.** Eds: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. UFRPE, Imprensa Universitária, Recife, 368 p. 2001.
- BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; STÜRMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: A gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, v. 71, p. 7-14, 2013.
- BORBA, M.F., AMORIM, S.M.C. Fungos micorrízicos arbusculares em sempre-vivas: subsídio para cultivo e replantio em áreas degradadas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, p. 20-27, 2007.
- BORRIELLO, R.; LUMINI, E.; GIRLANDA, M.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields as determined by molecular techniques. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 911-922, 2012.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/05/valor-da-producao-de-lavouras-de-2012-e-de-rs-211-bilhoes>> Acesso em: 23 maio 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário 2011-2012 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Política Agrícola. – Brasília : Mapa/SPA, 2011a. 92 p.
- BROWER, J.E.; ZAR, J.H. Community similarity. In: Brower, J.E.; Zar, J.H.; von Ende, C.N. (Eds.). **Field and laboratory methods for general ecology**, 3 ed., Dubuque: W.C. Brown Publishers. 1984.
- BRUNDRETT, M.C.; JASPER, D.A.; ASHWATH, N. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. II. The effect of nutrient levels and host species on the isolation of fungi. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 315–321, 1999.
- CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; BARETTA, C.R.D.M.; PAULA, A.M. **Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas.** In:

- SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: UFLA, 2010. p. 153-214.
- CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 58, p. 33-43, 2003.
- CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R.; SILVA, E.S. The effect of different soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of peanuts, sorghum and maize. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 723-730, 2007.
- CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agroecosystem. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 93-101, 2002.
- CARRENHO, R.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. **Fungos micorrízicos arbusculares em agroecossistemas brasileiros**. In: SIQUEIRA, J.O., de SOUZA, F.A., CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M. (Eds.). Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: UFLA, 2010, p. 215–249.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; SANTOS, V.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 1099-1106, 2002.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; SANTOS, V.F. Mycorrhizal dependency of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fruits**, v. 56, p. 317-324, 2001.
- CELEBI, S.Z.; DEMIR, S.; CELEBI, R.; DURAK, E.D.; YILMAZ, I.H. The effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) applications on the silage maize (*Zea mays* L.) yield in different irrigation regimes. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 302-305, 2010.
- CESARO, P.; VAN TUINEN, D.; COPETTA, A.; CHATAGNIER, O.; BERTA, G.; GIANINAZZI, S.; LINGUA, G. Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5776–5783, 2008.
- CHEN, X.; TANG, J.; ZHI, G.; HU, S. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 259–269, 2005.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 1 - Safra 2013/14, n. 2 - Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-66. 2013.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** v. 2 - Safra 2014/15, n. 7 - Sétimo Levantamento, Brasília, p. 1-100. 2015.

COSTA, C.M.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; GOTO, B.T.; SANTOS, V.F.; MAIA, L.C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 225-232, 2005.

COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; NOGUEIRA, R.J.M.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 893-901, 2001.

COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 40–44, 2013.

CPRM - Serviço Geológico do Brasil. 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Mascarenhas, J.C., Beltrão, B.A., Souza Junior, L.C., Galvão, M.J.T.G., Pereira, S.N., Miranda, J.L.F. (Orgs.). Recife: CPRM/PRODEEM, 11 p.

CRESTANA, S., SOUSA, I.S.F. **Agricultura tropical no Brasil.** In: ALBUQUERQUE, A.C. S., SILVA, A.G. (Eds). Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Embrapa, Brasília, v. 1, p 41-66, 2008.

DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 203-209, 2001.

de SOUZA, F.A.; STURMER, S.L.; CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: Siqueira, J.O., de Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (eds.). **Micorrizas: 30 anos de Pesquisas no Brasil.** Lavras, UFLA, 2010, pp. 15-73.

DOUDS Jr., DD.; MILLNER, PD. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 77–93, 1999.

FARMER, M.J.; LI, X.; FENG, G.; ZHAO, B.; CHATAGNIER, O.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; VAN TUINEN, D. Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 599–609, 2007.

FIESP. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Departamento de Agronegócios, Boletins informativos. **Safra Mundial de Milho.** Disponível em: <<http://az545403.vo>

.msecnd.net/uploads/2015/03/boletim_safra-mundial-milho_marco2015.pdf> Acesso em: 05 maio 2015.

FREITAS, F.O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays* L.) e feijão (*Phaseolos vulgaris* L.)**. Tese de Doutorado. USP (Universidade de São Paulo), Piracicaba, 144p. 2001.

GAI, J.P.; CHRISTIE, P.; CAI, X.B.; FAN, J.Q.; ZHANG, J.L.; FENG, G.; LI, X.L. Occurrence and distribution of arbuscular mycorrhizal fungal species in three types of grassland community of the Tibetan Plateau. **Ecological Research**, v. 24, p. 1345–1350, 2009.

GAMPER, H.A.; WALKER, C.; SCHUSSLER, A. *Diversispora celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 182, p. 495-506, 2009.

GAZETA DO POVO. Disponível em: <<http://agro.gazetadopovo.com.br/noticias/agricultura/soja-sul-americana-domina-dois-tercos-do-comercio-global/>> Acesso em: 22 dez 2013.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, p 235- 244, 1964.

GIANINAZZI, S.; GOLLOTTE, A.; BINET, M.N.; VAN TUINEN, D.; REDECKER, D.; WIPF, D. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. **Mycorrhiza**, v. 20, p. 519–530, 2010.

GONZÁLEZ-CORTÉS, J.C.; VEGA-FRAGA, M.; VARELA-FREGOSO, L.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M.; CARREÓN-ABUD, Y.; GAVITO, M.E. Arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities and land use change: the conversion of temperate forests to avocado plantations and maize fields in central Mexico. **Fungal Ecology**, v. 5, p. 16-23, 2012.

GOSLING, P.; MEAD, A.; PROCTOR, M.; HAMMOND, J.P.; BENDING, G.D. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. **New Phytologist**, v. 198, p. 546–556, 2013.

GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G.; BENDING, G.D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 113, p. 17–35, 2006.

- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p 696-704, 2003.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMMER, O.; HARTER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9, 2001.
- HART, M.M.; READER, R.L. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 153, p. 335–344, 2002.
- HE, X.; MOURATOV, S.; STEINBERGER, Y. Temporal and spatial dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under the canopy of *Zygophyllum dumosum* Boiss. in the Negev Desert. **Journal of Arid Environment**, v. 52, p. 379–387, 2002.
- HIGO, M.; ISOBE, K.; YAMAGUCHI, M.; DRIJBER, R.A.; JESKE, E.S.; ISHII, R. Diversity and vertical distribution of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi under two soybean rotational systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 1085–1096, 2013.
- HIJRI, I.; SYKOROVÁ, Z.; OEHL, F.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A.; REDECKER, D. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2277–2289, 2006.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php?uf=26> Acesso em: 29 abr 2011.
- JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. **Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant–soil ecosystems**. In: HOCK B (ed). The Mycota. Vol IX: fungal associations, Springer, Berlin Heidelberg New York, p 95–113. 2001.
- JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K.; BAREA, J.M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, p. 1–16, 2003.
- JEFWA, J.M.; OKOTH, S.; WACHIRA, P.; KARANJA, N.; KAHINDI, J.; NJUGUINI, S.; ICHAMI, S.; MUNG'ATU, J.; OKOTH, P.; HUISING, J. Impact of land use types and farming practices on occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) Taita-Taveta district in Kenya. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 157, p. 32– 39, 2012.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

- KARANIKA, E.D.; VOULGARIA, O.K.; MAMOLOSA, A.P.; ALIFRAGISB, D.A.; VERESOGLOUA, D.S. Arbuscular mycorrhizal fungi in northern Greece and influence of soil resources on their colonization. **Pedobiologia**, v. 51, p. 409-418, 2008.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 170, p. 75-86, 1995.
- KOHOUT, P.; SUDOVÁ, R.; JANOUSKOVÁ, M.; CTVRTLÍKOVÁ, M.; HEJDA, M.; PÁNKOVÁ, H.; SLAVÍKOVÁ, R.; STAJEROVÁ, K.; VOSÁTKA, M.; SÝKOROVÁ, Z. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 68, p. 482-493, 2014.
- KOIDE, R.T.; MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, v. 14, p. 145-163, 2004.
- KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, p. 259–263, 2006.
- KRÜGER, M.; STOCKINGER, H.; KRÜGER, C.; SCHÜSSLER, A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 183, p. 212-223, 2009.
- KRUSKAL, J.B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. **Psychometrika**, v. 29, p. 115–129, 1964.
- KURAMAE, E.E.; VERBRUGGEN, E.; HILLEKENS, R.; HOLLANDER, M.; ROLING, W.F.M.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KOWALCHUK, G.A. Tracking fungal community responses to maize plants by DNA- and RNA-based pyrosequencing. **PLOS ONE**, v. 8, p. e69973, 2013.
- LANDIS, F.C.; GARGAS, A.; GIVNISH, T.J. Relationships among arbuscular mycorrhizal fungi, vascular plants and environmental conditions in oak savannas. **New Phytologist**, v. 164, p. 493–504, 2004.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LEE, J.; LEE, S.; YOUNG, J.P.W. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, p. 339-349, 2008.

LEHMAN, R.M.; TAHERI, W.I.; OSBORNE, S.L.; BUYER, J.S.; DOUDS Jr, D.D. Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 300–304, 2012.

LIN, X.; FENG, Y.; ZHANG, H.; CHEN, R.; WANG, J.; ZHANG, J.; CHU, H. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 5764–5771, 2012.

LINS, C.E.L.; CAVALCANTE, U.M.T.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MESSIAS, A.S.; MAIA, L.C. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit in a copper contaminated area. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 181-185, 2006.

LINS, C.E.L.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; SAMPAIO, E.V.S.B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, v. 31, p. 355-363, 2007.

LIU, A.; HAMEL, C.; HAMILTON, R.I.; MA, B.L.; SMITH, D.L. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. **Mycorrhiza** v. 9, p. 331-336, 2000.

LOVELOCK, C.E.; ANDERSEN, K.; MORTON, J.B. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. **Oecologia**, v. 135, p. 268–279, 2003.

LUMINI, E.; ORGIAZZI, A.; BORRIELLO, R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2165–2179, 2010.

MAIA, L.C.; TRUFEM, S.F.B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 89-95, 1990.

MAROUELLI, R.P. **O desenvolvimento sustentável da agricultura no cerrado brasileiro**. Monografia. ISEA-FGV/ ECOBUSINESS SCHOOL. Brasília, DF, 2003.

MATOS, R.M.B.; DA SILVA, E.M.R.; BERBARA, R.L.L. **Biodiversidade e índices**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 20p. Embrapa-CNPAB, Documentos, 107, 1999.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD. ISBN 978-85-7139-994-5 (Editora UNESP), 2010.

MEHROTRA, V.S. **Mycorrhiza role and appications**. Allied Publishers, New Delhi, 2005.

MELLO, C.M.A.; SILVA, I.R.; PONTES, J.S.; GOTO, B.T.; SILVA, G.A.; MAIA, L.C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 938-943, 2012.

MILNE, I.; WRIGHT, F.; ROWE, G.; MARSHAL, D.F.; HUSMEIER, D.; MCGUIRE, G. TOPALi: Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. **Bioinformatics**, v. 20, p. 1806-1807, 2004.

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

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 134, p. 257-268, 2009.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; RIS, E.-A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. **New Phytologist**, v. 165, p. 273-283, 2005.

OEHL, F., SIEVERDING, E., INEICHEN, K., MÄDER, P., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2816-2824, 2003.

OLSSON, P.A.; THINGSTRUP, I.; JAKOBSEN, I.; BAATH, F. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 1879-1887, 1999.

ÖPIK, M; MOORA, M; LIIRA, J; ZOBEL, M. Composition of rootcolonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 778–790, 2006.

PANWAR, V.; MEGHVANSI, M.K.; SIDDIQUI, S. Short-term temporal variation in sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and physico-chemical edaphic properties of wheat rhizosphere. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 247-254, 2011.

- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. **Melhoramento do milho**. In: Melhoramento de espécies cultivadas. Aluizio Borém (ed.). Viçosa: Editora UFV, 969p, 2005.
- PATREZE, C.M.; MOREIRA, M.; TSAI, S.M. **Advances in molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota) in forest ecosystems**. In: Juan A. Blanco; Yueh-Hsin Lo. (Org.). Forest Ecosystems - More than Just Trees. Rijeka: InTech, p. 53-80, 2012.
- PEARSON, J.N.; SCHWEIGER, P. *Scutellopora calospora* (Nicol & Gerd.) Walter & Sanders associated with subterranean clover: dynamics of colonization, sporulation and soluble carbohydrates. **New Phytologist**, v. 124, p. 215-219, 1993.
- PEIXOTO, C.M. **O milho: O rei dos cereais - da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas**. Seed News A revista internacional de sementes. <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtml>> Acesso em: 21 jan 2013, 2002.
- PEREIRA, C.M.R.; SILVA, D.K.A.; FERREIRA, A.C.A.; GOTO, B.T.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 185, p. 245-252, 2014.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, v. 10, p. 73-80, 2000.
- REDECKER, D.; HIJRI, I.; WIEMKEN, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. **Folia Geobotanica**, v. 38, p. 113-124, 2003.
- REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacer of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1756-1761, 1997.
- RIVERA, A.A.C. **Análise agronômica e econômica de sistemas de produção do milho**. Dissertação, UFLA, Lavras - MG, 2006.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

- ROSENDAHL, S; MCGEE, P.; MORTON, J.B. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4316-4329, 2009.
- ROSENDAHL, S; STUKENBROCK, E.H. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3179–3186, 2004.
- SANTIAGO, A.L.C.M.A.; HOFFMANN, K.; LIMA, D.X.; OLIVEIRA, R.J.V.; VIEIRA, H.E.E.; MALOSSO, E.; MAIA, L.C.; SILVA, G.A. A new species of Lichtheimia (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from Brazilian soil. **Mycological Progress**, v. 13, p. 343–352, 2014.
- SANTILLI, J.F.R. **Agrobiodiversidade e direitos dos agricultores**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Direito da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 409 pg, 2009.
- SCHALAMUK, S.; CABELLO, M. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. **Mycologia**, v. 102, p. 261–268, 2010.
- SCHUESSLER, A.; SCHWARZOTT, H.D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, p. 1413-1421, 2001.
- SHARMAH, D.; JHA, D.K.; PANDEY, R.R. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. **Journal of Phytology**, v. 2, p. 75-90, 2010.
- SHI, P., ABBOTT, L.K., BANNING, N.C., ZHAO, B. Comparison of morphological and molecular genetic quantification of relative abundance of arbuscular mycorrhizal fungi within roots. **Mycorrhiza**, v. 22, p. 501-513, 2012.
- SHI, Z.Y.; FENG, G.; CHRISTIE, P.; LI, X.L. Arbuscular mycorrhizal status of spring ephemerals in the desert ecosystem of Junggar Basin, China. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 269-275, 2006.
- SILVA, G.A.; LUMINI, E.; MAIA, L.C.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 183-189, 2006.
- SILVA, D.K.A.; SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C. Uso de vermicomposto favorece o crescimento de mudas de gravioleira (*Annona muricata* var. *morada*) associadas a fungos micorrízicos arbusculares. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 863-869, 2008.

SILVA, I.R.; MELLO, C.M.A.; FERREIRA NETO, R.A.; SILVA, D.K.A.; MELO, A.L.; OEHL, F.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along an environmental gradient in the Brazilian semiarid. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 166-175, 2014.

SILVEIRA, A.P.D. **Micorrizas**. In: Cardoso, E.F.B.M., Tsai, S.M., Neves, M.C.P. (coord.). Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, pp. 257-261, 1992.

SIVAKUMAR, N. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 151-160, 2013.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. Academic Press. London, 2008.

SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MAIA, L.C.; OEHL, F.; LIMA, F.S. Arbuscular mycorrhizal fungi in successional stages of caatinga in the semi-arid region of Brazil. **Ciência Florestal**, v. 24, p. 137-148, 2014.

SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; OEHL, F.; MAIA, L.C.; LIMA, F.S. Arbuscular mycorrhizal fungi within agroforestry and traditional land use systems in semi-arid Northeast Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 307-314, 2013.

SOUZA, R.G.; MAIA, L.C.; SALES, M.F.; TRUFEM, S.F.B. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 49-60, 2003.

STOCKINGER, H.; KRÜGER, M.; SCHÜBLER, A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 187, p. 461-474, 2010.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 255-267, 2011.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em ecossistemas brasileiros**. In: Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., Brussaard, L. (orgs.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Ed. UFLA, pp. 557-606, 2008.

STÜRMER, S.L.; KLAUBERG FILHO, O.; QUEIROZ, M.H.; MENDONÇA, M.M. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic Forest in South Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 513-521, 2006.

SUNIL, K.C.P.; SEEMA, H.S.; RAJKUMAR, H.G. Occurrence and distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in agricultural fields of Mysore. **World Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 01-07, 2012.

- TABOSA, J.N.; ENCARNÇÃO, C.R.F.; SOUZA, A.R.; GALLINDO, A.F.T.; SILVA, A.B.; BARROS, A.H.C.; GOMES, R.V. **Agrocaracterização Ambiental das Bases Físicas do IPA Instituto Agrônomo de Pernambuco**. EMPRESA IPA. Recife, 2010.
- TIAN, H; DRIJBER, R.A.; NIU, X.S.; ZHANG, J.L.; LI, X.L. Spatio-temporal dynamics of an indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community in an intensively managed maize agroecosystem in North China. **Applied Soil Ecology**, v. 47, p. 141-152, 2011.
- USDA **FAS Grain**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf>> Acesso em: 28 dez 2014.
- VALLINO, M.; MASSA, N.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V.; BERTA, G.; BONFANTE, P. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 971–983, 2006.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, v. 396, p. 69-72, 1998.
- VAN TUINEN, D.; ZHAO, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. **PCR in studies of AM fungi: from primers to application**. 387–399, in: AK Varma (ed.). Mycorrhizal manual. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1998.
- VERBRUGGEN, E.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; WEEDON, J.T.; KOWALCHUK, G.A.; ROLING, W.F.M. Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 2341–2353, 2012a.
- VERBRUGGEN, E.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; RILLIG, M.C.; KIERS, E.T. Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. **New Phytologist**, v. 197, p. 1104–1109, 2012b.
- WANG, M.Y.; HU, L.B.; WANG, W.H.; LIU, S.T.; LI, M.; LIU, R.J. Influence of long-term fixed fertilization on diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Pedosphere**, v. 19, p. 663–672, 2009.
- WETZEL, K.; SILVA, G.; MATCZINSKI, U.; OEHL, F.; FESTER, T. Superior differentiation of arbuscular mycorrhizal fungal communities from till and no-till plots by morphological spore identification when compared to T-RFLP. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 72, p. 88-96, 2014.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JS,

- White TJ, eds. PCR protocol: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press. p. 315–322, 1990.
- WRIGHT, S.F., UPADHYAYA, A., BUYER, J.S. Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soil by capillary electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1853-1857, 1998.
- YANO-MELO, A.M.; SAGGIN JÚNIOR, O.J.; MAIA, L.C. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. **Agriculture, Ecosystem & Environment**, v. 95, p. 343-348, 2003.
- ZAK, J.C., WILLIG, M.R. **Fungal biodiversity patterns**. In: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (eds.). Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier, Academic Press, London, p. 60-74, 2004.
- ZANGARO, W.; MOREIRA, M. **Micorrizas arbusculares nos biomas Floresta Atlântica e Floresta de Araucária**. In: Siqueira, J.O., de Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (Eds.). Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Editora UFLA, 2010. pp. 279-310.
- ZHANG, Y.; GUI, L.D.; LIU, R.J. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and natural forest land in the subtropical region of Dujiangyan, southwest China. **Plant & Soil**, v. 261, p. 257–263, 2004.
- ZHAO, D.; ZHAO, Z. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. **Applied Soil Ecology**, v. 37, p. 118-128, 2007.
- ZHU, X.C.; SONG, F.B.; LIU, S.Q.; LIU, T.D.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant and Soil Environment**, v. 58, p. 186–191, 2012.

ANEXO A - Artigo a ser enviado para publicação

Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de milho (*Zea mays* L.) ao longo de um gradiente climático no Nordeste do Brasil.

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares ajudam a melhorar a ciclagem da matéria e energia, levando ao aumento na produtividade do solo e beneficiando os agroecossistemas e os ecossistemas naturais. A diversidade desses fungos é influenciada pela intervenção humana, características ecológicas, fatores edáficos, tipo de manejo das culturas e diferenças climáticas. FMA presentes na rizosfera do milho foram identificados em plantações em uma área úmida (Zona da Mata), e em duas semiáridas: seca (Agreste) e mais seca (Sertão), em Pernambuco. As análises incluíram a quantificação de glomerosporos, estimativa do número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA, identificação de espécies, e avaliações ecológicas das comunidades de FMA. A análise morfológica dos glomerosporos permitiu a diferenciação de 57 espécies de FMA, das quais duas novas para a ciência. Maior densidade de esporos ocorreu na área com umidade intermediária, que teve menor riqueza de espécies de FMA, sendo a maior riqueza registrada na área mais úmida (zona da mata). As áreas com maior diversidade foram a mata e o sertão. O NMP de propágulos infectivos não diferiu entre as áreas. A estrutura das comunidades de FMA diferiu entre os locais devido às diferenças nos atributos químicos e granulométricos dos solos segundo o teste de procedimento de permutação multi-resposta (MRPP). Solos cultivados com milho, em Pernambuco, abrigam expressiva diversidade de FMA e os fatores edafoclimáticos contribuem para a ocorrência e a distribuição das espécies.

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota (Schüßler et al., 2001), formam a mais ampla simbiose entre fungos e plantas na natureza (Smith & Read, 2008). Através da rede de hifas externas os fungos captam nutrientes e água do solo, transferindo-os à planta hospedeira e esta fornece substrato energético ao fungo. Assim, o micélio funciona como extensão da raiz, e a planta torna-se capaz de explorar maior volume de solo.

Além de aumentar a capacidade produtiva e diminuir custos, os FMA ajudam a melhorar a ciclagem da matéria e energia, levando ao aumento na produtividade do solo e beneficiando os agroecossistemas (Lin et al., 2012) e os ecossistemas naturais. Em sistemas de produção agrícola os FMA possuem a capacidade de suplementar o fósforo disponível de forma eficiente para as plantas (Lehman et al., 2012). Ajudam também na estabilidade edáfica porque promovem a agregação das partículas do solo e a retenção de água através da rede micelial e produção de glomalina (Gianinazzi et al., 2010). Constituindo um grupo funcional

chave da biota do solo, por suas atividades nutricionais e não nutricionais, os FMA influenciam e contribuem para os serviços ecossistêmicos (Gianinazzi et al., 2010).

Os principais fatores que afetam a diversidade de FMA são a intervenção humana, características ecológicas, fatores edáficos (pH, teores de umidade, fósforo e disponibilidade de nitrogênio) (Beauregard et al., 2013; Gosling et al., 2013; Ji et al., 2012; Lumini et al., 2010; van der Heijden et al., 1998), tipo de manejo das culturas (Higo et al., 2013) e diferenças climáticas (Lekberg et al., 2007). Fatores como práticas culturais e tipo de vegetação também contribuem para determinar a predominância de um determinado táxon de FMA (Sivakumar, 2013).

Foram testadas as hipóteses de que: (a) a diversidade de FMA e a estrutura das comunidades diferem em locais com diferentes condições climáticas; (b) as propriedades do solo influenciam a comunidade de FMA em áreas com o mesmo tipo de plantio. O objetivo deste trabalho foi determinar a riqueza de espécies de FMA, a diversidade e composição da comunidade em plantios de milho ao longo de um gradiente climático em uma zona úmida, uma zona seca e outra mais seca.

Material e Métodos

Áreas de estudo

O estudo foi realizado em áreas cultivadas com milho da variedade BR 5026 "São José" (Lemos et al., 1995) em estações experimentais do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, nos municípios de Itambé (7°24'50"S e 35°06'30"W) – zona da mata, Caruaru (08°34'38" S e 38°00'00" W) – agreste, e Serra Talhada (07°59'00"S e 38°19'16"W) – sertão pernambucano, caracterizando um gradiente climático. A primeira área apresenta elevada umidade (zona da mata) enquanto as demais estão localizadas na região semiárida e caracterizadas como seca (agreste) e mais seca (sertão).

Itambé está localizado na mesorregião da Zona da Mata e na microrregião Mata Setentrional do estado de Pernambuco, formada por maciços e outeiros altos, variando entre 650 e 1.000 metros de altitude. O clima é tropical chuvoso (tipo As' de Köppen-Geiger; Kottek et al., 2006) quente e úmido com verão seco. A estação chuvosa inicia-se em fevereiro e termina em setembro, podendo se estender até outubro. A temperatura média anual é 24°C, com umidade relativa do ar de 80%. Os solos são do tipo Argissolos (CPRM 2005; Tabosa et al., 2010).

Caruaru está localizado no agreste do Estado, em altitude de 537 m. O clima é tropical semiárido (tipo BShs' de Köppen-Geiger; Kottek et al., 2006), com verão seco. A estação chuvosa inicia-se em março e termina em junho, com chuva melhor distribuída. A temperatura média anual é 23°C, com umidade relativa do ar de 59%. Os solos são do tipo Planossolos (CPRM 2005; Tabosa et al., 2010).

O município de Serra Talhada encontra-se a 500 m de altitude e está inserido na unidade geoambiental da Depressão Sertaneja, na mesorregião do sertão Pernambucano; o relevo predominante é plano e suave-ondulado, cortado por vales estreitos, com vertentes dissecadas (CPRM 2005; Tabosa et al., 2010). O clima é tropical semiárido, com chuvas de verão (tipo Bsh de Köppen-Geiger; Kottek et al., 2006). O período chuvoso se inicia em novembro com término em abril, este último mês com chuvas mais concentradas. A temperatura média anual é 24,5 °C, com umidade relativa média de 52% e os solos predominantes são Argissolos (Tabosa et al., 2010).

Nas áreas de plantio o trato cultural foi o convencional, com revolvimento de camadas superficiais para reduzir a compactação, incorporar corretivos e fertilizantes e elevar a permeabilidade e o armazenamento de ar e água. O solo de Serra Talhada foi adubado com sulfato de amônia (como cobertura), Caruaru e Itambé com adubação mineral 60N-60P-20K kg/ha e 90N-90P-60K kg/ha, respectivamente.

Coleta

Em cada área de plantio (1000 m²) foi estabelecido um quadrante (20 x 20 m) onde 16 amostras compostas (4 sub-amostras) de solo da rizosfera (0-20 cm de profundidade) foram coletadas em 2010 no mês de março (Itambé) e 2011 no mês de julho e abril, respectivamente (Caruaru e Serra Talhada) no período de maturação das culturas que em geral ocorre 120 dias após o plantio. O material foi acondicionado em sacos plásticos, transportado para o laboratório e armazenado em temperatura ambiente (27 °C) até o processamento. Parte do solo foi utilizado para análise físico-química (Tabela 1), realizada no LabFert (Recife, PE) e na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e o restante usado para as análises micorrízicas. A precipitação nas áreas, nos anos de coleta, está representada na figura 1.

Tabela 1. Análise química e granulométrica do solo das áreas plantadas com milho, nos municípios de: Itambé (IT), Caruaru (CA) e Serra Talhada (ST), Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, respectivamente.

Áreas	mg dm ⁻³					cmolc dm ⁻³				
	pH	Fe	Cu	Zn	Mn	P	K	Na	Al	Ca
IT	5,5b	191,5a	0,8a	1,2a	24,0a	3,3b	0,2c	0,07a	0,5a	2,1b
CA	6,4a	65,2b	1,2a	1,5a	22,5b	49,4a	0,4b	0,01b	0,1b	4,5a
ST	6,3a	55,2b	0,8a	1,0a	14,8b	58,0a	0,6a	0,01b	0,1b	4,1a

Áreas	cmolc dm ⁻³		%		Composição granulométrica %				Classe Textural
	Mg	H	V	C	AG	AF	Silte	Argila	
IT	0,7b	2,3a	51,5b	2,0a	39,0b	31,0b	20,0a	11,0a	FA
CA	1,4a	1,0b	85,0a	1,1b	47,8a	24,3c	20,0a	8,0a	FA
ST	1,2a	1,2b	81,9a	0,7c	28,0c	49,0a	13,3b	9,8a	FA

AG= areia grossa; AF= areia fina; FA= franco-arenosa. *fósforo disponível pelo método extrator de Mehlich1. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

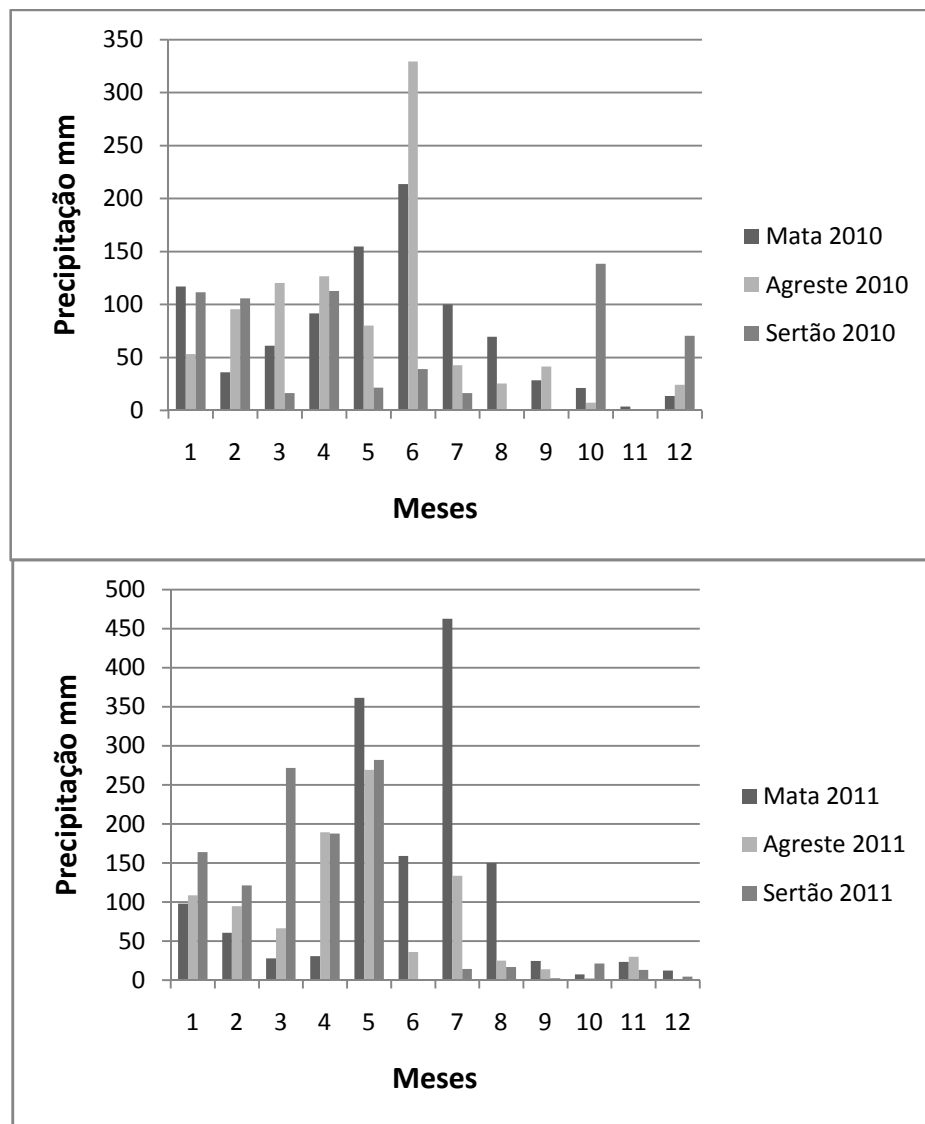


Figura 1. Precipitação nas áreas de coleta, Itambé (mês de março - Mata), Caruaru (julho - Agreste) e Serra Talhada (abril - Sertão), com plantio de milho estudadas no estado de Pernambuco.

Extração e quantificação de glomerosporos e identificação das espécies de FMA

Glomerosporos foram isolados e as espécies identificadas a partir das 16 amostras de solo rizosférico de cada área de coleta e a partir do segundo ciclo das culturas armadilha. Glomerosporos foram extraídos de 100 g de solo seco pelas técnicas de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson 1964), seguida por centrifugação em água e em sacarose (Jenkins 1964) e quantificados em placa canaletada, em estereomicroscópio (40 x). Os esporocarpos foram contados como uma unidade. Os glomerosporos foram montados em lâminas com polivinil lacto-glicerol (PVLG) e PVLG + reagente de Melzer (Brundrett et al., 1994), examinados em microscópio e as espécies identificadas após consulta ao manual de

identificação de FMA (Schenck & Pérez 1990; Blaszkowski 2012), website do INVAM e descrições recentes dos FMA.

Número Mais Provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA

O NMP de propágulos infectivos de FMA foi estimado de acordo com o método de Feldmann & Idczak (1992). Foram realizadas diluições sucessivas (1:10, 1:100 e 1:1000) e o solo não diluído (0), utilizando areia lavada como diluente para o solo-inóculo. Para cada diluição foram usadas cinco repetições, totalizando 20 potes por área amostrada. O milho foi usado como planta isca. Após um mês em casa de vegetação, as plântulas foram colhidas, as raízes lavadas, diafanizadas, coradas com azul de tripano (Phillips & Hayman 1970) e observadas ao microscópio para verificação da presença de associação micorrízica. O NMP de propágulos infectivos de FMA (cm^{-3}) no solo foi estimado comparando-se os resultados com os dados da tabela de Cochran (1950).

Avaliações da comunidade de FMA e análises estatísticas

Para medidas ecológicas de diversidade dos FMA nas áreas de estudo foram utilizadas: riqueza de espécies, abundância relativa, frequência de isolamento, equitabilidade e índice de diversidade de Shannon. A riqueza de espécies representou o número de espécies de FMA ocorrentes em cada área estudada. A abundância relativa foi definida como o número de glomerosporos de um gênero ou espécie em particular, dividido pelo número total de glomerosporos, multiplicado por 100. A frequência de isolamento foi calculada como a percentagem de amostras a partir das quais foram isolados os glomerosporos de um grupo taxonômico particular. De acordo com a frequência de isolamento (IF), as espécies foram divididas em quatro categorias: dominantes ($D = IF > 50\%$), muito comuns ($MC = 30\% < IF \leq 50\%$), comuns ($C = 10\% < IF \leq 30\%$) e raras ($R = IF \leq 10\%$), segundo Zhang et al. (2004). A diversidade dentro da comunidade de FMA e a equitabilidade foram refletidas pelo índice de diversidade de Shannon onde: Índice de Shannon (H') = $-\sum (Pi \ln[Pi])$; onde $Pi = ni/N$, ni = número de glomerosporos da espécie i , e N = número total de glomerosporos em todas espécies e equitabilidade (J) = $H' / \log s$.

Os dados relativos às variáveis do solo, número de glomerosporos e número mais provável de propágulos infectivos de FMA foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). Os parâmetros de diversidade foram calculados usando o

programa Past (Hammer et al., 2001). Os dados de composição das comunidades de FMA foram ordenados usando a escalonamento multidimensional não métrico (NMS) (Kruskal 1964) e a distância de Sørensen. Foi empregado o teste de procedimento de permutação multi-resposta (MRPP) para determinar se havia diferença entre as comunidades de FMA e se o solo diferia entre as áreas estudadas. Foi construída uma matriz secundária para correlacionar os parâmetros químicos e granulométricos do solo com os dados de composição de comunidades de FMA (matriz primária). A significância das correlações foi estimada consultando o VassarStats (Richard Lowry, 2011-2013, <http://vassar.net/rsig.html>). As análises de NMS, MRPP e Mantel foram realizadas com auxílio do programa PC-ORD versão 5.0 (McCune & Mefford 2006).

Resultados

Os resultados das análises químicas e granulométricas e a análise multivariada empregando 18 atributos dos solos revelaram variação estatística entre os solos dos locais de amostragem (Tabela 1). O solo da área de zona da mata (Itambé) apresentou elevada concentração de Fe ($191,5 \text{ mg dm}^{-3}$) e os menores valores de pH (5,5) e de P ($3,3 \text{ mg dm}^{-3}$). Os solos do semiárido (Caruaru e Serra Talhada) apresentaram quantidades maiores de P, variando de $49,4 \text{ mg dm}^{-3}$ em Caruaru a 58 mg dm^{-3} em Serra Talhada.

Este estudo possibilitou o registro de 57 táxons e a descrição de duas novas espécies para a ciência: *Fuscutata aurea* (Mello et al., 2012a), registrada em solo da Zona da Mata e *Paraglomus pernambucanum* (Mello et al., 2013), nas áreas do Agreste e do Sertão. Do total, identificaram-se 40 táxons de FMA na Zona da Mata, 24 no Agreste e 30 no Sertão, pertencentes a 19 gêneros. Apenas *Acaulospora*, *Ambispora*, *Glomus*, *Paraglomus* e *Racocetra* foram identificados em todos os locais estudados, sendo *Acaulospora* e *Glomus* os gêneros mais representativos, com 16 e nove táxons, respectivamente (Tabela 2). Quinze morfotipos não puderam ser identificados em nível específico, devido à falta de características morfológicas relevantes para diferenciação.

Oito táxons foram comuns a todos os locais de amostragem: *Acaulospora herrerae*, *A. longula*, *A. scrobiculata*, *Glomus macrocarpum*, *G. microcarpum*, *Glomus* sp.1, *Paraglomus occultum* e *Racocetra coralloidea*. Vinte e sete táxons ocorreram apenas em uma das três áreas, sendo 17 registrados exclusivamente em Itambé, onde dominaram sete espécies (*A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Fuscutata aurea*, *G. macrocarpum*, *P. occultum* e

Racocetra coralloidea). *Acaulospora denticulata* e *A. excavata* foram dominantes no Sertão e comuns no Agreste, mas não ocorreram na Mata. Outras espécies se destacaram: *Ambispora appendicula*, comum no solo de Mata e *A. gerdemannii*, comum no Agreste. Em geral, as espécies apresentaram frequência de isolamento comum e apenas *G. macrocarpum* foi dominante nas três áreas (Tabela 2).

Tabela 2. Abundância relativa (AR%), frequência de isolamento (FI%) e categorias (Cat.) de frequência de espécies de FMA, registradas em áreas cultivadas com milho, nas Zonas da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco.

Lista de espécies	Áreas								
	Mata			Agreste			Sertão		
	AR%	FI%	Cat.	AR%	FI%	Cat.	AR%	FI%	Cat.
<i>Acaulospora delicata</i> C. Walker, C.M. Pfeiff. & Bloss	0,5	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>A. denticulata</i> Sieverd. & S. Toro	0,0	0,0	-	0,2	12,5	C	3,2	62,5	D
<i>A. excavata</i> Ingleby & C. Walker	0,0	0,0	-	0,3	37,5	MC	3,0	62,5	D
<i>A. herrerae</i> Furrázola et al.	0,5	25,0	C	1,2	50,0	MC	0,4	18,7	C
<i>A. koskei</i> Błaszk.	0,1	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>A. longula</i> Spain & N.C. Schenck	5,9	37,5	MC	0,3	25,0	C	34,7	68,7	D
<i>A. mellea</i> Spain & N.C. Schenck	6,6	62,5	D	0,0	0,0	-	0,4	12,5	C
<i>A. morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck	11,1	62,5	D	0,0	0,0	-	0,4	12,5	C
<i>A. rehmi</i> Sieverd. & S. Toro	0,0	0,0	-	0,05	6,2	R	0,0	0,0	-
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	3,4	68,7	D	2,5	56,2	D	0,4	12,5	C
<i>A. sieverdingii</i> Oehl, Sýkorová, Błaszk. & G.A. Silva	0,0	0,0	-	3,5	37,5	MC	0,0	0,0	-
<i>A. spinosa</i> C. Walker & Trappe	0,5	31,2	MC	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>Acaulospora</i> sp.1	0,4	6,2	R	0,2	12,5	C	0,0	0,0	-
<i>Acaulospora</i> sp.2	0,3	6,2	R	0,0	0,0	-	1,4	18,7	C
<i>Acaulospora</i> sp.3	0,2	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>Acaulospora</i> sp.4	0,0	0,0	-	0,1	18,7	C	0,0	0,0	-
<i>Ambispora appendicula</i> (Spain, Sieverd. & N.C. Schenck) C. Walker	0,3	18,7	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>A. gerdemannii</i> (S.L. Rose, B.A. Daniels & Trappe) C. Walker, Vestberg & A. Schüßler	0,0	0,0	-	0,2	18,7	C	0,0	0,0	-
<i>Ambispora</i> sp.	0,7	37,5	MC	2,4	31,2	MC	0,0	0,0	-
<i>Archaeospora trappei</i> (R.N. Ames & Linderman) J.B. Morton & D. Redecker	0,0	0,0	-	3,2	56,2	D	1,2	18,7	C
<i>Cetraspora gilmorei</i> (Trappe & Gerd.) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	0,5	12,5	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>C. pellucida</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	1,2	43,7	MC	0,0	0,0	-	0,1	6,2	R
<i>Claroideoglossum etunicatum</i> (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüssler	0,2	12,5	C	31,0	100,0	D	0,0	0,0	-
<i>Corymbiglossum tortuosum</i> (N.C.	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,1	6,2	R

Schencket G.S. Sm.) Błaszcz. et Chwat										
<i>Dentiscutata biornata</i> (Spain, Sieverd. & S. Toro) Sieverd., F.A. Souza & Oehl	0,4	12,5	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>D. cerradensis</i> (Spain & J. Miranda) Sieverd., F.A. Souza & Oehl	0,3	12,5	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Diversispora versiformis</i> (P. Karst.) Oehl, G.A. Silva & Sieverd.	0,8	12,5	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Diversispora</i> sp.	0,1	6,2	R	0,0	0,0	-	2,0	12,5	C	
<i>Entrophospora infrequens</i> (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid.	0,2	12,5	C	0,2	25,0	C	0,0	0,0	-	
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüssler	0,0	0,0	-	9,7	100,0	D	0,0	0,0	-	
<i>Fuscutata aurea</i> Oehl, C.M. Mello & G.A. Silva	1,5	56,2	D	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>F. heterogama</i> Oehl, F.A. Souza, L.C. Maia & Sieverd.	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,2	12,5	C	
<i>F. savannicola</i> (R.A. Herrera & Ferrer) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	0,1	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Gigaspora decipiens</i> I.R. Hall & L.K. Abbott	0,8	43,7	MC	0,0	0,0	-	0,5	18,7	C	
<i>G. margarita</i> W.N. Becker & I.R. Hall	0,7	31,2	MC	0,0	0,0	-	0,6	25,0	C	
<i>Gigaspora</i> sp.	0,1	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Glomus brohultii</i> Sieverd. & R.A. Herrera	7,9	12,5	C	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>G. macrocarpum</i> Tul. & C. Tul.	39,4	87,5	D	4,4	87,5	D	3,8	62,5	D	
<i>G. microcarpum</i> Tul. & C. Tul.	2,7	50,0	MC	0,1	6,2	R	0,8	6,2	R	
<i>Glomus</i> sp.1	0,1	25,0	C	1,3	31,2	MC	2,0	18,7	C	
<i>Glomus</i> sp.2	0,7	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Glomus</i> sp.3	0,8	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>Glomus</i> sp.4	0,0	0,0	-	23,9	93,7	D	10,9	75,0	D	
<i>Glomus</i> sp.5	0,5	12,5	C	0,0	0,0	-	3,7	25,0	C	
<i>Glomus</i> sp.6	0,5	12,5	C	0,0	0,0	-	0,9	6,2	R	
<i>Paraglomus bolivianum</i> (Sieverd. & Oehl) Oehl & G.A. Silva	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,8	25,0	C	
<i>P. occultum</i> (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker	4,1	68,7	D	5,0	50,0	MC	3,0	31,2	MC	
<i>P. pernambucanum</i> Oehl, C.M. Mello, Magna & G.A. Silva	0,0	0,0	-	2,5	62,5	D	0,1	6,2	R	
<i>Paraglomus</i> sp.	0,0	0,0	-	6,9	62,5	D	0,0	0,0	-	
<i>Racocetra coralloidea</i> (Trappe, Gerd. & I. Ho) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	2,2	56,2	D	0,3	25,0	C	6,0	81,2	D	
<i>R. fulgida</i> (Koske & C. Walker) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	0,2	12,5	C	0,0	0,0	-	12,7	75,0	D	
<i>R. tropicana</i> Oehl, B.T. Goto & G.A. Silva	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,3	12,5	C	
<i>Rhizoglomus clarum</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl	0,9	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	
<i>R. intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl	2,8	43,7	MC	0,0	0,0	-	6,2	62,5	D	
<i>Sclerocystis sinuosa</i> (Gerd. & B.K. Bakshi) R.T. Almeida & N.C. Schenck	0,0	0,0	-	0,4	37,5	MC	0,4	12,5	C	

Tabela 2. Continuação.

Lista de espécies	Áreas								
	Mata			Agreste			Sertão		
	AR%	FI%	Cat.	AR%	FI%	Cat.	AR%	FI%	Cat.
<i>Scutellospora</i> sp.	0,1	6,2	R	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
<i>Septoglomus constrictum</i> (Trappe) Sieverd., G.A. Silva & Oehl	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,2	12,5	C
Total táxons	40			24			30		

D= Espécies dominantes; MC= espécies muito comuns; C= espécies comuns; R= espécies raras.

Maior riqueza e menor equitabilidade de espécies de FMA foram registradas na área da Zona da Mata (40 táxons), em comparação com as áreas do Agreste (24) e do Sertão (30). A densidade de esporos (2,6 g solo⁻¹) foi maior no cultivo do Agreste, enquanto o NMP de propágulos infectivos de FMA não diferiu entre as áreas de coleta (Tabela 3).

A área do Agreste apresentou a menor diversidade de espécies de FMA, com base no índice de Shannon e não houve diferença na diversidade entre as outras duas áreas (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de riqueza (R); equitabilidade (J'); diversidade (H'); número de glomerosporos e número mais provável de propágulos (NMP) infectivos de FMA em áreas cultivadas com milho, representando um gradiente edafoclimático de mais úmido (Mata) para mais seco (Agreste e Sertão), no estado de Pernambuco.

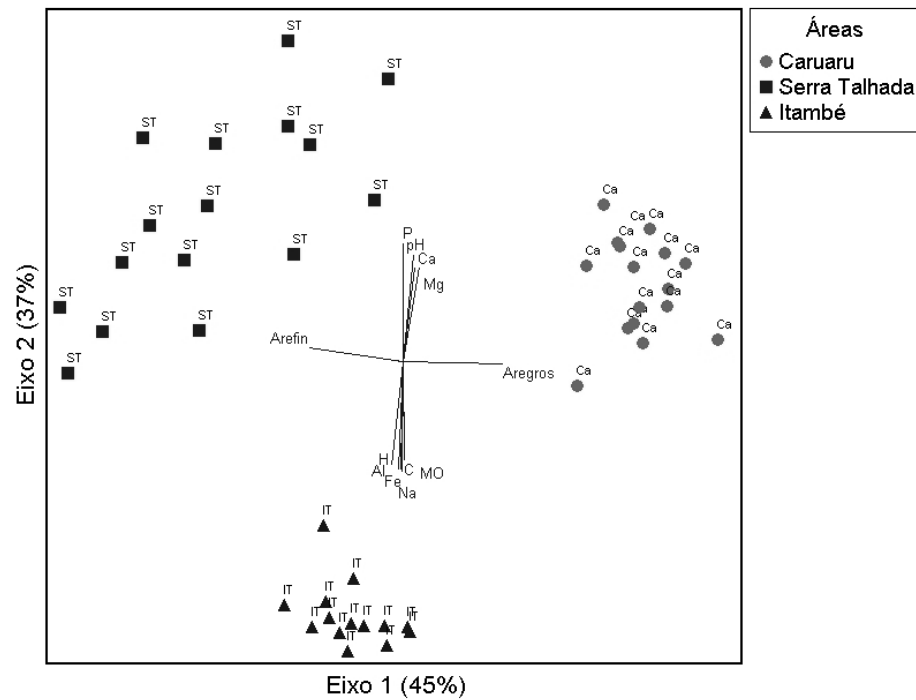
Áreas	Índices diversidade			Nº esporos (g solo ⁻¹)	NMP (cm ⁻³)
	R	J'	H'		
Mata (Itambé)	40a	0,6b	2,4a	1,4b	139a
Agreste (Caruaru)	24b	0,7a	2,2b	2,6a	160a
Sertão (Serra Talhada)	30b	0,7a	2,4a	1,0b	162a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A estrutura da comunidade diferiu estatisticamente entre os locais estudados com base no teste MRPP ($p \leq 0,1$). Os solos da área do Sertão apresentaram maior similaridade de FMA com os solos das áreas de Mata (55%) e do Agreste (52%) do que os solos dessas duas últimas áreas entre si (38%). Com base no escalonamento multidimensional não métrico foi possível representar 82% do total da variância dos dados, explicados em 45% pelo eixo 1 e em 37% pelo eixo 2 (Figura 2).

O teste de Mantel revelou correlação significativa ($p \leq 1\%$) entre a matriz primária (composição das comunidades de FMA) e secundária (fatores químicos e granulométricos do

223 solo). Os 18 atributos edáficos avaliados foram significativamente correlacionados com
224 alguns dos eixos do NMS; apenas sete não se correlacionaram com o eixo 1 (Fe, P, K, Na, Al,
225 C, M.O.) e três propriedades edáficas (Zn, areia grossa e argila) não se correlacionaram com o
226 eixo 2 (Tabela 4).



227
228 **Figura 2.** Estrutura da comunidade de FMA, de acordo com a ordenação do escalonamento
229 multidimensional não métrico (NMS), registradas em áreas cultivadas com milho, nas Zonas
230 da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco.

231
232 **Tabela 4.** Coeficientes de correlação entre variáveis do solo e escores dos Eixos 1 e 2 de
233 ordenação (Figura 2).

Variáveis	Coeficientes de Correlação	
	Eixo 1– NMS	Eixo 2 – NMS
Fe	-0,11ns	-0,92***
Cu	0,53***	0,33*
Zn	0,50***	0,03ns
Mn	0,50***	-0,51***
P	0,05ns	0,95***
pH	0,29*	0,90***
K	-0,18ns	0,79***
Na	-0,14ns	-0,91***
Al	-0,19ns	-0,91***
Ca	0,30*	0,85***
Mg	0,36**	0,85***
H	-0,30*	-0,89***
C	0,12ns	-0,87***
M.O.	0,12ns	-0,87***

Areia grossa	0,87***	-0,16ns
Areia fina	-0,85***	0,32*
Silte	0,63***	-0,62***
Argila	-0,28*	-0,23ns

ns: não significativo; *significativo a 5%; ** significativo a 1%; *** significativo a 0,1%; M.O.: matéria orgânica do solo.

Discussão

O estudo sobre a diversidade de FMA associada a uma mesma espécie cultivada, o milho, ao longo de um gradiente desde a Zona da Mata, mais úmida, até o sertão, área mais seca do Estado, é importante para o entendimento da composição das comunidades de Glomeromycota em áreas cultivadas. A riqueza de FMA foi alta (57) quando comparada a estudos prévios nas mesmas mesorregiões, como o de Maia & Trufem (1990), que identificaram 16 táxons de FMA em culturas de milho no estado de Pernambuco, com maior diversidade na Zona da Mata e diminuição em relação ao interior, mais seco como ocorreu também no presente estudo. Os trabalhos mais recentes em geral mencionam maior número de táxons que os das décadas passadas pelo fato de hoje existirem mais espécies de FMA.

Trabalhos em áreas cultivadas com milho no Brasil, México, Estados Unidos, Europa Central e China registraram entre seis e 25 espécies de FMA (Berch et al., 1989; Carrenho et al., 2001; Galvez et al., 2001; Oehl et al., 2003, 2005; Wang et al., 2009), número menor que no presente trabalho, sendo observado que os fatores edáficos e os tratos culturais afetaram negativamente o número de espécies encontradas.

A riqueza de FMA registrada nas três áreas cultivadas com milho neste trabalho representa 72% dos táxons citados em agrossistemas brasileiros, considerando levantamento realizado por Carrenho et al. (2010). Essa elevada riqueza pode estar relacionada às características climáticas e ambientais, ao estágio de desenvolvimento da planta (Zangaro & Moreira 2010; Smith & Read 2008) e ao trato cultural empregado (Carrenho et al., 2010). Maiores esporulações de FMA em geral ocorrem no final da fase reprodutiva do hospedeiro vegetal (Gomes-da-Costa, apud Carrenho et al., 2010) e no presente trabalho a coleta de solo rizosférico foi realizada no final do ciclo de desenvolvimento das plantas o que pode ter permitido a esporulação de mais espécies, facilitando a identificação. Embora o trato agrícola convencional promova constante desequilíbrio no desenvolvimento dos FMA (Alguacil et al., 2008; Carrenho et al., 2010; Oehl et al., 2010), é possível que no presente caso não tenha afetado a comunidade de FMA nas áreas estudadas, podendo, ao contrário, ter favorecido

espécies que são hábeis em se propagar por fragmentos de hifas ou raízes colonizadas, a exemplo das espécies de *Glomus*.

A predominância de espécies de *Glomus* e *Acaulospora* é comum, pois esses gêneros estão adaptados a diversas condições ambientais (Zhao & Zhao 2007; Oehl et al., 2010). Como os seus representantes, na maioria, produzem esporos pequenos e têm crescimento rápido e ampla distribuição geográfica, apresentam maior facilidade de propagação e mais possibilidades de sobrevivência em sistemas perturbados (Zhao & Zhao 2007). Os dados confirmam que solos agrícolas são mais colonizados por espécies de *Glomus* (Schalamuk & Cabello 2010; Beauregard et al., 2013).

Muitas das espécies presentes nos locais de coleta são comuns em agrossistemas brasileiros (Maia & Trufem 1990; Beneditti et al., 2005; de Souza et al., 2010). Doze dessas são classificadas como generalistas (*Acaulospora mellea*, *A. rehunii*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *Ambispora appendicula*, *Cetraspora pellucida*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora margarita*, *Rhizoglomus clarum*, *G. macrocarpum*, *S. sinuosa* e *Paraglomus occultum*) por serem pouco afetadas por mudanças ambientais (de Souza et al., 2010; Moreira & Siqueira, 2006; Oehl et al., 2003). *Archaeospora trappei*, *F. mosseae*, *R. intraradices* e *S. constrictum* também são de ocorrência generalizada (Oehl et al., 2003; 2010), enquanto *F. mosseae* e *C. etunicatum* apresentam rápida esporulação e são comuns em solos agrícolas (Oehl et al., 2003; de Souza et al. 2010).

Glomus macrocarpum apresenta grande produção de esporos e alta adaptabilidade, independentemente das condições do solo (Caproni et al., 2003), corroborando o observado no presente trabalho. *Funneliformis mosseae* tem distribuição global, o que possivelmente favorece o sucesso desse táxon em condições de agricultura (Rosendahl et al., 2009), mas isso não se confirmou no presente trabalho uma vez que esse táxon foi registrado apenas em solo do agreste.

A presença de oito táxons comuns a todos os locais de amostragem demonstra a amplitude de distribuição dessas espécies. Por outro lado, o fato da maioria (27) das espécies ser restrita apenas a uma das três áreas indica que as características ambientais selecionam táxons mais adaptados a determinadas condições. A presença de novas espécies comprova a diversidade ainda desconhecida de FMA presente na região, mesmo em áreas sob estresse, como as do semiárido e as cultivadas.

A elevada exclusividade de espécies de FMA (17 táxons exclusivos na Mata) e a diferença na abundância de esporos explicam a distinta composição das comunidades entre as

áreas, evidenciada na análise multivariada, o que pode ser consequência das diferenças significativas entre os solos das três áreas. Esses resultados mostram a importância das características particulares dos locais estudados; embora o hospedeiro vegetal tenha sido o mesmo, as condições edáficas e climáticas eram distintas. Alguns pesquisadores também observaram a influência do solo sobre a composição das comunidades de FMA, destacando que os fatores abióticos influenciam mais na ocorrência das espécies de FMA do que os hospedeiros vegetais (Mohammad *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2012).

Tem sido observado que a fertilização em longo prazo altera a riqueza de gêneros de FMA, e a adição de NPK faz com que a proporção de Acaulosporaceae e Gigasporaceae diminua no solo (Lin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009), enquanto são registradas mais espécies de *Glomus* (Beauregard *et al.*, 2013). No presente trabalho foram identificadas mais espécies de *Acaulospora* que *Glomus*, contrariando a afirmativa citada, possivelmente esse táxon é adaptado a diferentes características de solos e ecossistemas (Bonfim *et al.*, 2013).

Os dados indicam diminuição da riqueza de FMA da Zona da Mata para o interior do Estado, o que foi também observado por Maia & Trufem (1990) e de acordo com esses autores as condições ecológicas das regiões (úmida e semiárida) favorecem esse fenômeno. Em regiões semiáridas da Namíbia o regime de precipitação e a umidade influenciaram positivamente a composição das comunidades de FMA (Uhlmann *et al.*, 2006).

Em ambientes abandonados por aproximadamente 10 anos após cultivo de milho (Ramos-Zapata *et al.*, 2011) ocorre indução à produção de propágulos de FMA como garantia de sobrevivência (Carrenho *et al.*, 2010). Em solos cultivados, nos Estados Unidos, o número de propágulos de FMA é normalmente baixo (1,18 propágulos de FMA cm⁻³ solo) (Lehman *et al.*, 2012). No presente estudo o NMP de propágulos infectivos de FMA não variou entre as áreas e foi maior (média de 153 propágulos cm⁻³) do que o registrado por Lehman *et al.* (2012), demonstrando quanto é variável a produção de propágulos por esses fungos. Como é um solo agrícola que recebe continuamente ciclos de preparo, plantio e colheita, isso faz com que esses solos estejam em desequilíbrio, ocasionando a produção constante de propágulos para sobrevivências dos FMA.

Semelhante ao observado no presente estudo, Maia & Trufem (1990) registraram no máximo 2,5 esporos g⁻¹ de solo em áreas cultivadas com milho, em Pernambuco, enquanto na Paraíba foram encontrados até 39 esporos g⁻¹ de solo em áreas cultivadas com milho e feijão (Sousa *et al.*, 2013). No Rio Grande do Sul, em plantios de milho após uso de plantas de cobertura do solo, Beneditti *et al.* (2005) observaram apenas 1,5 esporos g⁻¹ de solo. Em

cultivos de milho, na China, Tian et al. (2011) registraram 0,6 a 2,1 esporos g^{-1} solo e na Europa Oehl et al. (2003) encontraram 8 esporos g^{-1} solo, resultados superiores aos do presente trabalho. Confirma-se que a formação de glomerosporos é altamente variável, dependendo da espécie de FMA, da planta hospedeira e de fatores ambientais (Oehl et al., 2003). De modo geral, a estação e o estágio de desenvolvimento da cultura influenciam aumentando ou diminuindo a esporulação das espécies (Sivakumar 2013), o que explica as variações de densidade de esporos registradas na rizosfera de culturas com o mesmo vegetal. Além dos fatores citados, os FMA podem apresentar estratégias diferenciadas na produção de glomerosporos, dependendo das condições edafoclimáticas ao qual estejam submetidos.

Como observado na análise de solo, as áreas mais secas (Serra Talhada e Caruaru) apresentaram maior concentração de P que a mais úmida (Itambé), que apresentou alto nível de Fe. Em quantidades elevadas, o fósforo e metais, como o ferro podem prejudicar a produção de propágulos micorrízicos (Covacevich et al., 2006; Sieverding 1991). Altas concentrações desses minerais diminuem a esporulação, afetando a riqueza de FMA (Verbruggen et al., 2012; Isobe et al., 2007; Hijri et al., 2006). A interação entre a fertilização e a combinação de diferentes elementos do solo podem influenciar o desenvolvimento dos FMA, principalmente sob condições de cultivo diversas (Wang et al., 2009). Neste trabalho não foi possível determinar se o Fe teve influência sobre a riqueza de FMA, entretanto em áreas com baixo pH e altas concentrações de Fe ocorre a formação de um complexo do Fe com o P, o que reduz a disponibilidade de P (Sieverding 1991); na área mais úmida (Itambé) foi observada alta concentração de Fe e baixo pH, o que possivelmente influenciou na disponibilidade de P, já que essa área apresenta a menor concentração de P, em relação as demais. Tanto os atributos químicos, quanto os físicos influenciaram a população de FMA, como é indicado pelos dados da figura 2, com a granulometria separando as comunidades de FMA das áreas do semiárido (Sertão e Agreste), enquanto os atributos químicos foram fundamentais para separar esses fungos da Zona da Mata, mais úmida.

As variações de pH do solo podem alterar a concentração de muitos nutrientes e íons tóxicos no solo e assim afetar o desenvolvimento e função dos FMA (Sivakumar, 2013). O pH pode ter sido um dos atributos determinantes da maior diversidade de FMA na Zona da Mata em relação às outras áreas.

Foi registrada maior diversidade de FMA, com base no índice de Shannon, na área mais úmida (Itambé) e na mais seca (Serra Talhada). A área de umidade intermediária apresentou a menor diversidade, embora tivesse o maior número de glomerosporos. É

possível que nesse local as poucas espécies ocorrentes estejam bem adaptadas às condições locais e por isso apresentam alta esporulação. Oehl et al. (2005) observaram variação de 1,4 a 1,8 no índice de diversidade de FMA em campos com milho, na Europa. Na China, o índice de diversidade de FMA (Shannon) em áreas cultivadas com milho e trigo foi ainda menor, variando de 0,6 a 1,9 (Wang et al., 2009), enquanto na África a diversidade variou de 1,2 a 2,0, sendo a área plantada com milho mais diversa e mais rica em espécies de FMA do que áreas com outros cultivos (Jefwa et al., 2012). A intensidade das práticas de manejo e a fertilização afetam negativamente a diversidade de FMA (Oehl et al., 2005; Wang et al., 2009; Jefwa et al., 2012). A característica relevante para a alta diversidade observada é que o milho é altamente micotrófico, oferecendo condições para colonização por diversas espécies de FMA e possibilitando o estabelecimento de comunidades mais diversas na rizosfera.

A variação na abundância relativa e na frequência das espécies de FMA nas áreas estudadas é um reflexo da plasticidade e estratégia de adaptação desses fungos a condições adversas (Zangaro & Moreira, 2010), resultando em manutenção ativa da comunidade nos diferentes habitats.

Conclusões

Solos cultivados com milho, em Pernambuco, abrigam diversificada comunidade de FMA que é influenciada pelas características edafoclimáticas do local de plantio.

Referências

- Alguacil, MM, Lumini E, Roldán A, Salinas-García JR, Bonfante P, Bianciotto V. 2008. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecological Applications* 18: 527–536.
- Ayres M, Ayres Jr, Ayres DL, Santos AS. 2007. *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém, Sociedade Civil Mamirauá/CNPq.
- Beauregard MS, Gauthier MP, Hamel C, Zhang T, Welacky T, Tan CS, St-Arnaud M. 2013. Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize–soybean rotation system. *Mycorrhiza* 23:143–154. DOI 10.1007/s00572-012-0459-6
- Beneditti T, Antonioli ZI, Giracca EMN, Steffen RB. 2005. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares na cultura do milho após uso de espécies de plantas de cobertura de solo. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 4: 44-51.

399 Berch SM, Ferrera-Cerrato R, Chavez CG. 1989. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi
400 from corn fields in Atlacomulco, Mexico. *Mycologia* 81: 933-935.

401 Blaszkowski J. 2012. Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of
402 Sciences Kraków.

403 Brundrett M, Melville L, Peterson L. 1994. Practical Methods in Mycorrhiza Research.
404 Mycologue Publications, University of Guelph, Guelph.

405 Brundrett MC, Jasper DA, Ashwath N. 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical
406 Australia. II. The effect of nutrient levels and host species on the isolation of fungi.
407 *Mycorrhiza* 8: 315–321.

408 Caproni, A.L., Franco, A.A., Berbara, R.L.L., Trufem, S.F.B., Granha, J.R.D.O.,
409 Monteiro, A.B., 2003. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas
410 revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. *Pesquisa*
411 *Agropecuária Brasileira* 38: 1409–1418.

412 Cardoso EJBN, Cardoso IM, Nogueira MA, Baretta CRDM, Paula AM. Micorrizas
413 arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: Siqueira, J.O.; Souza, F.A.;
414 Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*.
415 Lavras: UFLA, 2010. p. 153-214.

416 Carrenho R, Gomes-da-Costa SM, Balota EL, Colozzi-Filho A. Fungos micorrízicos
417 arbusculares em agroecossistemas brasileiros. In: Siqueira, J.O., de Souza, F.A.,
418 Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*.
419 Lavras: UFLA, 2010, pp. 215–249.

420 Carrenho R, Silva ES, Trufem SFB, Bononi VLR. 2001. Successive cultivation of maize and
421 agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular
422 mycorrhizal fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 262-270.

423 Cochran WG. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number.
424 *Biometrics* 6: 105-116.

425 Covacevich F, Marino MA, Echeverría HE. 2006. The phosphorus source determines the
426 arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue
427 and wheatgrass. *European Journal of Soil Biology* 42: 127–138.

428 CPRM - Serviço Geológico do Brasil. 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por
429 água subterrânea. Mascarenhas, J.C., Beltrão, B.A., Souza Junior, L.C., Galvão,
430 M.J.T.G., Pereira, S.N., Miranda, J.L.F. (Orgs.). Recife: CPRM/PRODEEM, 11 p.

- de Souza FA, Sturmer SL, Carrenho R, Trufem SFB. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: Siqueira, J.O., de Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (eds.). *Micorrizas: 30 anos de Pesquisas no Brasil*. Lavras, UFLA, 2010, pp. 15-73.
- Douds Jr DD, Millner PD. 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 77–93.
- Feldmann F, Idczak E. 1992. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In: J.R. Norris, D.J. Read & A.K. Varma (eds.). *Techniques for Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology*. Academic Press, London, pp. 799-817.
- Galvez, L.; Douds Jr., D.D.; Drinkwater, L.E.; Wagoner, P. 2001. Effect of tillage and farming system upon VAM fungus populations and mycorrhizas and nutrient uptake of maize. *Plant and Soil* 228:299–308.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1964. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235- 244.
- Gosling P, Mead A, Proctor M, Hammond JP, Bending GD. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytologist* 198: 546–556. doi: 10.1111/nph.12169
- Hammer O, Harter DAT, Ryan PD. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 9.
- Higo M, Isobe K, Yamaguchi M, Drijber RA, Jeske ES, Ishii R. 2013. Diversity and vertical distribution of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi under two soybean rotational systems. *Biology and Fertility of Soils* 49: 1085–1096. doi: 10.1007/s00374-013-0807-5
- Hijri I, Sykorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277–2289. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02921.x
- Isobe K, Aizawa E, Iguchi Y, Ishii R. 2007. Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in upland field soil of Japan 1.Relationship between spore density and the soil environmental factor. *Plant Production Science* 10: 122-128.

- Jefwa JM, Okoth S, Wachira P et al. 2012. Impact of land use types and farming practices on occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) Taita-Taveta district in Kenya. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 157: 32–39.
- Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.
- Ji B, Bentivenga SP, Casper BB. 2012. Comparisons of AM fungal spore communities with the same hosts but different soil chemistries over local and geographic scales. *Oecologia* 168: 187–197.
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F. 2006: World map of the Köppen- Geiger climate classification updated. – *Meteorologische Zeitschrift* 15: 259–263.
- Kruskal JB. 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29: 115–129.
- Lehman RM, Taheri WI, Osborne SL, Buyer JS, Douds Jr DD. 2012. Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. *Applied Soil Ecology* 61: 300–304.
- Lekberg, Y., Koide, R.T., Rohr, J.R., Aldrichwolfe, L., Morton, J.B., 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J. Ecol.* 95, 95–105.
- Lemos MA, Tabosa JN, Tavares Filho JJ, Gama EEG, Arcoverde ASS, Santos JPO, Oliveira SA. 1995. São José - BR 5026 (seleção IPA): cultivar de milho desenvolvida para Pernambuco, selecionada contra ataque das lagartas do cartucho e da espiga. IPA - Comunicado Técnico, 61, 7 p.
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H. 2012. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science & Technology* 46: 5764–5771 dx.doi.org/10.1021/es3001695
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V. 2010. Disclosing arbuscularmycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* 12: 2165–2179. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02099.x
- Maia LC, Trufem SFB. 1990. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 89-95.

494 McCune B, Mefford MJ. 2006. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 5.
 495 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA.

496 Mello CMA, Silva GA, Vieira HEE, Silva IR, Maia LC, Oehl F. 2012a. *Fuscutata aurea*, a
 497 new species in the Glomeromycetes from cassava and maize fields in the Atlantic
 498 rainforest zone of Northeastern Brazil. *Nova Hedwigia* 95: 267-275. doi: 10.1127/0029-
 499 5035/2012/0037

500 Mello CMA, Silva IR, Pontes JS, Goto BT, Silva GA, Maia LC. 2012b. Diversidade de
 501 fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil. *Acta Botanica*
 502 *Brasílica* 26: 938-943.

503 Mello CMA, Silva GA, Assis DMA et al. 2013. *Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and
 504 *Paraglomus bolivianum* comb. nov., and biogeographic distribution of *Paraglomus* and
 505 *Pacispora*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86: 113-125.
 506 doi:10.5073/JABFQ.2013.086.016

507 Mohammad MJ, Hamad SR, Malkawi HI. 2003. Population of arbuscular mycorrhizal fungi
 508 in semi-arid environment of Jordan as influenced by biotic and abiotic factors. *Journal*
 509 *of Arid Environment* 53: 409–417.

510 Moreira FMS, Siqueira JO. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras, Editora UFLA,
 511 2006.

512 Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A. 2003. Impact of land use
 513 intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of
 514 Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824.

515 Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris E-A, Boller T, Wiemken A. 2005. Community
 516 structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and
 517 intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165: 273-283.

518 Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, van der Heijden M, Sieverding E. 2010.
 519 Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal
 520 fungal communities. *Soil Biology & Biochemistry* 42 : 724-738.

521 Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic
 522 and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.
 523 *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.

524 Ramos-Zapata JA, Guadarrama P, Navarro-Alberto J, Orellana R. 2011. Arbuscular
 525 mycorrhizal propagules in soils from a tropical forest and an abandoned cornfield in

- Quintana Roo, Mexico: visual comparison of most-probable-number estimates. *Mycorrhiza* 21:139–144. doi: 10.1007/s00572-010-0336-0
- Rosendahl S, McGee P, Morton JB. 2009. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Molecular Ecology* 18: 4316–4329. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04359.x
- Schalamuk S, Cabello M. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* 102: 261–268. doi:10.3852/08-118
- Schenck NC, Pérez Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3^o ed. Gainesville, Synergistic Publ.
- Sivakumar N. 2013. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. *Annals of Microbiology* 63: 151-160. doi: 10.1007/s13213-012-0455-2
- Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ No. 224. Eschborn 371 p.
- Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. Academic Press. London.
- Sousa CS, Menezes RSC, Sampaio EVSB, Oehl F, Maia LC, Lima FS. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi within agroforestry and traditional land use systems in semi-arid Northeast Brazil. *Acta Scientiarum* 35: 307-314.
- Tabosa JN, Encarnação CRF, Souza AR, Gallindo AFT, Silva AB, Barros AHC, Gomes RV. Agrocaracterização Ambiental das Bases Físicas do IPA Instituto Agrônomo de Pernambuco. EMPRESA IPA. Recife, 2010.
- Tian H, Drijber RA, Niu XS, Zhang JL, Li XL. 2011. Spatio-temporal dynamics of an indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community in an intensively managed maize agroecosystem in North China. *Applied Soil Ecology* 47: 141-152.
- Uhlmann E, Görke C, Petersen A, Oberwinkler F. 2006. Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia. *Journal of Arid Environments* 64: 221-237.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.

- 557 Verbruggen E, van der Heijden MGA, Rillig MC, Kiers ET. 2012. Mycorrhizal fungal
558 establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New*
559 *Phytologist* 197: 1104–1109. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04348.x
- 560 Wang MY, Hu LB, Wang WH, Liu ST, Li M, Liu RJ. 2009. Influence of long-term fixed
561 fertilization on diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* 19: 663–672.
- 562 Wetzel K, Silva G, Matczinski U, Oehl F, Fester T. 2014. Superior differentiation of
563 arbuscular mycorrhizal fungal communities from till and no-till plots by morphological
564 spore identification when compared to T-RFLP. *Soil Biology & Biochemistry* 72: 88-
565 96.
- 566 Zangaro W, Moreira M. Micorrizas arbusculares nos biomas Floresta Atlântica e Floresta de
567 Araucária. In: Siqueira, J.O., de Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (Eds.).
568 *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Editora UFLA, 2010. pp. 279-310.
- 569 Zhang Y, Gui LD, Liu RJ. 2004. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and
570 natural forest land in the subtropical region of Dujiangyan, southwest China. *Plant &*
571 *Soil* 261: 257–263.
- 572 Zhao D, Zhao Z. 2007. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of
573 the Jinsha River, southwest China. *Applied Soil Ecology* 37: 118-128.



ISSN 0102-3306 *printed version*
ISSN 1677-941X *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope of the journal](#)
- [Why publish in Acta Botanica Brasilica?](#)
- [Language editing](#)
- [Charges](#)
- [Types of articles](#)
- [Summary of submission processes](#)
- [Cover letter](#)
- [Preparing the article file](#)
- [Preparing Tables, Figures and Supplementary material](#)
- [Supplementary Materials](#)
- [The review process](#)
- [Submitting a revised paper](#)
- [Publication and printing process](#)
- [Misconduct](#)

Scope of the journal

Acta Botanica Brasilica (Acta bot. bras.) is the official journal of the *Sociedade Botânica do Brasil (Brazilian Botanical Society, SBB)* and was founded in 1987. Since 1998, the journal publishes four issues per year. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant (including algae) and fungi biology are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. Contributions should be substantial, written in English and show general interest. Manuscripts that report aspects of local interest are discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Manuscripts with agronomic subjects are expected to contain a substantial amount of basic plant biology.

Why publish in Acta Botanica Brasilica?

- **Acta bot. bras.** is an indexed, open-access, peer-reviewed journal devoted to publishing high quality research in Plant Biology.
- The submissions are peer-reviewed by a least two competent experts who evaluate scientific quality and novelty.
- We are trying to ease timely publication of manuscripts, so time to first decision is expected in about two months.
- All manuscripts published by **Acta bot. bras.** are open-access, maximizing the impact of your research.
- The manuscripts are advertised to all members of the SBB, available in the journal website, in the SciELO database and in social media.
- **Acta bot. bras.** is indexed in Scopus and Web of Science among others.
- Members of the SBB have no costs for publication.
- Increasing impact factor: **Acta bot. bras.** IF has been increasing in the last evaluations (from 0.374 in 2012 to 0.553 in 2013).

Language editing

If English is not your first language, it is strongly recommended to have your manuscript edited for language before submission. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. Authors are liable for all costs associated with such services.

Charges

If at least one of the authors is a member of the SBB, and not in debt with the society during the year of publication, the article will be published at no charge if occupy 12 or fewer pages (in the print version of the journal); for each additional page, a specific fee (to be determined on an annual basis) will be charged. The costs of printing figures in color will be borne by the authors (members and non-members). To request information regarding the current page and figure charges, please contact the Editorial Office (acta@botanica.org.br).

Types of articles

Standard research papers (ORIGINAL ARTICLES) should not normally exceed twelve printed pages, except for REVIEWS (which may not exceed 25 printed pages). Reviews are solicited by the editors, but authors are also encouraged to submit potential topics for consideration. There are no charges for invited Reviews or Articles. Opinion papers (VIEWPOINTS), METHODS and SHORT COMMUNICATIONS are also welcome and should not exceed six printed pages. To estimate the number of printed pages, consider that each page of text contains about 500-700 words.

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see **PREPARING THE ARTICLE FILE** below for details) and submitted online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/abb-scielo>). Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see **Preparing Tables, Figures and Supplementary material** below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the "**New user - register here**" link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and inform your email in "**password help**". Please never create a new account if you are already registered.

If you are unable to access our web-based submission system,

please contact the Editorial Office (acta@botanica.org.br).

Cover letter

All manuscripts must be submitted with a cover letter, which should include an approximately 80 word summary of the scientific strengths of the paper that the authors believe qualify it for consideration by **Acta Botanica Brasilica**. The cover letter should also include a statement declaring that the manuscript reports unpublished work that it is not under active consideration for publication elsewhere, nor been accepted for publication, nor been published in full or in part (except in abstract form).

Preparing the article file

(Please consult a last issue of **Acta Botanica Brasilica** for layout and style)

ORIGINAL ARTICLES and REVIEWS must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files.

The **first page** should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method or Short communication) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (¹, ², ³ etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated and should always be the submitting author. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. A running title of no more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings.

The Abstract should be followed by between five and ten **Key words**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

Title page

Abstract
Introduction
Materials and Methods
Results
Discussion
Acknowledgements
References
Tables and Figure legends
Supplementary Data (if applicable)

Materials and Methods and **Results** should be clear and concise. The **Discussion** section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (**Results and Discussion**), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is required only in Material and Methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* 'Jumbo'). Authors must include in Material and Methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Numbers up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

Abbreviations must be avoided except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

Units of Measurement. **Acta bot. bras.** adopts the *Système International d'Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). For concentrations, use μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . For size and distance use meters (cm, mm, μm , etc) and be consistent in the manuscript.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a, b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by *et al.* (e.g. Simmons *et al.*, 2014). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. JS Santos, 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned. (e.g. RA Santos, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. RA Santos, 'pers. comm.').

References should be arranged alphabetically based on the surname of the first author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one publication in the same year, these should be ordered with single

authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year), and then any three-or-more-author papers (in year order only). Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year. Please provide DOI of accepted papers whenever possible.

For papers with **six** authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with **seven** authors or more, please give the names of the *first three* authors only, followed by *et al.*

Please follow the styles:

Books

Rico-Gray V, Oliveira PS. 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions. 1st. edn. Chicago, University of Chicago Press.

Chapters in books

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

Research papers

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. Acta Botanica Brasilica 27: 714-722.

Papers in press (ahead of print)

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. Acta Botanica Brasilica (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339.

Online-only journals

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. AoB Plants 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

Thesis (citation should be avoided)

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD Thesis, University of Brazil, Brazil.

Websites and other sources (citation should be avoided)

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

Acknowledgements should be preferably in fewer than 80 words. Be concise: "we thank..." is preferable to "The present authors would like to express their thanks to...". Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos for assistance with

the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (control number).

For **SHORT COMMUNICATIONS** note that the editorial guidelines applying to original papers must also apply here. In general, the difference between original papers and short communications is the **lack of subsections in the text** and limited space for illustrations in the latter. Figures and tables can be present, assuming that the overall size of the manuscript does not exceed the five printed page limit (supplementary material can be added). The abstract (as described for original articles) must be followed by a "running text" (a single section, without subheadings), followed by the acknowledgments and references.

Preparing Tables, Figures and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Figs. 2A-D, Fig. 3A).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g. photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 2) should not be inserted into the plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g. Figs. 2A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar.

Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™.

Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

Supplementary Materials

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files, which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are generally not peer refereed. When a paper is published, the Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate .doc or .pdf file format. These archives should contain inside all supplementary tables and files and any additional text. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as "Table S1" and/or "Figure S1".

Acta bot. bras. intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. Acta bot. bras. reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.

The Review Process

All authors will receive an email acknowledging the submission of the manuscript, with its correspondent reference number. The Editor-in-Chief will evaluate manuscript adherence to instructions, quality and novelty and will decide on the suitability for peer reviewing. Manuscripts failing to adhere to the format will be returned to the authors. Manuscripts are sent to at least two anonymous referees that are given 21 days to return their reports. Authors are asked to revise provisionally accepted articles within 21 days [View full editorial board](#).

Submitting a revised paper

After peer review, the revised paper must be sent as the initial submission (go to "click here to submit a new manuscript") but in an appropriate field you must inform that this manuscript had been submitted previously to **Acta bot. bras.** and insert the previous manuscript ID.

Publication and printing process

After acceptance, a PDF proof will be sent to corresponding

authors as an e-mail attachment. Corrected proofs should be returned within 72 h. It is the sole responsibility of the corresponding author to check for errors in the proof.

Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code used in bibliographic referencing and searching. The dates of submission and acceptance will be printed on each paper.

The corresponding author will receive a free PDF or URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF. The corresponding author is responsible for distributing this PDF or URL to any co-authors.

Misconduct

Misconduct on submitted manuscripts will lead to immediate rejection. Duplicate publication, plagiarism, figure manipulation, dual-submission, and any other fraudulent method will not be tolerated.

If misconduct is detected after the manuscript publication, the article will be retracted and a retraction note will be published. Submitted manuscripts can be scanned to detect plagiarism and verify the papers' originality.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Acta Botanica Brasileira
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
Campus Pampulha UFMG
Biblioteca Central 300B
31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil
Phone (55 31) 3409 3960, (55 31) 3409 2683



acta@botanica.org.br



***Fuscutata aurea*, a new species in the Glomeromycetes from cassava and maize fields in the Atlantic rainforest zone of Northeastern Brazil**

Catarina Maria Aragão de Mello¹, Gladstone Alves da Silva¹, Helder Elísio Evangelista Vieira¹, Iolanda Ramalho da Silva¹, Leonor Costa Maia¹ and Fritz Oehl^{2*}

¹ Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil

² Agroscope Reckenholz-Tänikon Research Station ART, Ecological Farming Systems, Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich, Switzerland

With 8 figures

Mello, C.M.A., G.A. Silva, H.E.E. Vieira, I.R. Silva, L.C. Maia & F. Oehl 2012: *Fuscutata aurea*, a new species in the Glomeromycetes from cassava and maize fields in the Atlantic rainforest zone of Northeastern Brazil. – Nova Hedwigia 95: 267–275.

Abstract: A new species of the arbuscular mycorrhiza forming Glomeromycetes, *Fuscutata aurea*, is reported from cassava and maize fields in the tropical rainforest zone in Itambé (Pernambuco State, Northeastern Brazil). It forms bright yellow to golden yellow glomerospores on yellowish-white to yellow sporogenous cells. Its spores, ornamented with tiny tubercles on surface, are 160–250 (–310) µm in diameter and have three walls: a three-layered outer, a bi-layered middle and a three-layered inner wall. A yellow brown, violin-shaped to oval, bi-lobed germination shield is formed on the surface of the inner wall. Analyses of the partial LSU rRNA sequences place the new species in the monophyletic *Fuscutata* clade adjacent to *F. heterogama*. Also morphologically, *F. aurea* is most similar to *F. heterogama* but can be distinguished from the latter species by the characteristic yellow to golden color of the outer spore wall.

Key words: arbuscular mycorrhiza, Dentiscutataceae, Gigasporales, Glomeromycota, *Scutellospora*.

Introduction

Following studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in natural and agro-ecosystems of Northeastern (NE) Brazil (Maia et al. 2006), several species of the Gigasporales *sensu* Oehl et al. (2011a) were described (Silva et al. 2008, Goto et al. 2009, 2010, 2011). One species possessing unique morphological spore characteristics has been detected in agricultural soils of the semi-humid tropical rainforest zone in

* Author for correspondence; e-mail: fritz.oehl@art.admin.ch

Pernambuco, Brazil. The objective of the current study was to comprehensively analyze this particular fungus using both morphological and molecular tools, and to describe the new species under a new epithet.

Materials and methods

STUDY SITES: Study sites were cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and maize fields (*Zea mays* L.) in the semi-humid tropical rainforest zone of Itambé, Pernambuco State (NE Brazil). The sampling sites are located at 7°24'50"S and 35°06'30"W. The climate is tropical-(semi-)humid (type Am of Köppen-Geiger; Kottek et al. 2006) with a four months dry season. Average annual temperature is 24°C and rainfall is 1200 mm. The maize variety sown was BR 5026 'São José', and at this site previously pasture plants (*Brachiaria* spp. and ginger, *Zingiber officinale* Roscoe) had been grown. The cassava variety was 'Amarelinha', and its pre-crop in the rotation was yam.

SOIL SAMPLING AND SOIL PARAMETERS: Field soil samples were taken with sixteen sampling points per site (area about 1000 m² for cassava and 6000 m² for maize). Briefly, at each point, four sub-samples were collected (0–20 cm depth) and combined into a composite sample. The sampling was undertaken in the dry season (October 2010) from rhizospheric soils of cassava and maize. Each soil sample was analyzed for soil pH (H₂O), organic carbon and available phosphorus (see Goto et al. 2009).

AMF BAIT CULTURES: It was intended to cultivate the native AMF communities from Itambé in 1000 mL pots under greenhouse conditions at the Department of Mycology, Universidade Federal de Pernambuco (Recife). Autoclaved quartz sand plus field soil mixture (1:1; w/w; pH 6.0; 900 g per pot) was used, and three cultivation cycles (three months each) were carried out using corn (*Zea mays* L.), bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf, as host plant mixtures in the same pots during each cycle. While several AMF species were multiplied, the new species could not successfully be propagated in the bait cultures.

MORPHOLOGICAL ANALYSES: Spores were extracted from field soils by wet sieving (Gerdemann & Nicolson 1963) and sucrose centrifugation (Jenkins 1964). The spores were thereafter mounted in polyvinyl-alcohol – lactic acid – glycerin (PVLG), PVLG + Melzer's reagent and in water (Brundrett et al. 1994, Spain 1990). About 200 spores of the fungus were examined. For the species description, the terminology for spore morphology and germination for Gigasporales species was used (Silva et al. 2008, Goto et al. 2010, 2011, Oehl et al. 2008, 2010).

MOLECULAR ANALYSES:

DNA extraction: DNA was extracted from three single spores crushed on a slide with a needle and assimilated with a drop (5–10 µl) of ultrapure water. The resulting material was used directly in the PCR reactions.

Amplification and sequencing: The LSU rRNA gene was amplified in a semi-nested PCR, using the primers ITS3 (White et al. 1990) – 28G2 (Silva et al. 2006) and LR1 (van Tuinen et al. 1998) – 28G2 consecutively. PCR reactions were carried out in a volume of 50 µl, containing 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 200 µM each dNTPs, 1 µM of each primer and 2 units of TaqTM DNA polymerase (Fermentas); cycling parameters were 5 min at 95°C (1 cycle), 45 s at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C (40 cycles), and a final elongation of 7 min at 72°C followed the last cycle. The amplified products were purified with a PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instruction, sequenced directly, or cloned with a CloneJETTM PCR Cloning kit (Fermentas; Carlsbad, USA) following the manufacturer's instructions and thereafter sequenced. Sequencing was provided by the Human Genome Research Center (São Paulo, Brazil).

Sequence alignment: Querying the National Center for Biotechnology Information databases with the BLASTn program, we verified that the sequence obtained from *Fuscutata aurea* was affiliated to the Gigasporales (Glomeromycota) before phylogenetic analysis. The AM fungal sequences (~670bp

– LSU rDNA) obtained in our laboratory were aligned with other glomeromycotean sequences from GenBank using the program ClustalX (Larkin et al. 2007) and edited with the BioEdit program (Hall 1999) to obtain a final alignment. The sequences were deposited at GenBank under the accession numbers JN971066–JN971068 (from direct sequencing) and JQ390469–JQ390471 (from sequencing after cloning).

Phylogenetic analyses: Maximum parsimony (MP) and neighbor joining (NJ) analyses with 1000 bootstrap replications were performed using the Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) program version 4 (Swofford 2003). Bayesian (two runs over 1×10^6 generations with a burnin value of 2500) and maximum likelihood (1000 bootstrap) analyses were executed, respectively, in MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) and PhyML (Guindon & Gascuel 2003), launched from Topali 2.5. The model of nucleotide substitution (GTR + G) was estimated using Topali 2.5 (Milne et al. 2004). Sequences from *Pacispora scintillans* were used as outgroup.

Taxonomic analyses

***Fuscutata aurea* sp. nov.** Oehl, C.M.Mello & G.A.Silva

Figs 1–7

MycoBank MB 563598

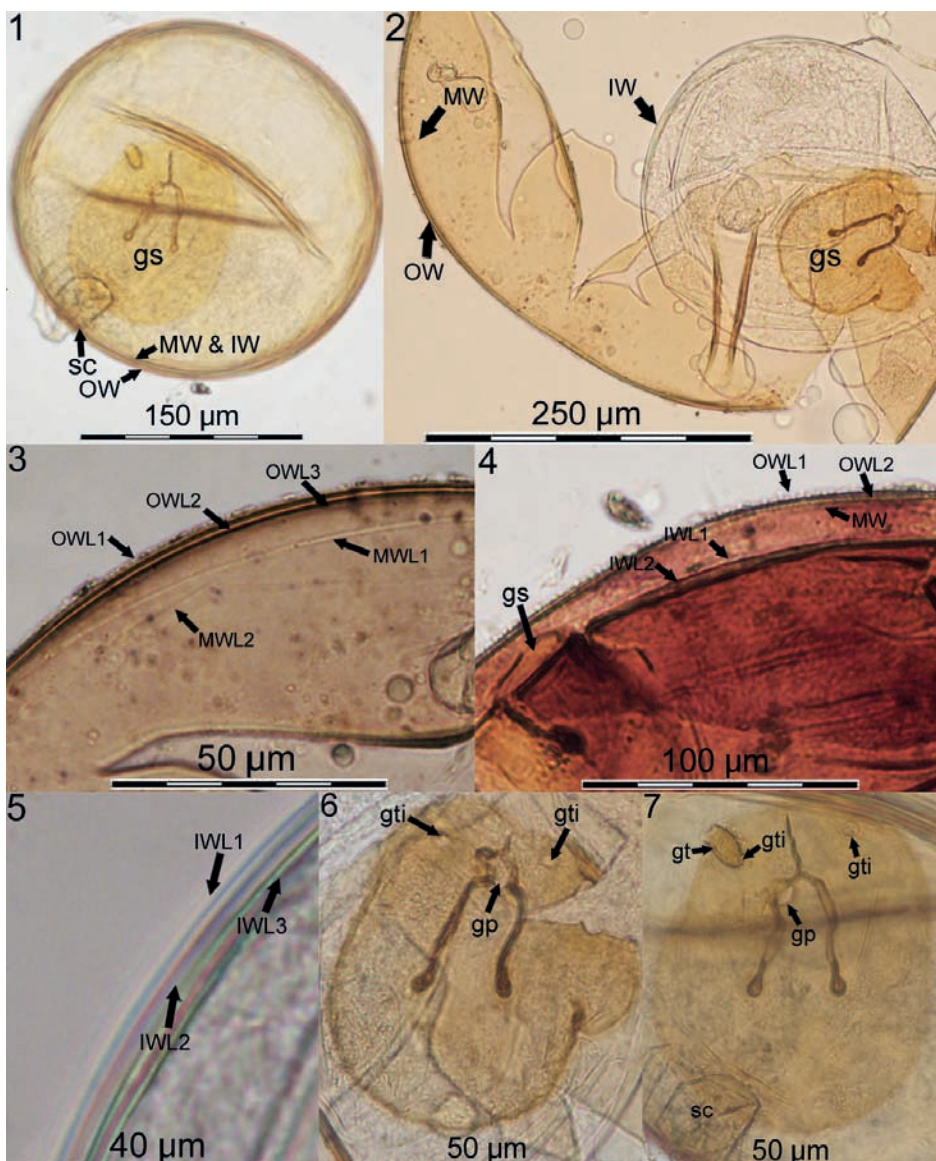
Sporocarpia ignota. Sporae singulatim in solo efformatae anguste cellulis sporogenis subterminalibus flavisque insedentes, flavae ad aureae, globosae 160–250(–310) μm in diametro vel subglobosae vel ovoides (190–350 $\times$ (155–)200–260 μm); sporae tunica tribus: tunica exterior stratis tribus, in totum 3.2–6.0 μm crassa; stratum exterius tunicae exterioris hyalinum, tenue tuberculis densis ornatum, evanescens vel semi-persistens, 1.2–1.8 μm crassum; stratum medium laminatum, flavum ad aureum, 1.3–2.9 μm crassum; stratum interius albo-flavum ad albo-aureum, 0.7–1.3 μm crassum; tunica media stratis duobus hyalinibus, 1.2–2.1 μm crassa; tunica interior hyalina tribus stratis, 3.2–5.8 μm crassa in totum; stratum secundum tunicae interioris purpureum colorans reagente Melzeri; scutellum germinale bi-lobatum, ovale vel violinoforme, flavo-fuscum ad fuscum, 101–127 $\times$ 81–102 in diametro, depressionibusque germinationis duabus. Holotypus # 89–8901: URM 83314.

HOLOTYPE: specimen 89–8901 = URM 83314; UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil, isolated from rhizosphere soil of cassava isolated near Itambé (7°24'50"S and 35°06'30"W) located in the Atlantic rainforest zone of Pernambuco State (NE Brazil), identified by F.Oehl. Isotype specimens (89–8902 & 89–8903) deposited at URM (83315 and 83316) and (89–8904 & 89–8920) at Z+ZT (ZT Myc 7623). Paratype specimens were obtained from adjacent fields in Itambé under corn production.

ETYMOLOGY: *aurea* (Latin = golden yellow), referring to the golden color of the spores.

Sporocarp formation is unknown. Spores formed singly in soil, terminally on a subterminal bulbous suspensor cell (= 'sporogenous' cell; Fig. 1). Spores are globose (160–250(–310) μm in diameter) to subglobose (190–350 $\times$ (155–)200–260 μm). They are bright yellow to golden yellow (Figs 1–3), sometimes darken to brown-yellow when ageing in field soils, usually staining reddish-brown when exposed to Melzer's reagent (Fig. 4). The spores have three walls: an outer, middle and an inner wall (Figs 2–5).

Outer wall (OW) is 3.2–6.0 μm thick in total and consists of three layers (Figs 2–4): outermost wall layer (OWL1) is hyaline to subhyaline to light yellow, evanescent to semi-persistent, 1.2–1.8 μm thick, densely packed with short tubercles that are as long as the thickness of this wall layer and 0.6–1.2 μm in diameter. OWL2 is bright yellow to golden yellow, becoming sometimes brownish-yellow with age. It is laminate, persistent and 1.3–2.9 μm thick. Third layer (OWL3) is slightly lighter in color, thin and flexible (0.7–1.3 μm thick) and often difficult to observe as it is closely adherent



Figs 1–7. *Fusicutata aurea*. Fig. 1. Uncrushed, golden spore formed on a sporogenous cell (sc) and differentiating three spore walls (outer, middle, inner: OW, MW, IW) and a violin-shaped to oval, bi-lobed & yellow brown germination shield (gs). Fig. 2. Crushed spore with visible OW, MW, IW; germination shield also crushed through pressure on the cover slide. Fig. 3. OW golden yellow and three-layered (OWL1-3); MW hyaline and bi-layered (MWL1-2); OWL1 densely packed with short spines. Fig. 4. IWL2 staining reddish brown to purple in Melzer's reagent; germ shield (gs) formed on IW surface. Fig. 5. IW with three hyaline to slightly subhyaline wall layers (IWL1-3). Figs 6–7. Yellow brown to brown germination shields in planar view: bi-lobed and ovale to violin-shaped, with one central germ pore (gp) and two germ tube initiations (gti) from where the germ tubes (gt) emerge during germination.

to OWL2 (Fig. 2). OWL2 and OWL3 usually stain light reddish-brown in Melzer's reagent (Fig. 4). The straight pore channel at the spore base (about 1.9–2.9 μm broad) is closed by a plug formed by spore wall material of OWL2, and by OWL3, but can rarely appear open.

Middle wall (MW) is (mono- to) bi-layered (Figs 2–3), semi-flexible and in total 1.2–2.1 μm thick. It usually separates well from the inner wall (IW) through pressure applied on the cover slide.

Inner wall (IW) is triple-layered (Fig. 5), hyaline and 3.2–5.8 μm thick. The outer layer of the inner wall (IWL1) is semi-flexible and 0.8–2.5 μm thick. The second layer (IWL2) is semi-flexible to unite, rarely 'amorphous' when slightly expanding in PVLG based mounting media and 2.0–2.6(–3.5) μm thick. The innermost layer (IWL3) is relatively thin (0.4–1.1 μm thick), flexible, mostly tightly adherent to IWL2, and therefore generally difficult to observe. The IWL2 stains purple in Melzer's reagent (Fig. 4).

Sporogenous cell (sc) is elongate to subglobose, 42–48 $\times$ 25–36 μm (Fig. 1). It is often lighter in color than the spore wall, being regularly white-yellow to golden yellow. Two wall layers are visible on young sc. They are continuous with OWL1 and with laminated OWL2. The outer sc wall layer is 0.5–1.5 μm thick and evanescent to semi-persistent, and the inner sc wall layer is 1.5–2.6 μm thick and generally persistent on the spore. The sporogenous hypha attached to sc is also bi-layered, 7–11 μm in diameter and tapering to 5–8 μm within 80–250 μm distances from the sporogenous cell. Within these distances, the sporogenous hyphal wall tapers from 1.5–2.4 μm to 0.9–1.3 μm , and 3–9 septa may be visible.

Germination shield is formed on the outer IW surface (Fig. 4) and can easily be detected already on uncrushed spores since it is bright yellow brown (Figs 1–2, 6–7). It is violin-shaped to oval, 101–127 $\times$ 81–102 μm in diameter, and generally has two lobes. Each lobe bears one rounded germ tube initiation (gti, Figs 6–7), 2.5–4.0 μm in diameter. The one-layered shield wall is yellow brown and generally only 0.8–1.5 μm thick. Single germination tubes may emerge from the gti's during germination (Fig. 6), penetrating the MW and OW and branching in the spore periphery within a distance up to 150–200 μm .

No auxilliary cells were found.

Type of mycorrhiza formation unknown.

DISTRIBUTION: *Fuscutata aurea* occurred in cassava and maize fields in Itambé, located in the Mata Atlantica biome of Pernambuco State, NE Brazil. The cassava site had a pH (H_2O) of 6.3, 22.5 g kg^{-1} organic carbon and 14.0 mg kg^{-1} available P extracted according to Nelson et al. (1953). The soil at the maize site had a pH (H_2O) of 5.4, 20.0 g kg^{-1} organic carbon and 3.0 mg kg^{-1} available P.

MOLECULAR ANALYSES: Sequences of the large subunit ribosomal gene (~670 bp) were obtained. Phylogenetic analyses firmly placed the newly described fungus into the genus *Fuscutata* adjacent to *F. heterogama* (Fig. 8).



Fig. 8. Phylogenetic analyses of the Gigasporales sensu Oehl et al. (2011a) obtained from partial LSU rRNA sequences. Sequences are labeled with their database accession numbers. Support values are from neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and bayesian analyses, respectively. The tree is rooted by *Pacispora scintillans*. Sequences of *F. aurea* are shown in boldface. Only topologies with bootstrap values of at least 50% are shown. (Consistency Index = 0.58; Retention Index = 0.82).

Discussion

To date there have been only four other *Fuscutata* spp. described within the *Dentiscutataceae* F.A.Souza et al. (Oehl et al. 2008) of the Gigasporales: *Fuscutata heterogama* Oehl et al., *F. rubra* (Stürmer & J.B.Morton) Oehl et al., *F. savannicola* (R.A.Herrera & Ferrer) Oehl et al., *F. trirubiginopa* (X.L.Pan & G.Yun Zhang) Oehl et al. *Fuscutata aurea* can easily be distinguished from these four *Fuscutata* spp. by spore color and ornamentation on the outer spore surface. None of the other species of the genus forms golden yellow, but either reddish brown (*F. heterogama* and *F. rubra*) or white spores (*F. savannicola* and *F. trirubiginopa*). Of these species only *F. heterogama* and *F. trirubiginopa* have similar spiny to tuberculate ornamentation on the outer spore surface, while the remaining two species have smooth spore surfaces.

The phylogenetic analyses confirm the novelty of the new species and simultaneously the monophyly of the genus within the *Dentiscutataceae*. Although in our analyses the *Fuscutata* clade was always monophyletic with all the sequences related to this genus (data not shown), some *F. heterogama* sequences were let out because some incongruencies were found on the species level. Recently, some articles have reported problems with sequences, where the isolates were misidentified (Oehl et al. 2011b, c, d, Sokolski et al. 2010, Schüßler et al. 2011, Stockinger et al. 2009). It is possible that also the *F. heterogama* sequences available in the public data bases represent more than one species.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) which provided grants to F.Oehl as 'Visiting Professor'.

References

- BRUNDRETT, M., L. MELVILLE & L. PETERSON 1994: Practical Methods in Mycorrhizal Research. – University of Guelph, Mycologue Publications, Guelph, Ontario.
- GERDEMANN, J.W. & T.H. NICOLSON 1963: Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. – Trans. Br. Mycol. Soc. **46**: 235–244.
- GOTO, B.T., L.C. MAIA, G.A. SILVA & F. OEHL 2009: *Racocetra intraornata*, a new species in the *Glomeromycetes* with a unique spore wall structure. – Mycotaxon **109**: 483–491.
- GOTO, B.T., G.A. SILVA, L.C. MAIA & F. OEHL 2010: *Dentiscutata colliculosa*, a new species in the *Glomeromycetes* from Northeastern Brazil with colliculate spore ornamentation. – Nova Hedwigia **90**: 383–393.
- GOTO, B.T., G.A. SILVA, L.C. MAIA, R.G. DE SOUZA, D. COYNE, A. TCHABI, L. LAWOUIN, F. HOUNDONTJI & F. OEHL 2011: *Racocetra tropicana*, a new species in the *Glomeromycetes* from tropical areas. – Nova Hedwigia **92**: 69–82.
- GUINDON, S. & O. GASCUEL 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. – Systematic Biol. **52**: 696–704.
- HALL, T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucl. Acids Symp. Ser. **41**: 95–98.

- JENKINS, W.R. 1964: A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. – *Plant Dis. Rep.* **48**: 692.
- KOTTEK, M., J. GRIESER, C. BECK, B. RUDOLF & F. RUBEL 2006: World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. – *Meteorologische Zeitschrift* **15**: 259–263.
- LARKIN, M.A., G. BLACKSHIELDS, N.P. BROWN, R. CHENNA, P.A. MCGETTIGAN, H. McWILLIAM, F. VALENTIN, I.M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J.D. THOMPSON, T.J. GIBSON & D.G. HIGGINS 2007: Clustal W and Clustal X version 2.0. – *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- MAIA, L.C., A.M. YANO-MELO & B.T. GOTO 2006: Filo Glomeromycota. – In: *Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido. Série Instituto do Milênio do Semi-Árido. Vol. II*: 109–126. MCT/Associação Plantas do Nordeste, Recife.
- MILNE, I., F. WRIGHT, G. ROWE, D.F. MARSHAL, D. HUSMEIER & G. MCGUIRE 2004: TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. – *Bioinformatics* **20**: 1806–1807.
- OEHL, F., F.A. DE SOUZA & E. SIEVERDING 2008: Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming *Glomeromycetes*. – *Mycotaxon* **106**: 311–360.
- OEHL, F., J. JANSÁ, F.A. SOUZA, G.A. SILVA 2010: *Cetraspora helvetica*, a new ornamented species in the *Glomeromycetes* from Swiss agricultural fields. – *Mycotaxon* **114**: 71–84.
- OEHL, F., D.K.A. SILVA, L.C. MAIA, N.M.F. SOUSA, H.E.E. VIEIRA & G.A. SILVA 2011a: *Orbispora* gen. nov., ancestral in the Scutellosporaceae (*Glomeromycetes*). – *Mycotaxon* **116**: 161–169.
- OEHL, F., G.A. SILVA, B.T. GOTO, L.C. MAIA & E. SIEVERDING 2011b: Glomeromycota: two new classes and a new order. – *Mycotaxon* **116**: 365–379.
- OEHL, F., G.A. SILVA, B.T. GOTO & E. SIEVERDING 2011c: New recombinations in *Glomeromycota*. – *Mycotaxon* **117**: 429–434.
- OEHL, F., Z. ŠYKOROVÁ, J. BŁASZKOWSKI, I. SÁNCHEZ-CASTRO, D. COYNE, A. TCHABI, L. LAWOUI, F.C.C. HOUNTONDI & G.A. SILVA 2011d: *Acaulospora sieverdingii*, an ecologically diverse new fungus in the *Glomeromycota*, described from lowland temperate Europe and tropical West Africa. – *J. Appl. Bot. Food Qual.* **84**: 47–53.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- SCHÜSSLER, A., M. KRÜGER & C. WALKER 2011: Revealing natural relationships among arbuscular mycorrhizal fungi: culture line BEG47 represents *Diversispora epigaea*, not *Glomus versiforme*. – *PLoS ONE* **6**: e23333.
- SILVA, G.A., E. LUMINI, L.C. MAIA, P. BONFANTE & V. BIANCIOTTO 2006: Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. – *Mycorrhiza* **16**: 183–189.
- SILVA, D.K.A., N.O. FREITAS, G. CUENCA, L.C. MAIA & F. OEHL. 2008 *Scutellospora pernambucana*, a new fungal species in the *Glomeromycetes* with a characteristic germination orb. – *Mycotaxon* **106**: 361–370.
- SOKOLSKI, S., Y. DALPÉ, S. SÉGUIN, D. KHASA, C.A. LÉVESQUE & Y. PICHÉ 2010: Conspecificity of DAOM197198, the model arbuscular mycorrhizal fungus, with *Glomus irregulare*: molecular evidence with three protein-encoding genes. – *Botany* **88**: 829–838.
- SPAIN, J.L. 1990: Arguments for diagnoses based on unaltered wall structures. – *Mycotaxon* **38**: 71–76.

STOCKINGER, H., C. WALKER & A. SCHÜSSLER 2009: '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. – New Phytol. **183**: 1176–1187.

SWOFFORD, D.L. 2003: PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4. – Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

VAN TUINEN, D., B. ZHAO & V. GIANINAZZI-PEARSON 1998: PCR in studies of AM fungi: from primers to application. – In: VARMA, A.K. (ed.) Mycorrhizal manual: 387–399. – Springer, Berlin Heidelberg New York.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: INNIS, M.A., D. GELFRAND, J. SNINSKY & T. WHITE (eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications: 315–322. Academic Press, San Diego, California.

Manuscript received November 3, 2011; accepted January 18, 2012.

¹Departamento de Micologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitaria, Recife, PE, Brazil²Agroscope Reckenholz-Tänikon Research Station ART, Ecological Farming Systems, Zürich, Switzerland

***Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and *Paraglomus bolivianum* comb. nov.,
and biogeographic distribution of *Paraglomus* and *Pacispora***

Catarina Maria Aragão de Mello¹, Gladstone Alves da Silva¹, Daniele Magna Azevedo de Assis¹,
Juliana Souza de Pontes¹, Araeska Carena de Almeida Ferreira¹, Mariele Porto Carneiro Leão³,
Helder Elísio Evangelista Vieira¹, Leonor Costa Maia¹, Fritz Oehl^{1,2*}

(Received April 22, 2013)

Summary

Paraglomus pernambucanum sp. nov. (Paraglomeromycetes) was found in a tropical dry forest in the semi-arid Caatinga biome of Pernambuco State (NE Brazil), in a cowpea and in two maize production sites. It was characterized by combined morphological and molecular analyses on the spores isolated from field soil samples. Another species, *Pacispora boliviana* (Glomeromycetes), first described only by spore morphology, had been known from another semi-arid biome in Southern America, the Gran Chaco in Bolivia. We detected this fungus now also at different locations in semi-arid to semi-humid NE Brazil. As for *P. pernambucanum* phylogenetic analyses were performed on nuclear ribosomal RNA gene sequences of the LSU region. For *P. boliviana*, the spores for these analyses originated from a trap culture inoculated with soils from the type location. The results now revealed that also *P. boliviana* belongs to *Paraglomus*. It grouped in a separate monophyletic cluster adjacent to *P. pernambucanum*, to *P. brasilianum*, *P. laccatum* and the type species *P. occultum*. Thus, *P. boliviana* is transferred to *Paraglomus*, as *Paraglomus bolivianum* comb. nov. Remarkably, it is the first species known in the Paraglomeromycetes with pigmented spores. *Paraglomus pernambucanum* and *P. bolivianum* have several features in common: e.g. bi-walled spores, and densely pitted surface ornamentations on the structural layer of the outer wall. Spores of the two species can be distinguished by color and the diagnostic nature of their pitted ornamentation. The current knowledge about the global distribution of *Paraglomus* and *Pacispora* species is summarized and discussed.

Introduction

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi play an important role in ecosystem functioning since they are associated with the majority of plant species, deliver essential nutrients to their symbiotic partners, and are for instance also able to suppress harmful soil-borne pathogens and pests, and may protect soils against erosion through stabilization of soil aggregates (SMITH and READ 2008). They can also serve as bio-, soil and land use indicators (e.g. OEHL et al. 2005a, 2011a, 2012). We assume that especially *Pacispora* species might be characteristic for specific soils, land use intensity and different climates since they were found to be characteristic for soils with pH > 6.0, either in alpine areas (e.g. *P. robigina*; OEHL and SIEVERDING 2004, BŁASZKOWSKI et al. 2008), in cultivated soils of temperate areas with lower phosphorus levels (e.g. *P. dominikii*; BŁASZKOWSKI, 1993; OEHL et al., 2005b; OEHL et al., 2010), or in Mediterranean and subtropical areas under semi-arid conditions subjected to naturally elevated soil pH (e.g. *P. scintillans* and *P. franciscana*; e.g. ROSE and TRAPPE, 1980; BASHAN et al., 2007; PALENZUELA et al., 2008).

One fungus, *P. boliviana*, was never found in alpine, temperate, Mediterranean or subtropical areas of higher soil pH despite of extensive AMF diversity studies performed in Europe and Northern America during the last decades (e.g. BŁASZKOWSKI, 1993; KOSKE and TEWS, 1987; DANIELL et al., 2001; JANSÁ et al., 2002; LANDIS et al., 2004), but so far only in the tropical, semi-arid Gran Chaco of Bolivia (pH 6.3; OEHL and SIEVERDING, 2004), and recently also from a tropical Atlantic rainforest in NE Brazil (SILVA et al., 2012). We have lastly detected it several times in the semi-arid Caatinga biome of NE Brazil, which focused again our attention to this fungus. In tropical areas, however, other *Pacispora* species were so far never reported, neither by morphological spore identifications from field soils, long-term trap culture propagations (e.g. GOTO et al., 2010; STÜRMER and SIQUEIRA, 2011; TCHABI et al., 2009) nor through molecular root analyses (e.g. HUSBAND et al., 2002; ÖPIK et al., 2010), although species of this genus could be expected in the Tropics at least in semi-arid regions and soils with increased pH.

Pacispora boliviana has a distinct pitted ornamentation on its spore surface (SIEVERDING and OEHL, 2004). The fungus was preliminary attributed to this genus, since it forms, like all *Pacispora*, bi-walled spores terminally on subtending hyphae. However, it was obvious from the beginning that its spore structure, and above all the structure of the subtending hyphae and the staining reaction of the wall layers in Melzer's reagent, does not fit with those characters typical for *Pacispora* species (OEHL and SIEVERDING, 2004). However, at that time, molecular analyses of the fungus were not available, and morphologically its spores could not be attributed to any other genus within the Glomeromycota, such as *Glomus* or *Paraglomus* (OEHL et al., 2011b). *Glomus* has only mono-walled spores, while the spore wall structure of *Paraglomus* has not yet been fully resolved, and the genus has so far had only species without substantial spore pigmentation. When morphological analyses cannot (or not yet) resolve the relationship between different taxa, molecular analyses are urgently needed to elucidate their phylogeny (GAMPER et al., 2009; PALENZUELA et al., 2010; OEHL et al., 2011d; GOTO et al., 2012). In the present study, we performed first molecular analyses on *P. boliviana* in order to clarify its phylogenetic position in relation to the other glomeromycotan fungi.

More recently, an undescribed fungus, with congruent overall spore and subtending hyphae morphology as *P. boliviana*, was found in another tropical, semi-arid biome of Southern America, i.e. in the Caatinga biome of NE Brazil. Thus, the second objective of the present study was to carefully elaborate both the spore morphology and the phylogenetic position of this new fungus. Based on the results obtained from concomitant morphological and molecular phylogenetic analyses, the new fungus is formally described hereafter. Another objective was to discuss the biogeographic distribution of the two fungi, as far as this was possible at this early stage of species identification. Finally, we aimed at comprehensively presenting the biogeography of the two genera, *Paraglomus* and *Pacispora*, in general.

* Corresponding author

Materials and methods

Study sites

The new AM fungus was found in Caruaru and Serra Talhada, Pernambuco State (NE Brazil), in maize (*Zea mays* L.) fields in the semi-arid tropical Caatinga biome. The sampling sites are located at 08°08'00"S and 36°02'00"W (550 m a.s.l.) and 7°59'00"S and 38°19'16"W (650 m a.s.l.), respectively. The climate is tropical-(semi)-arid (type Bs of Köppen-Geiger; KOTTEK et al., 2006) with six to eight months of dry season. Mean annual temperature is 24–26°C, and annual rainfall is 650 and 550 mm, respectively. The maize variety sown was BR 5026 'São José' (LEMOS et al., 1995). At these two sites, the pasture plant species sudan grass (*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf) and onion had previously been grown, respectively. More recently, the fungus was also found in a tropical Caatinga dry forest where *Mimosa tenuifolia* was the most dominant plant species and in an adjacent cowpea (*Vigna unguiculata*) field. Both locations are near Petrolina, in Pernambuco State (6°28'20"–6°30'00"S; 34°55'50–34°57'10"W, 380 m a.s.l., mean annual temperature 26°, mean annual rainfall 550 mm). At the natural Caatinga site *Mimosa tenuifolia* was the most dominant plant species.

The type location of *Pacispora boliviana* was described in OEHL and SIEVERDING (2004). Briefly, it was isolated from a degraded pasture in the semi-arid Gran Chaco of tropical Bolivia (Departamento de Santa Cruz de la Sierra; 18°05'S; 63°20'W, 550 m a.s.l., mean annual temperature 24°, mean annual rainfall approximately 800 mm), and from trap cultures inoculated with soils from that pasture. The trap cultures were maintained under tropical temperatures in the greenhouse at the University of Basel (Switzerland) for eight months in 2001.

In recent years, we found *P. boliviana* also in the semi-arid Caatinga of NE Brazil, e.g. in Triunfo (7°50'17"S; 38°06'06"W), Belém do São Francisco (8°45'28"S; 38°57'52"W) and, together with the herein described new fungus, also in Serra Talhada (7°59'00"S; 38°19'16"W). All these sites are also in Pernambuco State. Mean annual temperature in Belém do São Francisco (400 m a.s.l.) is 26°C, and the mean annual rainfall is 450 mm. These values are 22°C and approximately 1200 mm, respectively, in Triunfo. This isolation site has a more humid climate than it is common in the Caatinga biome, with typical vegetation of an Atlantic rainforest. This site profits from more frequent rainfalls due to its exposed higher altitude (650 m a.s.l.), when compared to the typical Caatinga dry forest in its surrounding.

Soil sampling and chemical soil analyses

Soil samples in Caruaru, Serra Talhada and Petrolina (NE Brazil) were taken in March 2011 as described by MELLO et al. (2012). The soils in Belém do São Francisco and Triunfo were already taken in September and October 2008, respectively. Soil samples in the Gran Chaco (Bolivia) were taken in November 2000 as described in OEHL and SIEVERDING (2004). The soil in Caruaru had a pH (H₂O) of 6.4, 1.1 g kg⁻¹ organic C and 49.4 mg kg⁻¹ available P extracted according to NELSON et al. (1953). In Serra Talhada, the soil had a pH (H₂O) of 6.2, 0.7 g kg⁻¹ organic C and 58.0 mg kg⁻¹ available P, and in Petrolina, pH was 5.2–6.0, organic C was 16.1 g kg⁻¹, and available P was 22.0 mg kg⁻¹. In Belém do São Francisco, pH was 6.8, organic C was 23.8 g kg⁻¹, and available P was 16.8 mg kg⁻¹, while pH was 6.8, organic C 39.4 g kg⁻¹, and available P 195.0 mg kg⁻¹ in Triunfo. The Bolivian soil had a pH (H₂O) of 6.5; organic carbon was 26 mg kg⁻¹, and available P (here extracted with Na-acetate, see OEHL et al., 2005b) was 2.3 mg kg⁻¹.

AM fungal trap cultures

Trap cultures were established directly after sampling as described

in OEHL et al. (2003), TCHABI et al. (2009) and MELLO et al. (2012). *Pacispora boliviana* produced abundantly spores only in one of 64 trap cultures, in the rhizosphere of *Stylosanthes guianensis*, *Bracharia humicicola* and *Chromolaena odorata*. The new fungus from Pernambuco did not form spores in the trap cultures. Using *Sorghum bicolor* as host plant, single species cultures were initiated, that were inoculated with single or multiple (10–20) spores isolated directly from the field for the new fungus, or obtained from the trap cultures for *Pacispora boliviana*. All these mono- or multiple spore cultures failed so far.

Morphological analyses

Spores of the two fungi were separated from the soil samples by wet sieving as described by SIEVERDING (1991). The described morphological characteristics of spores and their subcellular structures are based on observations of specimens mounted in polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol (PVLG; KOSKE and TESSIER, 1983), in a mixture of PVLG and Melzer's reagent (BRUNDRETT et al., 1994), a mixture of lactic acid to water at 1:1, Melzer's reagent, and in water (SPAIN, 1990). The terminology of the spore structure follows OEHL and SIEVERDING (2004) and OEHL et al. (2011b, c) for species with glomoid (sensu lato and sensu stricto), paraglomoid and pacisporoid spore formation. Specimens mounted in PVLG and the mixture of PVLG and Melzer's reagent were deposited at Z+ZT (Zurich, Switzerland) and URM (Recife, Brazil) herbaria.

Molecular analyses

Before DNA extraction all spores isolated were first washed in ultrapure water and sonicated three to four times. For *P. boliviana* (culture code: BOL 35), crude DNA extracts were obtained from three single isotype spores, extracted from the trap culture that had been inoculated with field soil samples from the type location in the Gran Chaco. For the new fungus from Pernambuco, the DNA extracts were obtained from two single spores that were directly separated from the field samples of the type location in Caruaru. The spores were singly placed on a slide in a drop (5–10 µl) of ultrapure water, crushed with a sterile needle. Crude DNA extract was used as template for a semi-nested PCR using the primers ITS3 (WHITE et al., 1990) 28G2 (SILVA et al., 2006) and LR1 (VAN TUINEN et al., 1998) 28G2, consecutively. PCR reactions were carried out in a volume of 50 µl, containing 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 200 µM each dNTPs, 1 µM of each primer and 2 units of TaqTM DNA polymerase (Fermentas, Maryland, USA); cycling parameters were 5 min at 95°C (1 cycle), 45s at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C (40 cycles), and a final elongation of 7 min at 72°C followed the last cycle. The final amplicons (~690bp) were purified with the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), sequenced directly or cloned with a CloneJETTM PCR Cloning kit (Fermentas; Carlsbad, USA) following the manufacturer's instructions and sequenced. Sequencing was provided by the Human Genome Research Center (São Paulo, Brazil). Sequence data were compared to gene libraries (EMBL and Gen Bank) using BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990). The new sequences deriving from the AM fungi from Bolivia and Pernambuco were deposited in the NCBI database under the accession numbers JX122769–JX122777.

Phylogenetic analyses

The phylogeny was reconstructed by partial sequences of the LSU rRNA gene. The AM fungal sequences were aligned in ClustalX (LARKIN et al., 2007) and edited with the BioEdit program (HALL, 1999). *Boletus edulis* Bull. and *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge were included as outgroup. Prior to phylogenetic analysis,

the model of nucleotide substitution was estimated using Topali 2.5 (MILNE et al., 2004). Bayesian (two runs over 1×10^6 generations with a burnin value of 2500) and maximum likelihood (1,000 bootstrap) analyses were performed, respectively, in MrBayes 3.1.2 (RONQUIST and HUELSENBECK, 2003) and PhyML (GUINDON and GASCUEL, 2003), launched from Topali 2.5, using the GTR + G model. Neighbor-joining (established with the model cited above) and maximum parsimony analyses were performed using PAUP*-4b10 (SWOFFORD, 2003) with 1,000 bootstrap replications.

Biogeographic analyses

A comprehensive literature and sequence data bank research was performed in order to study the biogeographic distribution of the genera *Paraglomus* and *Pacispora* on global scale. We included identifications performed either on the genus or on the species level, and considered for studies that were either based on spore morphology, or on the generation of species and environmental sequences.

Results

Molecular phylogeny

Phylogenetic analyses on the partial sequences of the LSU rRNA gene place the two fungi from Bolivia and Pernambuco firmly, with high support values, in a monophyletic clade within the order Paraglomerales next to *Paraglomus occultum*, *P. laccatum* and *P. brasilianum* (Fig. 1).

Taxonomy

Paraglomus pernambucanum Oehl, C.M. Mello, Magna & G.A. Silva sp. nov. (Figs. 2-9)
Mycobank MB 800575

Diagnosis: Sporae albae ad flavo-albae, $66-95 \times 62-75$ μm in diametro, tunica duabus. Stratum laminatum tunicae exterioris, album ad flavo-album, $2.9-4.2$ mm crassum, cum depressionibus subtilibus, $0.5-1.1$ mm latis et $0.5-1.0$ mm profundis ornatum, $1.3-2.4$ mm in distancia. Tunica interior hyalina; $1.9-3.0(-3.9)$ mm crassa, de novo formans et porum basae sporarum occidens. Tunica hyphae confluentis cum stratis exterioribus tunicae externae, raro porum hyphae affixae occludens. In solutione Melzeri tunica interior non colorans. Holotypus # 37-3701: ZT Myc 24205.

Etymology: Latin, *pernambucanum*, referring to the NE Brazilian State where the species was found first.

Holotype: Brazil, Pernambuco State, Caruaru (37/3701, ZT Myc 24205). Isotypes (37-3702–37-3705 at ZT Myc 24206; 37-3711–37-3713 at URM). **Paratypes:** Brazil, Pernambuco State, in the municipalities of Serra Talhada and Petrolina (37-3751, 37-3752, 37-3761; as ZT Myc 24207, 24208, 24209 at Z+ZT).

Spores are formed singly in soil. They are white to yellowish white, globose to subglobose to ovoid, $66-95 \times 62-75$ μm in diameter (Figs. 1-4) and have an outer and an inner wall (Figs. 2-3).

Outer wall with three layers (Figs. 5-7): outer layer (OWL1) evanescent to semi-persistent, subhyaline to light yellow, $0.5-0.9$ mm thick, and usually tightly adherent to second layer (OWL2); OWL2

finely laminated, brilliant white in young mature spores to yellowish white in older spores, $2.0-2.6$ mm thick, with regular, round but shallow and inconspicuous pits that are $0.5-1.1$ μm in diameter and $0.5-1.0$ μm deep and $1.3-2.4$ μm apart; inner layer (OWL3) hyaline and thin, $0.4-0.7$ mm, separable under pressure but usually adherent to OWL2 and then extremely difficult to observe. OWL2 stains yellow in Melzer's reagent.

Inner wall is hyaline and three-layered (Figs. 6-8). Outer layer (IWL1) is $0.5-0.8$ mm thick. In crushed spores it sometimes separates under light pressure from the central layer (IWL2); the central layer (IWL2) is $1.0-2.4$ mm thick and the inner layer (IWL3) is very thin, $0.4-0.7$ mm, flexible and may show several folds in broken spores; IWL3 is usually adherent to IWL2 and thus very difficult to observe. None of the layers stains in Melzer's reagent (Fig. 9).

Subtending hypha (sh) is straight or recurved, $4.0-5.5$ mm in diam at the spore base tapering to $3.5-4.5$ mm within $6-15$ mm distance from the base. It is generally slightly funnel-shaped to cylindrical (Figs. 2-6), or rarely slightly constricted (Fig. 9). The wall of the subtending hypha is of the same color as, and continuous with the spore wall layers OWL1 and OWL2, and of the same thickness, tapering to $0.5-1.1$ mm within $25-90$ mm distance. The length of the subtending hypha persistently remaining at the spore is often shorter ($10-15$ mm from the spore base), or sh is completely broken away. Pore of the subtending hypha usually is open at spore base, and IW generally functions as pore closure at spore base.

Distribution: The new fungus was detected in maize production sites in Caruaru and Serra Talhada, and in a tropical dry forest and a cowpea field in Petrolina. All these sites are located in the semi-arid Caatinga biome of Pernambuco State, NE Brazil.

Specimens examined: Brazil, Pernambuco, Caruaru (37-3701–37-3750). Brazil, Pernambuco, Serra Talhada (37-3751–37-3760); Brazil, Pernambuco, Petrolina (37-3761–37-3770).

Paraglomus bolivianum (Sieverd. & Oehl) Oehl & G.A. Silva comb. nov.

BASIONYM: *Pacispora boliviana* Sieverd. & Oehl. J. Appl. Bot. Food Qual. 78:79. 2004.

Mycobank MB 800596

Emendation: The species was well described in OEHL and SIEVERDING (2004). Here it might be mentioned that the subtending hyphae sometimes have a constricted appearance when OWL2 (hw2 in Fig. 6A of OEHL and SIEVERDING, 2004) is constricted and OWL1 already degraded. However, overall subtending hyphae shape, including OWL1 respective hw1, is cylindrical to slightly funnel-shaped since sh is regularly broader at spore base than at some distance from the spore (Fig. 6A of OEHL and SIEVERDING, 2004).

Comments: The intra-specific variation between the LSU rRNA gene sequences for *P. pernambucanum* and for *P. bolivianum* was around 1-2%. The sequences from *P. bolivianum* presented 95% of identity with those from *P. pernambucanum*. In the BLASTn analysis, the closest related species to *P. bolivianum* and *P. pernambucanum* was *P. brasilianum* with 93% and 92% of identity, respectively

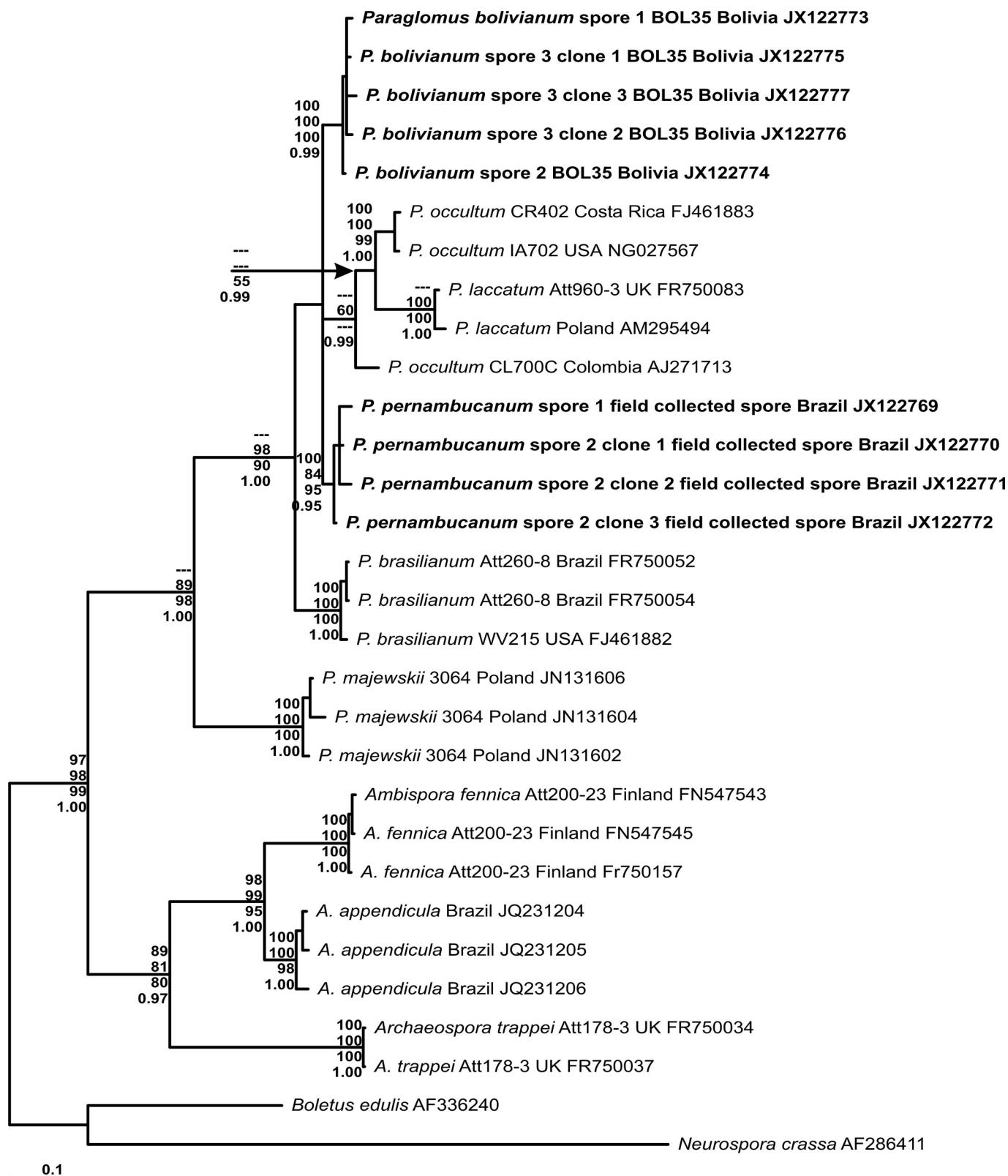
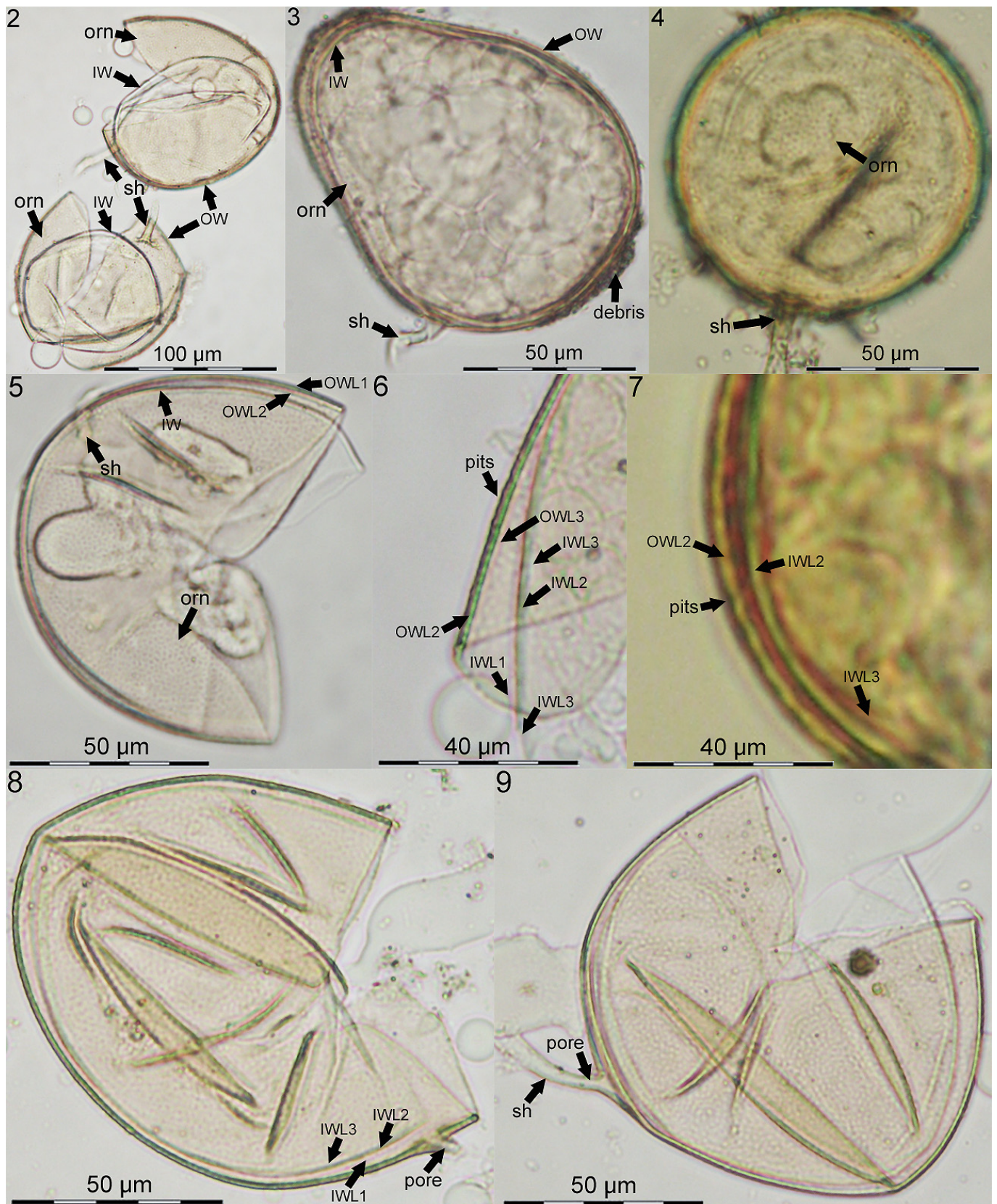


Fig. 1: Phylogenetic tree of the Paraglomeromycetes and Archaeosporomycetes based on analysis from partial sequences of the LSU rRNA gene. *Boletus edulis* and *Neurospora crassa* were used as outgroup. Sequences are labeled with database accession numbers. Support values (from top) are from neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian analyses, respectively. Sequences obtained in this study are in bold. (Consistency Index = 0.70; Retention Index = 0.86).



Figs. 2-9: *Paraglomus pernambucanum*: Figs. 2-3. Crushed and uncrushed spores with outer and inner wall (OW, IW), cylindric to funnel-shaped subtending hyphae (sh) and minute pit ornamentation on OW surface. Fig. 4. Outer wall staining yellow in Melzer's reagent. Figs. 5-6. OW and IW triple-layered (OWL1-3; IWL1-3); outer surface of OWL2 with minute pits. Fig. 7. OWL2 staining yellow in Melzer's. Figs. 8-9. Pore at spore base regularly open but closed by IW.

Tab. 1: Detection sites of *Paraglomus* and *Pacispora* species around the globe

AMF isolate	Ecosystem/plant species/(Isolate) ¹	State/region, Country	pH ¹	Detected by ²	Reference
<i>Paraglomus</i> spp.					
<i>Paraglomus occultum</i>	Poplar plantations	Iowa, USA	NA	M	WALKER et al. (1982)
<i>P. occultum</i>	Ornamental plants in greenhouse	Oregon, USA	NA	M	WALKER et al. (1982)
<i>P. occultum</i>	NA	Illinois, USA	NA	M	WALKER et al. (1982)
<i>P. occultum</i>	NA	The Netherlands	NA	M	WALKER et al. (1982)
<i>P. occultum</i>	Agro-ecosystems; temperate	Pennsylvania, USA North America	NA	M	FRANKE-SNYDER et al. (2001)
<i>P. occultum</i>	Sonoran desert	Texas & Arizona, USA	7.7-7.9	M	STUTZ and MORTON (1996)
<i>P. occultum</i>	Boojum tree in a desert reserve	Baja California, Mexico	7.0-8.0	M	(BASHAN et al. 2007)
<i>P. occultum</i>	Evergreen forests & pastures	Nicaragua & Costa Rica	3.9-5.6	M	PICONE (2000)
<i>P. occultum</i>	Natural ecosystems; crops like	Carimagua, Colombia cassava, maize	5.0-7.0	M	SIEVERDING (1989)
<i>P. occultum</i>	Maize	Pernambuco, Brazil	5.5-5.7	M	MAIA and TRUFEM (1990)
<i>P. occultum</i>	Semi-arid copper mining area	Bahia, Brazil	6.2-7.8	M	SILVA et al. (2005)
<i>P. occultum</i>	Evergreen and deciduous forests	Araucanía Region, Chile	4.6-5.4	M	CASTILLO et al. (2006)
<i>P. occultum</i>	Horticultural systems	Araucanía Region, Chile	5.5-6.1	M	CASTILLO et al. (2010)
<i>P. occultum</i>	Highest elevation of plant occurrence	Valais, Switzerland in Europe, 4505 m asl!	ca. 5.0	M	OEHL, in KÖRNER (2011)
<i>P. occultum</i>	Subnival siliceous scree, 2700 m asl	Valais, Switzerland	5.0-5.4	M	OEHL, unpublished
<i>P. occultum</i>		Poland		M	BLĄSZKOWSKI (1989, 1993)
<i>P. occultum</i>	Grasslands and crop rotation systems	Alsace, France; Baden, Germany; Basel, Switzerland	4.0-8.0, 5.3-7.7	M	OEHL et al. (2005b, 2010)
<i>P. occultum</i>	Tropical forests and yam field sites	Benin	6.1-6.9	M	TCHABI et al. (2009)
<i>P. occultum</i>	Namib Desert	Namibia	7.0-8.0	M	STUTZ et al. (1999)
<i>P. occultum</i>	Forest and grassland	India	7.8	M	MUTHUKUMAR and UDAIYAN (2000)
<i>P. occultum</i>	Wheat	Golestan, Iran	NA	M	SADRAVI (2006)
<i>P. occultum</i>	Natural habitats: date palm (oasis) and native <i>Prosopis cineraria</i> (undisturbed desert habitat)	Sultanate of Oman	8.2-8.4	M	AL-YAHYA'EI et al. (2011)
<i>P. occultum</i>	Desert ephemerals	Xinjiang, China	8.2	M	SHI et al. (2006)
<i>P. occultum</i>	(Isolates from INVAM; IA702, FL703, HA771)	Iowa/Florida/Hawaii, USA	NA	SpSeq	MILLNER et al. (2001), JAMES et al. (2006), MSISKA and MORTON (2009)
<i>P. occultum</i> (JX301683-4)	Cultivated Soils of the Canadian Prairies	Saskatchewan, Canada	NA	SpSeq	Unpublished
<i>P. occultum</i> (FJ461883)	(Isolate from INVAM, CR402)	Costa Rica	NA	SpSeq	Unpublished
<i>P. occultum</i>	(Isolates from INVAM; CL700, CL700C, CL383)	Colombia	NA	SpSeq	MILLNER et al. (2001), TURNER et al. (2001)
<i>P. occultum</i>	(Isolate from INVAM, GR582)	Germany	NA	SpSeq	MILLNER et al. (2001)
<i>P. occultum</i>	(Isolate from BEG, BEG120)	Alicante, Spain	NA	SpSeq	FERROL et al. (2004)
<i>P. albidum</i>	Winter wheat	Ohio, USA	NA	M	WALKER and RHODES (1981)
<i>P. albidum</i>	Poplar plantations	Iowa, USA	NA	M	WALKER et al. (1982)
<i>P. albidum</i>	'Caatinga' dry forest	Bahia, Brazil	6.2	M	SILVA et al. (2005)
<i>P. albidum</i>	Maize mono-cropping, crop rotations, grasslands	France, Germany, Switzerland	5.3-7.7	M	OEHL et al. (2009, 2010)
<i>P. bolivianum</i>	Gran Chaco grasslands	Santa Cruz, Bolivia	6.5	M&SpSeq	OEHL and SIEVERDING (2004), present study
<i>P. bolivianum</i>	'Caatinga' dry forest	Pernambuco, Brazil	5.2-6.8	M	Present study
<i>P. bolivianum</i>	coastal 'restinga' forest vegetation	Pernambuco, Brazil	5.1	M	SILVA et al. (2012)
<i>P. brasilianum</i>	Greenhouse cultures on <i>Allium porrum</i>	D.F., Brasília, Brazil	NA	M	SPAIN and MIRANDA (1996)
<i>P. brasilianum</i>	Desert ephemerals	Xinjiang, China	8.2	M	SHI et al. (2006)
<i>P. brasilianum</i>	(Isolate from INVAM; BR 105)	D.F., Brasília, Brazil	NA	SpSeq	KRÜGER et al. (2012),
<i>P. brasilianum</i>	(Isolates from INVAM; WV224, WV219, WV215, WV215A)	West Virginia, USA	NA	SpSeq	MILLNER et al. (2001), MSISKA and MORTON (2009)

AMF isolate	Ecosystem/plant species/(Isolate) ¹	State/region, Country	pH ¹	Detected by ²	Reference
<i>P. laccatum</i>	<i>Festuca</i> sp.	Jastrzębia Góra, Poland.	NA	M&SpSeq	BLASZKOWSKI (1988b), RENKER et al. (2007)
<i>P. laccatum</i>	<i>Ammophila arenaria</i> , <i>Helictotrichon pubescens</i>	Slowinski National Park, Poland	NA	M&SpSeq	TADYCH and BLASZKOWSKI (2000), RENKER et al. (2007)
<i>P. laccatum</i>	Grassland	Thuringia, Germany	7.0-7.5	EnSeq	KÖNIG et al. (2010)
<i>P. laccatum</i>	(Isolate Att960-3)	UK	NA	SpSeq	KRÜGER et al. (2012)
<i>P. lacteum</i>	Central Oregon desert	Oregon, USA	7.0-8.0	M	ROSE and TRAPPE (1980)
<i>P. majewskii</i>	<i>Zea mays</i>	Algarve, Portugal	NA	M	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	<i>Ammophila. arenaria</i>	Mallorca, Spain	NA	M	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	<i>Ammophila. arenaria</i>	Karabucak-Tuzla, Turkey	NA	M&SpSeq	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	‘Cultivated and uncultivated plants’	Lubuskie, Poland	NA	M	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	<i>Ammophila. arenaria</i>	Near Bornholm, Denmark	NA	M	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	Weeds	Asmara, Eritrea	NA	M	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. majewskii</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	West Pomerian, Poland	NA	M&SpSeq	BLASZKOWSKI et al. (2012)
<i>P. pernambucanum</i>	Natural Caatinga, maize and cowpea	Pernambuco, Brazil	5.2-6.4	M&SpSeq	Present study
<i>Paraglomus</i> sp.	Isolated from <i>Miscanthus sinensis</i>	Jeonbuk, South Korea	NA	EnSeq	LEE et al. (2008)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Panax japonicus</i>	Chungbuk, South Korea	NA	EnSeq	LEE et al. (2008)
<i>Paraglomus</i> sp. (FJ461884)	Isolate from INVAM - NI116B	Nicaragua	NA	SpSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Pioneer grass species <i>Miscanthus sinensis</i> in acid sulfate soils	Hokkaido/Aichi/Okinawa, Japan	2.7-6.8	EnSeq	AN et al. (2008)
<i>Paraglomus</i> sp.	Seminatural grasslands - Roots of <i>Lolium multiflorum</i>	Thuringia, Germany	6.2	EnSeq	RENKER et al. (2003), BÖRSTLER et al. (2006)
<i>Paraglomus</i> sp.	Wetland, Roots of <i>Dactylis glomerata</i>	Thuringia, Germany	NA	EnSeq	WIRSEL et al. (2004)
<i>Paraglomus</i> sp.	Semi-natural grasslands – Roots of <i>Plantago major</i>	Thuringia, Germany	6.2	EnSeq	BÖRSTLER et al. (2006)
<i>Paraglomus</i> sp.	Semi-natural grasslands	Thuringia, Germany	6.2	EnSeq	BÖRSTLER et al. (2006), HEMPEL et al. (2007)
<i>Paraglomus</i> sp. (AJ854100)	Roots of <i>Ajuga reptans</i>	Yorkshire, UK	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp. (FN555262-92)	Onion (trap plant roots)	England-UK	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Arable soils – Roots of <i>Zea mays</i>	Basel, Switzerland	4.8-5.4	EnSeq	HIJRI et al. (2006)
<i>Paraglomus</i> sp.	Arable soils – Roots of <i>Triticum aestivum</i>	Basel, Switzerland	5.4	EnSeq	HIJRI et al. (2006)
<i>Paraglomus</i> sp.	Arable soils – colonized roots	Basel, Switzerland	4.8	EnSeq	HIJRI et al. (2006)
<i>Paraglomus</i> sp.	Aquatic macrophytes in oligotrophic and ultra-oligotrophic lakes	The Netherlands	NA	EnSeq	BAAR et al. (2011)
<i>Paraglomus</i> sp.	Organic and conventional farming systems – Roots of <i>Allium cepa</i>	The Netherlands	7.4	EnSeq	GALVÁN et al. (2009)
<i>Paraglomus</i> sp.	Geothermal soils – Roots of <i>Agrostis stolonifera</i>	Iceland	4.0-4.5	EnSeq	APPOLONI et al. (2008)
<i>Paraglomus</i> sp.	Geothermal soils – colonized roots	Yellowstone, USA	3.4-4.8	EnSeq	APPOLONI et al. (2008)
<i>Paraglomus</i> sp.	Geothermal soils– Roots from <i>Dichanthelium lanuginosum</i>	Yellowstone, USA	4.8	EnSeq	BUNN et al. (2009)
<i>Paraglomus</i> sp.	Colonized roots	Yellowstone, USA	4.8-6.5	EnSeq	LEKBERG et al. (2011)
<i>Paraglomus</i> sp. (GQ890654, GQ890656)	Grasslands dominated by exotic plant species	California, USA	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Reforestation plots on degraded pastures– Roots of <i>Setaria sphacelata</i> and <i>Heliocarpus americanus</i>	South of Ecuador	4.0-5.0	EnSeq	HAUG et al. (2010)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Retama sphaerocarpa</i> , <i>Psoralea bituminosa</i> and <i>Lolium perenne</i>	Murcia, Spain	NA	EnSeq	ALGUACIL et al. (2011a)
<i>Paraglomus</i> sp.	Seedlings grown in a heavy metal polluted soil	Murcia, Spain	NA	EnSeq	ALGUACIL et al. (2011b)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Herniaria fruticosa</i> and <i>Senecio auricula</i>	Murcia, Spain	NA	EnSeq	ALGUACIL et al. (2012b)

AMF isolate	Ecosystem/plant species/(Isolate) ¹	State/region, Country	pH ¹	Detected by ²	Reference
<i>Paraglomus</i> sp.	Galls and Roots of <i>Prunus persica</i>	Aragua, Venezuela	5.18	EnSeq	ALGUACIL et al. (2011c)
<i>Paraglomus</i> sp.	<i>Ricinus communis</i> soil	Guantanamo, Cuba	8.7	EnSeq	ALGUACIL et al. (2012a)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Dichanthium aristatum</i>	Guadeloupe, French Antilles	7.8	EnSeq	JALONEN et al. (2012)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Zea mays</i>	Martonvasar, Hungary	5.8-6.2	EnSeq	SASVÁRI et al. (2011)
<i>Paraglomus</i> sp. (HE775341-50)	Roots of <i>Tanacetum vulgare</i> , <i>Brachypodium pinnatum</i> , and <i>Knautia arvensis</i>	Bohemia, Czech Republic	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Trifolium repens</i>	Lombardy, Italy	5.7-6.4	EnSeq	LUMINI et al. (2011)
<i>Paraglomus</i> sp.	Roots of <i>Zea mays</i>	Marche, Italy	8.3-8.5	EnSeq	BORRIELLO et al. (2012)
<i>Paraglomus</i> sp. (HM044471)	Roots of <i>Larix decidua</i>	South Tyrol, Italy	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp. (JQ315319-36)	Roots of <i>Camellia japonica</i>	Piedmont, Italy	5.8	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Pasture soil	Sardinia, Italy	5.4-6.2	EnSeq	ORGIAZZI et al. (2012)
<i>Paraglomus</i> sp.	Pasture soil	Sardinia, Italy	5-6.5	EnSeq	LUMINI et al. (2009)
<i>Paraglomus</i> sp. (HQ108153-9)	NA	Cameroon	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp. (JF340036-39)	Chickpea rooting soil	Canada	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp. (JQ864337)	Rhizosphere of <i>Tectona grandis</i>	Chiang Mai, Thailand	NA	EnSeq	Unpublished
<i>Paraglomus</i> sp.	Semiarid Mediterranean prairies	Murcia, Spain	NA	EnSeq	TORRECILLAS et al. (2012)
<i>Pacispora</i> spp.					
<i>Pacispora scintillans</i>	High Mediterranean dessert	Oregon, USA	NA	M	ROSE and TRAPPE (1980)
<i>P. scintillans</i>	Pot culture with <i>Plantago lanceolata</i> inoculated with field soil from beneath <i>Triticum aestivum</i>	Pomerania, Poland	NA	SpSeq	WALKER et al. (2004)
<i>P. scintillans</i>	Sandy heathland, beneath <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Anthericum liliago</i> and associated plants	Hessen, Germany	NA	SpSeq	WALKER et al. (2004), KRÜGER et al. (2009)
<i>P. scintillans</i>	Ancient meadow, beneath <i>Lolium perenne</i> and associated plants	Dorset, UK	NA	SpSeq	WALKER et al. (2004)
<i>P. chimonobambusae</i>	Bamboo garden	Nan-Tou, Taiwan	NA	M	WU et al. (1995)
<i>P. chimonobambusae</i>	<i>Trisetum</i> grassland on serpentinite	Grisons, Switzerland	6.1	M	OEHL, unpublished
<i>P. coralloidea</i>	Subnival siliceous scree	Valais, Switzerland	6.5	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>P. dominikii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	NW Poland	NA	M	BLĄSZKOWSKI (1988a)
<i>P. dominikii</i>	<i>Trisetum</i> grasslands	Grisons, Switzerland	7.8	M	OEHL, unpublished
<i>P. dominikii</i>	Organic farming systems	Basel, Switzerland	6.4-7.5	M	OEHL et al. (2005b, 2010)
<i>P. dominikii</i>	<i>Ptercephalus spathulatus</i> , <i>Thymus granatensis</i>	Andalusia, Spain	8.1	M&SpSeq	PALENZUELA et al. (2008)
<i>P. franciscana</i>	Olive tree-grasslands	Umbria, Italy	7.0-7.5	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>P. franciscana</i>	Subnival calcareous screes	Grisons, Switzerland	7.5	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>P. franciscana</i>	NA	Pomerania, Poland	NA	SpSeq	KRÜGER et al. (2012)
<i>P. franciscana</i>	NA	Lower Saxony, Germany	NA	SpSeq	KRÜGER et al. (2012)
<i>P. patagonica</i>	<i>Nothofagus</i> forest	Santa Cruz, Argentina	5.5	M	NOVAS et al. (2005)
<i>P. robigina</i>	Subnival calcareous and serpentinite screes	Grisons, Switzerland	7.0-7.8	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>P. robigina</i>	Subnival screes	Valais Switzerland	6.5	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>P. robigina</i>	<i>Soldanella carpatia</i>	Tatra Mountains, Poland	NA	M	OEHL and SIEVERDING (2004)
<i>Pacispora</i> sp.	McLaughlin Reserve on serpentinite	California, USA	NA	EnSeq	SCHECHTER and BRUNS (2008)
<i>Pacispora</i> sp.	Alpine plant species (4500 m asl)	Tibet, China	NA	EnSeq	LIU et al. (2011)
<i>Pacispora</i> sp. (JQ182767)	Tibet Plateau	China	NA	EnSeq	Unpublished

Accession numbers are given in the left column for available sequences that so far have not yet been published in peer-reviewed journals. ¹ No information Available. ² M = Identified by morphological analyses, SpSeq identified by molecular analyses, M&SpSeq identified by both approaches, EnSeq = environmental sequences deposited in public data bases.

(Fig. 1). Environmental sequences that were closely related to the two fungi were not found in the public data bases.

Distribution: *Paraglomus bolivianum* was found in a degraded pasture of the semi-arid Gran Chaco (Bolivia, OEHL and SIEVERDING, 2004). In recent years, it was also found in the semi-arid Caatinga of NE Brazil, e.g. in Triunfo, Belém do São Francisco and Serra Talhada, all in Pernambuco State. Finally, *P. bolivianum* was also found in a coastal 'restinga' forest vegetation in Mataraca (Paraíba State; 6°28'20"-6°30'00"S; 34°55'50"-34°57'10"W (SILVA et al., 2012).

Biogeography of *Paraglomus* and *Pacispora* spp.

In Tab. 1, a comprehensive summary of the biogeography of the genus *Paraglomus* and *Pacispora*, and their conclusively and non-conclusively identified species, is given. The identifications have been based on spore morphology, molecular analyses on formerly morphologically identified species, and on so-called environmental sequences deposited in the public data bases. It can be deduced from these results that the genus *Paraglomus* has a worldwide distribution and occurs in many terrestrial ecosystems throughout the globe. It has been recorded from high alpine to nival areas, temperate to Mediterranean up to sub- to inner tropic, arid to humid areas, in different soil types covering a wide spectrum of soil pH and land use intensities (Tab. 1). There have been > 300 *Paraglomus* sequences from the ribosomal gene deposited in the public data bases, from 36 countries and from many quite different ecosystems. The most widespread fungus of this genus so far might be *P. occultum*, followed by *P. albidum*, since these two species were most often identified. However, the phylogenetic tree shows at least two species identified as *P. occultum*, revealing current problems in the species identification of this small-spored genus. Only one *P. occultum* clade, fixed by the isolate from the type area in Iowa, can be *P. occultum*, while the sequence AJ271713 obviously belongs to another *Paraglomus* species (Fig. 1).

The genus *Pacispora* is biogeographically more restricted to specific habitats and specific climatic zones than *Paraglomus* (Tab. 1), which confirms our assumption in the introduction. Based on morphological spore identification, the genus is characteristic for higher pH soils (> 6.0) and a more restricted to specific ecosystems when compared to *Paraglomus*. One exception might be *P. patagonica* which was found in soil with pH 5.5, but it was not given in NOVAS et al. (2005) in which medium the soil pH was measured. Also in the public data bases, sequences of *Pacispora* spp. have so far been rarely deposited: from the ribosomal gene, only nine environmental sequences and 23 sequences from formerly morphologically identified species have been found. They are from USA, Poland, Germany, UK, Spain and China, all detected from soils with pH > 6.0 (Tab. 1). Nevertheless, our investigation shows that the genus occurs worldwide, but none of the *Pacispora* species appear to have a similar wide distribution as *P. occultum*.

Discussion

Paraglomus pernambucanum and *P. bolivianum* can easily be distinguished by their spore wall ornamentations, and by spore color and size. The spores of *P. bolivianum* are yellow brown to brown and their pits are substantially larger and deeper (OEHL and SIEVERDING, 2004) than those of *P. pernambucanum*, whose spores are hyaline to subhyaline. In *Paraglomus*, there is one other species known with ornamentation on the spore wall. This is *P. brasilianum* whose or-

nementation is labyrinthiform (SPAIN and MIRANDA, 1996; MORTON and REDECKER, 2001).

Within *Paraglomus*, six to seven of the eight species might have two spore walls. These are *P. occultum* (WALKER, 1982), *P. brasilianum* (SPAIN and MIRANDA, 1996), *P. bolivianum* (OEHL and SIEVERDING, 2004), *P. pernambucanum*, and, according to our analyses (OEHL, own observations), also *P. lacteum* (ROSE and TRAPPE, 1980) and *P. laccatum* (RENKER et al., 2007). Beneath its multi-laminated spore wall layer, *P. laccatum* has a separate inner wall which is difficult to observe (RENKER et al., 2007; OEHL et al., 2011c). This might be also true for *P. albidum* (WALKER and RHODES, 1981; OEHL et al., 2011c) but this need to be checked on newly isolated spores. Thus, only *P. majewskii* might have solely one, triple-layered spore wall with a relatively thin innermost layer, which is substantially thinner than those in the other *Paraglomus* species like *P. occultum*, *P. brasilianum*, and *P. bolivianum*. Interestingly, *P. majewskii* was reported as forming a relatively distant lineage within *Paraglomus* (BŁASZKOWSKI et al., 2012), which is confirmed by our analyses.

Beside *P. pernambucanum*, there has been only one other recently described *Paraglomus* species, with phylogenetic analyses in the original description (*P. majewskii*, BŁASZKOWSKI et al., 2012). Like *P. bolivianum*, *P. laccatum* was transferred to the genus *Paraglomus* due to new phylogenetic analyses (RENKER et al., 2007) on type specimens of the former *Glomus laccatum* (BŁASZKOWSKI, 1988b). Sequences on the ribosomal gene of *P. occultum* and *P. brasilianum* (formerly *G. occultum* and *G. brasilianum*) were the base for the transfer of the later two species (WALKER, 1982; SPAIN and MIRANDA, 1996) from the Glomerales and Glomeraceae to the Paraglomerales and Paraglomeraceae, respectively (MORTON and REDECKER, 2001; SCHÜSSLER et al., 2001). Up to date, six *Paraglomus* species have been sequenced on the rRNA or other genes (Fig. 9), while for *P. albidum* and *P. lacteum* molecular phylogenetic evidence is still missing (OEHL et al., 2011c). Remarkably, *P. bolivianum* is the first species known in the Paraglomeromycetes with pigmented spores.

In the Glomeromycota, there are currently two genera with bi-walled spores formed on subtending hyphae. This is true for all *Pacispora* species (OEHL and SIEVERDING, 2004; OEHL et al., 2001b) and for most of the *Paraglomus* species. *Pacispora* species form characteristic constricted to cylindrical subtending hyphae that may bear one to a few hyphal pegs, and the outermost spore wall layer is semi-persistent, while the inner wall regularly stains purple to deep purple in Melzer's reagent. In contrast, bi-walled *Paraglomus* spores generally have slightly funnel-shaped to cylindrical subtending hyphae without hyphal pegs, and the outermost spore wall layer is rapidly degrading ('short-lived') and thus, can be called evanescent, while the inner wall never stains in Melzer's. Remarkably, species of *Pacispora* with ornamented spore surfaces regularly have projections on OWL1 (*P. scintillans*, *P. dominikii*, *P. coralloidea*, *P. chimonobambusae*, *P. patagonia*) (OEHL and SIEVERDING, 2004; WALKER, 2008), while the *Paraglomus* species with ornamented spore surfaces have a pitted OWL2 (*P. brasilianum*, *P. bolivianum* and *P. pernambucanum*).

Our literature and data bank research strongly suggests that *Paraglomus* species have a wider distribution than *Pacispora* species, since they were found in many different ecosystems from the warm to very cold climates and in soils of very different soil pH (Tab. 1). *Pacispora* species are characteristic for soils with pH > 6.0, either in high alpine areas (e.g. *P. robigina*, OEHL and SIEVERDING, 2004; BŁASZKOWSKI et al., 2008), in cultivated soils of temperate areas (e.g. *P. dominikii*, BŁASZKOWSKI, 1993; OEHL et al., 2005b; OEHL et al., 2010) or in Mediterranean and subtropical areas un-

der semi-arid conditions subjected to naturally elevated soil pH (e.g. *P. scintillans* and *P. franciscana*, ROSE and TRAPPE, 1980; BŁASZKOWSKI, 1993; OEHL and SIEVERDING, 2004; BASHAN et al., 2007). However, so far they were, to our knowledge, never found in tropical areas (e.g. SIEVERDING, 1989; STÜRMER and SIQUEIRA, 2011; TCHABI et al., 2008). In contrast, *Paraglomus bolivianum* and *P. pernambucanum* were so far only found from tropical regions in South America, beside a single isolation site of *P. bolivianum* reported from southeast Tibet (WANG and SHI, 2008). It has to be taken into account that many *Paraglomus* species, and especially *P. pernambucanum*, form rather small, rapidly degrading spores that in the past might have often been difficult to identify from field samples. Thus, we do not exclude that both species have, like *P. occultum*, a much larger distribution than known so far.

Acknowledgements

Catarina M. A. de Mello wishes to acknowledge the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for a Ph.D. scholarship. This study has been supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) that provided research grants to Leonor C. Maia (INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, Proc.573.883/2008-4; Protax, Proc. 562.330/2010-2; Sisbiota, Proc. 563.342/2010-2), by FACEPE and UFPE which provided grants to F. Oehl as ‘visiting professor’ and by the Swiss National Science Foundation (SNSF) Project 315230_130764/1).

References

- ALGUACIL, M.M., TORRES, M.P., TORRECILLAS, E., DÍAZ, G., ROLDÁN, A., 2011a: Plant type differently promote the arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity in the rhizosphere after revegetation of a degraded, semiarid land. *Soil. Biol. Biochem.* 43, 167-173.
- ALGUACIL, M.M., TORRECILLAS, E., KOHLER, J., ROLDÁN, A., 2011b: Molecular approach to ascertain the success of “in situ” AM fungi inoculation in the revegetation of a semiarid, degraded land. *Sci. Total Environ.* 409, 2874-2880.
- ALGUACIL, M.M., TORRECILLAS, E., LOZANO, Z., ROLDÁN, A., 2011c: Evidence of differences between the communities of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing galls and roots of *Prunus persica* infected by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8656-8661.
- ALGUACIL, M.M., TORRECILLAS, E., HERNANDEZ, G., ROLDÁN, A., 2012a: Changes in the diversity of soil arbuscular mycorrhizal fungi after cultivation for biofuel production in a Guantanamo (Cuba) tropical system. *PLoS ONE* 7, e34887.
- ALGUACIL, M.M., TORRECILLAS, E., ROLDÁN, A., DÍAZ, G., TORRES, M.P., 2012b: Perennial plant species from semiarid gypsum soils support higher AMF diversity in roots than the annual *Bromus rubens*. *Soil. Biol. Biochem.* 49, 132-138.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, E., MYERS, E.W., LIPTON, D.J., 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- AL-YAHYA'EI, M., OEHL, F., VALLINO, M., LUMINI, E., REDECKER, D., WIEMKEN A., BONFANTE, P., 2011: Uncovering arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with date palm (*Phoenix dactylifera*) and its surrounding ruderal and natural vegetation in Southern Arabia. *Mycorrhiza* 21, 195-209.
- APPOLONI, S., LEKBERG, Y., TERCEK, M.T., ZABINSKI, C.A., REDECKER, D., 2008: Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbiol. Ecol.* 56, 649-659.
- AN, G.H., MIYAKAWA, S., KAWAHARA, A., OSAKI, M., EZAWA, T., 2008: Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: habitat segregation along pH gradients. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 54, 517-528.
- BAAR, J., PARADI, I., LUCASSEN, E.C.H.E.T., HUDSON-EDWARDS, K.A., REDECKER, D., ROELOFS, J.G., SMOLDERS, A.J.P., 2011: Molecular analysis of AMF diversity in aquatic macrophytes: a comparison of oligotrophic and ultra-oligotrophic lakes. *Aquatic Bot.* 94, 53-61.
- BASHAN, Y., KHAOSAAD, T., SALAZAR, B.G., WIEMKEN, A., OEHL, F., VIERHEILIG, H., 2007: The mycorrhizal status of *Idria columnaris*, the boojum tree, an ancient plant from Baja California. *Trees* 21, 329-335.
- BŁASZKOWSKI, J., 1988a: Four new species of the Endogonaceae (Zygomycotina) from Poland. *Karstenia* 27, 37-42.
- BŁASZKOWSKI, J., 1988b: Three new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Poland. *Bull. Pol. Acad. Biol. Sci.* 36, 271-275.
- BŁASZKOWSKI, J., 1989: The occurrence of the Endogonaceae in Poland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29, 45-50.
- BŁASZKOWSKI, J., 1993: Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycol.* 28, 93-140.
- BŁASZKOWSKI, J., CZERNIAWSKA, B., ZUBEK, S., TURNAU, K., 2008: *Glomus intraradices* and *Pacispora robigina*, species of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) new for Poland. *Acta Mycol.* 43, 121-132.
- BŁASZKOWSKI, J., KOVÁCS, G.M., GÁSPÁR, B.K., BUSCOT, F., RYSZKA, P., 2012: The arbuscular mycorrhizal *Paraglomus majewskii* sp. nov. represents a distinct basal lineage in Glomeromycota. *Mycologia* 104, 148-156.
- BORRIELLO, R., LUMINI, E., GIRLANDA, M., BONFANTE, P., BIANCIOTTO, V., 2012: Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biol. Fert. Soils* 48, 911-922.
- BÖRSTLER, B., RENKER, C., KAHMEN, A., BUSCOT, F., 2006: Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biol. Fert. Soils* 42, 286-298.
- BRUNDRETT, M., MELVILLE, L., PETERSON, L., 1994: Practical Methods in Mycorrhizal Research. Mycologue Publications, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- BUNN, R., LEKBERG, Y., ZABINSKI, C., 2009: Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate temperature stress in thermophilic plants. *Ecology* 90, 1378-1388.
- CASTILLO, C., BORIE, F., GODOY, R., RUBIO, R., SIEVERDING E., 2006: Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 80, 40-47.
- CASTILLO, C., RUBIO, R., BORIE, F., SIEVERDING, E., 2010: Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in horticultural production systems of Southern Chile. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10, 407-413.
- DANIELL, T.J., HUSBAND, R., FITTER, A.H., YOUNG, J.P.W., 2001: Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 203-209.
- FERROL, N., CALVENTE, R., CANO, C., BAREA, J.M., AZCON-AGUILAR, C., 2004: Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification-threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Appl. Soil Ecol.* 25, 123-133.
- FRANKE-SNYDER, M., DOUDS Jr, D.D., GALVEZ, L., PHILLIPS, J.G., WAGONER, P., DRINKWATER, L., MORTON, J.B., 2001: Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. *Appl. Soil Ecol.* 16, 35-48.
- GALVÁN, G.A., PARÁDI, I., BURGER, K., BAAR, J., KUYPER, T.W., SCHOLTEN, O.E., KIK, C., 2009: Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza* 19, 317-328.
- GAMPER, H.A., WALKER, C. SCHÜSSLER, A., 2009: *Diversispora celata* sp. nov.: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 182, 495-506.

- GOTO, B.T., SILVA, G.A., YANO-MELO, A.M., MAIA, L.C., 2010: Checklist of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*) in the Brazilian semiarid. *Mycotaxon* 113, 251-254.
- GOTO, B.T., SILVA, G.A., ASSIS, D.M.A., SILVA, D.K.A., SOUZA, R.G., FERREIRA, A.C.A., JOBIM, K., MELLO, C.M.A., VIEIRA, H.E.E., MAIA, L.C., OEHL, F., 2012: The Intraornatosporaceae (Gigasporales), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon* 119, 117-132.
- GUINDON, S., GASCUEL, O., 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biol.* 52, 696-704.
- HALL, T.A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HAUG, I., WUBET, T., WEISS, M., AGUIRRE, N., WEBER, M., GÜNTHER, S., KOTTKE, I., 2010: Species-rich but distinct arbuscular mycorrhizal communities in reforestation plots on degraded pastures and in neighboring pristine tropical mountain rain forest. *Trop. Ecol.* 51, 125-148.
- HEMPEL, S., RENKER, C., BUSCOT, F., 2007: Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environ. Microbiol.* 9, 1930-1938.
- HIJRI, I., SYKOROVÁ, Z., OEHL, F., INEICHEN, K., MÄDER, P., WIEMKEN, A., REDECKER, D., 2006: Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol. Ecol.* 15, 2277-2289.
- HUSBAND, R., HERRE, E.A., TURNER, S.L., GALLERY, R., YOUNG, J.P.W., 2002: Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host associations over time and space in a tropical forest. *Mol. Ecol.* 11, 2669-2679.
- JALONEN, R., TIMONEN, S., SIERRA J., NYGREN, P., 2012: Arbuscular mycorrhizal symbioses in a cut-and-carry forage production system of legume tree *Gliricidia sepium* and fodder grass *Dichanthium aristatum*. *Agroforest. Syst.* 87, 319-330.
- JAMES, T.Y., LETCHER, P.M., LONGCORE, J.E., MOZLEY-STANDRIDGE, S.E., PORTER, D., POWELL, M.J., GRIFFITH, G.W., VILGALYS, R., 2006: A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98, 860-871.
- JANSA, J., MOZAFAR, A., ANKEN, T., RUH, R., SANDERS, I.R., FROSSARD, E., 2002: Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225-234.
- KÖNIG, S., WUBET, T., DORMANN, C.F., HEMPEL, S., RENKER, C., BUSCOT, F., 2010: TaqMan Real-Time PCR Assays to assess arbuscular mycorrhizal responses to field manipulation of grassland biodiversity, effects of soil characteristics, plant species richness, and functional traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3765-3775.
- KÖRNER, C.H., 2011: Coldest places on earth with angiosperm plant life. *Alpine Bot.* 121, 11-22.
- KOSKE, R.E., TESSIER, B., 1983: A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycol. Soc. Am. Newsl.* 34, 59.
- KOSKE, R.E., TEWS, L.L., 1987: Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi of Wisconsin sandy soils. *Mycologia* 79, 901-905.
- KOTTEK, M., GRIESER, J., BECK, C., RUDOLF, B., RUBEL, F., 2006: World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15, 259-263.
- KRÜGER, M., STOCKINGER, H., KRÜGER, C., SCHÜSSLER, A., 2009: DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183, 212-223.
- KRÜGER, M., KRÜGER, C., WALKER, C., STOCKINGER, H., SCHÜSSLER, A., 2012: Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 193, 970-984.
- LANDIS, F.C., GARGAS, A., GIVNISH, T.J., 2004: Relationships among arbuscular mycorrhizal fungi, vascular plants and environmental conditions in oak savannas. *New Phytol.* 164, 493-504.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., 2007: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- LEE, J., LEE, S., YOUNG, J.P.W., 2008: Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 339-349.
- LEKBERG, Y., MEADOW, J., ROHR, J.R., REDECKER, D., ZABINSKI, C.A., 2011: Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology* 92, 1292-1302.
- LEMOES, M.A., TABOSA, J.N., TAVARES FILHO, J.J., GAMA, E.E.G., ARCOVERDE, A.S.S., SANTOS, J.P.O., OLIVEIRA, S.A., 1995: São José - BR 5026 (seleção IPA): cultivar de milho desenvolvida para Pernambuco, selecionada contra ataque das lagartas do cartucho e da espiga. IPA - Comunicado Técnico 61.
- LIU, Y., HE, J., SHI, G., AN, L., ÖPIK, M., FENG, H., 2011: Diverse communities of arbuscular mycorrhizal fungi inhabit sites with very high altitude in Tibet Plateau. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 355-365.
- LUMINI, E., ORGIAZZI, A., BORRIELLO, R., BONFANTE, P., BIANCIOTTO, V., 2009: Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ. Microbiol.* 12, 2165-2179.
- LUMINI, E., VALLINO, M., ALGUACIL, M.M., ROMANI, M., BIANCIOTTO, V., 2011: Different farming and water regimes in Italian rice fields affect arbuscular mycorrhizal fungal soil communities. *Ecol. Applications* 21, 1696-1707.
- MAIA, L.C., TRUFEM, S.F.B., 1990: Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils in Pernambuco State, Brazil. *Rev. brasil. Bot.* 13, 89-95.
- MELLO, C.M.A., SILVA, G.A., VIEIRA, H.E.E., SILVA, I.R., MAIA, L.C., OEHL, F., 2012: *Fuscutata aurea*, a new species in the Glomeromycetes from cassava and maize fields in the Atlantic rainforest zone of Northeastern Brazil. *Nova Hedwigia* 95, 267-275.
- MILNE, I., WRIGHT, F., ROWE, G., MARSHAL, D.F., HUSMEIER, D., MCGUIRE, G., 2004: TOPALi, Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20, 1806-1807.
- MILLNER, P.D., MULBRY, W.W., REYNOLDS, S.L., 2001: Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of two ancient endomycorrhizal fungi, *Glomus occultum* and *Glomus brasilianum*. *FEMS Microbiol. Letters* 196, 165-170.
- MSISKA, Z., MORTON, J.B., 2009: Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial β -tubulin gene sequences. *Mycorrhiza* 19, 247-254.
- MORTON, J.B., REDECKER, D., 2001: Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93, 181-195.
- MUTHUKUMAR, T., UDAIYAN, K., 2000: Arbuscular mycorrhizas of plants in the Western Ghats region, Southern India. *Mycorrhiza* 9, 297-313.
- NELSON, W.L., MEHLICH, A., WINTERS, E., 1953: The development, evaluation and use of soil tests for phosphorus availability. In: Pierre, W.H., Norman, A.F. (eds.), *Soil and Fertilizers Phosphorus in Crop Nutrition*, 153-188. Aponany Monogr. Academic Press, New York.
- NOVAS, M.V., FRACCHIA, S., MENÉNDEZ, A., CABRAL, D., GODEAS, A., 2005: *Glomus patagonicum* sp. nov. (Glomerales), a new arbuscular mycorrhizal fungus from Argentina. *Nova Hedwigia* 80, 533-539.
- OEHL, F., SIEVERDING, E., 2004: *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *J. Appl. Bot. Food Qual.* - *Angew. Bot.* 78, 72-82.
- OEHL, F., WIEMKEN, A., SIEVERDING, E., 2003: *Glomus aureum*, a new sporocarpic species in the Glomales from European grasslands. *J. Appl. Bot.* - *Angew. Bot.* 77, 111-115.
- OEHL, F., REDECKER, D., SIEVERDING, E., 2005a: *Glomus badium*, a new sporocarpic mycorrhizal fungal species from European grasslands with higher soil pH. *J. Appl. Bot. Food Qual.* - *Angew. Bot.* 79, 38-43.

- OEHL, F., SIEVERDING, E., INEICHEN, K., RIS, E.-A., BOLLER, T., WIEMKEN, A., 2005b: Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol.* 165, 273-283.
- OEHL, F., SIEVERDING, E., INEICHEN, K., MÄDER, P., WIEMKEN, A., BOLLER, T., 2009: Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agric. Ecosyst. Environ.* 134, 257-268.
- OEHL, F., LACZKO, E., BOGENRIEDER, A., STAHR, K., BÖSCH, R., VAN DER HEIJDEN, M., SIEVERDING, E., 2010: Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil. Biol. Biochem.* 42, 724-732.
- OEHL, F., JANSÁ, J., INEICHEN, K., MÄDER, P., VAN DER HEIJDEN, M., 2011a: Arbuscular mycorrhizal fungi as bio-indicators in Swiss agricultural soils. *Agrarforschung Schweiz* 2, 304-311.
- OEHL, F., SIEVERDING, E., PALENZUELA, J., INEICHEN, K., SILVA, G.A., 2011b: Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2, 191-199.
- OEHL, F., SILVA, G.A., GOTO, B.T., SIEVERDING, E., 2011c: Glomeromycota: three new genera, and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116, 75-120.
- OEHL, F., SILVA, G.A., SÁNCHEZ-CASTRO, I., GOTO, B.T., MAIA, L.C., VIEIRA, H.E.E., BAREA, J.M., SIEVERDING, E., PALENZUELA, J., 2011d: Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation, with three genera nova. *Mycotaxon* 117, 297-316.
- OEHL, F., PALENZUELA, J., SÁNCHEZ-CASTRO, I., KUSS, P., SIEVERDING, E., SILVA, G.A., 2012: *Acaulospora nivalis*, a new fungus in the Glomeromycetes, characteristic for high alpine and nival altitudes of the Swiss Alps. *Nova Hedwigia* 95, 105-122.
- ÖPIK, M., VANATOA, A., VANATOA, E., MOORA, M., DAVISON, J., KALWIJ, J.M., REIER, Ü., ZOBEL, M., 2010: The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* 188, 223-241.
- ORGIAZZI, A., LUMINI, E., NILSSON, R.H., GIRLANDA, M., VIZZINI, A., BONFANTE, P., BIANCIOTTO, V., 2012: Unravelling soil fungal communities from different mediterranean land-use backgrounds. *PLoS ONE* 7, e34847.
- PALENZUELA, J., FERROL, N., BOLLER, T., AZCÓN-AGUILAR, C., OEHL, F., 2008: *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub-land in the National Park of Sierra de Baza (Granada, Spain). *Mycologia* 100, 296-305.
- PALENZUELA, J., BAREA, J.M., FERROL, N., AZCÓN-AGUILAR, C., OEHL, F., 2010: *Entrophospora nevadensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus, from Sierra Nevada National Park (southeastern Spain). *Mycologia* 102, 624-632.
- PICONE, C.M., 2000: Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungus spores in Tropical forest and pasture. *Biotropica* 32, 734-750.
- RENKER, C., HEINRICHS, J., KALDORF, M., BUSCOT, F., 2003: Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13, 191-198.
- RENKER, C., BLASZKOWSKI, J., BUSCOT, F., 2007: *Paraglomus laccatum* comb. nov. a new member of Paraglomeraceae (Glomeromycota). *Nova Hedwigia* 84, 395-407.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P., 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- ROSE, S.L., TRAPPE, J.M., 1980: Three endomycorrhizal *Glomus* species associated with actinorhizal shrubs. *Mycotaxon* 10, 413-420.
- SASVÁRI, Z., HORNOK, I., POSTA, K., 2011: The community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of maize grown in a 50-year monoculture. *Biol. Fert. Soils* 47, 167-176.
- SCHECHTER, S.P., BRUNS, T.D., 2008: Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol. Ecol.* 17, 3198-3210.
- SCHÜSSLER, A., SCHWARZOTT, D., WALKER, C., 2001: A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421.
- SHI, Z., LIYUN, Z., FENG, G., PETER, C., TIAN, C., LI, X., 2006: Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with desert ephemerals growing under and beyond the canopies of Tamarisk shrubs. *Chin. Sci. Bull.* 51, 132-139.
- SIEVERDING, E., 1989: Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29, 369-390.
- SIEVERDING, E., 1991: Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems. Technical Cooperation (GTZ). Eschborn. Friedland, Bremer, Rossdorf, TZ-Verlagsgesellschaft. Germany.
- SIEVERDING, E., OEHL, F., 2004: *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *J. Appl. Bot. Food Qual.* – *Angew. Bot.* 78, 72-82.
- SILVA, D.K.A., PEREIRA, C.M.R., SOUSA, R.G., SILVA, G.A., OEHL, F., MAIA, L.C., 2012: Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in restinga and dunes areas in Brazilian Northeast. *Biodiv. Conserv.* 21, 2361-273.
- SILVA, G.A., TRUFEM, S.B.F., SAGGIN Jr, O.J., MAIA, L.C., 2005: Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza* 15, 47-53.
- SILVA, G.A., LUMINI, E., MAIA, L.C., BONFANTE, P., BIANCIOTTO, V., 2006: Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16, 183-189.
- SMITH, S.E., READ, D.J., 2008: *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. Academic Press, London, UK.
- SPAIN, J.L., 1990: Arguments for diagnoses based on unaltered wall structures. *Mycotaxon* 38, 71-76.
- SPAIN, J.L., 2003: Emendation of *Archaeospora* and its type species, *Archaeospora trappei*. *Mycotaxon* 87, 109-112.
- SPAIN, J.L., MIRANDA, J.C., 1996: *Glomus brasilianum*: an ornamented species in the Glomeraceae. *Mycotaxon* 60, 137-142.
- SADRAVI, M., 2006: Arbuscular mycorrhizal fungi of wheat fields in the Golestan Province. *Rostaniha* 7, 121-126.
- SWOFFORD, D.L., 2003: PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- STÜRMER, S.L., SIQUEIRA, J.O., 2011: Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza* 21, 255-267.
- STUTZ, J.C., MORTON, J.B., 1996: Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular mycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Can. J. Bot.* 74, 1883-1889.
- STUTZ, J.C., COPEMAN, R., MARTIN, C.A., MORTON, J.B., 1999: Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Namibia, Africa. *Can. J. Bot.* 78, 237-245.
- TADYCH, M., BLASZKOWSKI, J., 2000: Arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) of the Slowinski National Park, Poland. *Mycotaxon* 74, 463-482.
- TCHABI, A., COYNE, D., HOUNTONDJI, F., LAWOUIN, F., WIEMKEN, A., OEHL, F., 2008: Arbuscular mycorrhizal fungal communities in sub-Saharan savannas of Benin, West Africa, as affected by agricultural land use intensity and ecological zone. *Mycorrhiza* 18, 181-195.
- TCHABI, A., BURGER, S., COYNE, D., HOUNTONDJI, F., LAWOUIN, L., WIEMKEN, A., OEHL, F., 2009: Promiscuous arbuscular mycorrhizal symbiosis of yam (*Dioscorea* spp.), a key staple crop in West Africa. *Mycorrhiza* 19, 375-392.
- TORRECILLAS, E., ALGUACIAL, M.M., ROLDÁN, A., 2012: Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6180-6186.
- TURNAU, K., RYSZKA, P., GIANINAZZI-PEARSON, V., VAN TUINEN, D., 2001: Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10, 169-174.
- VAN TUINEN, D., ZHAO, B., GIANINAZZI-PEARSON, V., 1998: PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma, A.K. (ed.),

- Mycorrhizal Manual, 387-399. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- WALKER, C., 1982: Species in the Endogonaceae: a new species (*Glomus occultum*) and a new combination (*Glomus geosporum*). Mycotaxon 15, 47-61.
- WALKER, C., 2008: *Ambispora* and *Ambisporaceae* resurrected. Mycol Res. 112, 297-298.
- WALKER, C., RHODES, L.C., 1981: *Glomus albidum*: a new species in the Endogonaceae. Mycotaxon 12, 509-514.
- WALKER, C., MIZE, C.W., McNABB, H.S., 1982: Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. Can. J. Bot. 60, 2518-2529.
- WALKER, C., BŁASZKOWSKI, J., SCHWARZOTT, D., SCHÜSSLER, A., 2004: *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and Gerde-manniaceae fam. nov., a new family in the Glomeromycota. Mycol Res. 108, 707-718.
- WANG, F.Y., SHI, Z.Y., 2008: Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in China: a review. Adv. Environ. Biol. 2, 31-39.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications, 315-322. Academic Press, San Diego.
- WIRSEL, S.G.R., 2004: Homogenous stands of a wetland grass harbour diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 48, 129-138.
- WU, C.-G., LIU, Y.-S., HWUANG, Y.-L., WANG, Y.-P., CHAO, C.-C., 1995: Glomales of Taiwan: V. *Glomus chimonobambusae* and *Entrophospora kentinensis*, spp. nov. Mycotaxon 53, 283-294.
- Address of the correspondonding author:
E-mail: fritz.oehl@agroscope.admin.ch