



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E MOLECULARES DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão

**Recife
Dezembro/2006**

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E MOLECULARES DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Leonor Costa Maia

Co-orientadores: Dr. Hélio Almeida Burity

Dra. Márcia Vanusa da Silva

**Recife
Dezembro/2006**

Mergulhão, Adália Cavalcanti do Espírito Santo.

**Aspectos ecológicos e moleculares de fungos micorrízicos
arbusculares/ Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão – Recife: O
Autor, 2006.**

152 folhas : il., fig., tab.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.
Microbiologia, 2007.**

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ecologia 2. Fungos 3. Micorriza arbuscular I. Título.

**582.28
589.2**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-010**

Aspectos ecológicos e moleculares de fungos micorrízicos arbusculares

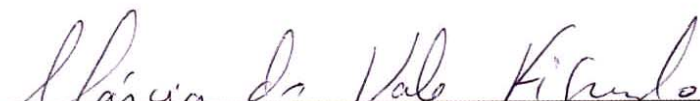
Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão

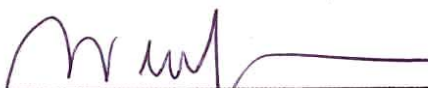
Comissão examinadora

Membros Titulares


Dra. Leonor Costa Maia (Depto. de Micologia, UFPE – Orientadora)


Dra. Elaine Malosso (Depto. de Micologia, UFPE)


Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Empresa – IPA)


Dra. Sandra Farto Botelho Trufem (Universidade de São Marcos)


Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Depto. de Micologia, UFPE)

Membros suplentes


Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva (Depto. de Micologia, UFPE)


Dr. José Luiz de Lima Filho (Depto. de Bioquímica, UFPE)

“Procure descobrir o seu caminho na vida. Ninguém é responsável por nosso destino, a não ser nós mesmos. Nós é que temos que descobrir a estrada e segui-la com os nossos próprios pés. Desperte para a vida, para a Verdadeira Vida. E, se deseja felicidade, lembre-se: você é o único responsável por seu destino. Supere as dificuldades, vença os obstáculos e construa sua vida”.

(Madre Tereza de Calcutá)

À minha mãe (Adélia), ao meu pai (Albérico in memoriam), aos meus irmãos (Albérico e Almério), ao meu esposo (Roberto) e à minha filha Amália (uma dádiva de Deus).

Dedico

Agradecimentos

A Deus todo poderoso que tudo dá e nada recebe, obrigada pela minha vida e por tudo que tenho recebido nesta existência para minha evolução espiritual.

À minha família, pelo apoio e conforto nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Pernambuco - UFPE e à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa e concessão da bolsa.

À Dra. Leonor Costa Maia, pela oportunidade e orientação no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Hélio Almeida Burity, pelos anos de convívio e de amizade e pela confiança sempre depositada no meu trabalho.

À Dra. Márcia Vanusa da Silva, pelos ensinamentos em Genética Molecular e pelas valiosas sugestões.

Ao Diretor de Pesquisa do IPA, Dr. Antonio Félix da Silva, pelo apoio.

Aos professores Márcia Figueiredo, Uided Cavalcante, Elaine Malosso, Gladstone Silva, Sandra Trufem, Everardo Sampaio, Neiva Tinti e Sônia Pereira, pela transmissão de conhecimentos e pela freqüente disponibilidade em sempre servir.

Aos pesquisadores do IPA José Nildo Tabosa, José de Paula, Maria do Carmo Lyra, Waldemar Oliveira, Venézio dos Santos, que nunca mediram esforços para me ajudar.

Ao Laboratório de Botânica – IPA, pelo auxílio na identificação do material vegetal, em especial à Dra. Rita de Cássia Pereira e ao bolsista Newton Alves.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia do Solo - IPA, em especial à Maria do Carmo, Eidy Simões, Rita Lima, Mario Leandro e a Luiza Bastos, pela amizade e companheirismo de todas as horas.

A todos que fazem o Laboratório de Micorriza - UFPE: Fábio, Nicácio, João, Moacir, Renata, Priscila, Marilene, Érika, Aline, Maryluce, Cláudia, Thiago, Cynthia, Graziela, Katiúcia, Bruno Tomio, Catarina, Sueli e Danielle Silva.

Aos colegas do Laboratório de Genoma - IPA: Daniel, Clébia, Aníbia, Rômulo, Virginia, Tatiane, Daniele, Francinete e Maria do Livramento (Lili).

Aos colegas de turma do doutorado: Daise, Guaraná, Norma, Paulo, Emília, Eduardo, Fernando, Francisco, Andréa, Mario e Flávia, pela convivência.

Aos funcionários e colegas do IPA: Almira Galdino, Sônia dos Santos, Maria do Carmo, Anna Maria, Marilene Pimentel, Ana Lemos, Fernando Gallindo, Antonio Raimundo, Liane Maranhão e Deise Passos, pelo convívio.

Aos funcionários da Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFPE: Adenilda Eugênia e Liane Santos, pelo apoio.

E, finalmente, a todos aqueles que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO GERAL	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO GERAL	XVII
1. REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1 Origem, evolução e classificação dos FMA	20
1.2 Métodos morfológicos e moleculares utilizados na identificação dos FMA	22
1.3 Diversidade de espécies de FMA	27
1.4 Distribuição de FMA no Brasil	29
1.5 Importância dos FMA em solos degradados	33
1.6 Método quantitativo para contagem de microrganismos	37
1.7 Glomalina: a glicoproteína dos FMA	40
1.8 Atividade microbiana do solo	41
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO I	
Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas impactadas por mineração gesseira na região semi-árida de Pernambuco	
Resumo	69
Introdução	70
Material e Métodos	72
Resultados	75
Discussão	78
Referências Bibliográficas	83
CAPÍTULO II	
Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas nativa e impactadas por mineração gesseira em Araripina, Pernambuco	
Abstract	103
Resumo	103
Introdução	105

	Pág.
Material e Métodos	107
Resultados e Discussão	109
Conclusões	113
Agradecimentos	113
Literatura citada	114
CAPÍTULO III	
Produção de proteína do solo relacionada à glomalina e atividade microbiana em solos impactados por mineração de gesso, Araripina-PE	
Resumo	123
Introdução	124
Material e Métodos	126
Resultados e Discussão	129
Conclusões	134
Agradecimentos	134
Referências Bibliográficas	134
CAPÍTULO IV	
Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for identification of arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid soils	
Abstract	145
Introduction	146
Materials and Methods	146
Results and Discussion	147
Acknowledgements	149
Resumo	149
References	149
CONCLUSÕES GERAIS	152
ANEXOS	153

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Árvore filogenética representando as relações em Glomeromycota (Walker & Schüßler, 2004). 22

Figura 2. Representação de uma unidade de rDNA mostrando o ITS (espaços internos transcritos) e a posição de anelamento dos principais “primers”. 25

CAPITULO I

Figura 1. Mapa do Estado de Pernambuco destacando o Município de Araripina onde foram realizadas as coletas de solos e de plantas: (AN) = caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração. 88

Figura 2. Densidade de esporos de FMA por família, nas amostras de solo coletadas nos dois períodos de amostragem. (AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração. 95

Figura 3. Representatividade de cada gênero de FMA em relação ao número de espécies registradas nas áreas estudadas em Araripina - PE, nos dois períodos de coleta (chuvoso e seco). 95

Figura 4. Índice de abundância e frequência (IAF) de espécies de FMA, com valores de importância entre médio e grande de áreas nativa preservada e impactadas por mineração de gipsita em Araripina, PE. (AN) = área de caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito. 97

Figura 5. Fotomicrografias de espécies de FMA presentes em área nativa e impactada pela mineração de gesso em Araripina, PE: 1) *Acaulospora excavata*: aspecto geral do esporo; 2) *Acaulospora excavata*: detalhe da ornamentação da parede do esporo; 3) *Glomus intraradices*: esporos em raiz de amendoim; 4) *Glomus intraradices*: aspecto geral do esporo; 5) *Scutellospora gregaria*: aspecto geral do esporo com bulbo suspensor; 6) *Acaulospora scrobiculata*: aspecto geral do esporo com camadas internas da parede com reação em Melzer; 7) *Paraglomus occultum*: aspecto geral dos esporos; 8) *Glomus etunicatum*: aspecto geral do esporo. 100

CAPITULO III

Figura 1. Glomalina facilmente extraível (GFE) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por atividade gesseira em Araripina, PE. (AN) = caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito.

142

Figura 2. Glomalina total (GT) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por atividade gesseira em Araripina, PE, independentemente do período de coleta. (AN) = caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito.

142

CAPITULO IV

Figure 1. PCR amplification of the ITS regions of AMF isolates using primers ITS1/ITS4. M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*.

148

Figure 2. ARDRA banding patterns of the ITS fragments amplified from AMF spores DNA. M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*.

148

Figure 3. *MboI* restriction profile of the ITS fragments amplified from AMF spores DNA, M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*.

148

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro subáreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE	89
Tabela 2. Espécies de plantas em área com mineração de gipsita, em Araripina, Pernambuco, registradas em dois períodos de amostragem (chuvoso e seco)	90
Tabela 3. Espécies de FMA em subáreas de mineração de gipsita no sertão de Araripina, Pernambuco, coletadas em dois períodos de amostragem (chuvoso e seco)	92
Tabela 4. Densidade de esporos ($50g^{-1}$ solo) por espécie de FMA nas amostras de solo coletadas no período chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004) em áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, após três ciclos de multiplicação, em casa de vegetação	94
Tabela 5. Densidade relativa de esporos (DRi) e frequência de ocorrência (F) das espécies de FMA nos períodos de amostragem chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004), em áreas nativa e impactadas por mineração de gipsita, Araripina-PE	96
Tabela 6. Percentual de similaridade vegetal entre as áreas estudadas, em cada período de amostragem (chuvoso e seco)	98
Tabela 7. Percentual de similaridade de FMA entre as áreas estudadas, em cada período de amostragem (chuvoso e seco)	98
Tabela 8. Índice de diversidade (Shannon-Wiener H') de espécies de FMA em áreas de caatinga preservada e impactadas por mineração de gipsita, Araripina/PE, em dois períodos de amostragem	98
Tabela 9. Índice de dominância (Simpson C) de espécies de FMA em áreas de caatinga preservada e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, em dois períodos de amostragem	99

CAPITULO II

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro subáreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE	117
Tabela 2. Espécies de plantas em subáreas de mineração de gipsita no sertão de Araripina, Pernambuco, coletadas nos dois períodos de amostragem	118

Tabela 3. Número mais provável de propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, em dois períodos de coleta	119
Tabela 4. Colonização radicular e número de esporos de FMA em solos de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, obtidos sem ciclos de multiplicação, independentemente do período de coleta	120
Tabela 5. Colonização radicular e número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em solos de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, obtidos sem ciclo de multiplicação, independentemente da área de coleta	120
Tabela 6. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA (período chuvoso e seco), número de esporo e percentual de colonização radicular. * = correlação significativa ($P < 0,05$)	120
 CAPITULO III	
Tabela 1. Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro subáreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE	139
Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana e respiração basal em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, independentemente do período de amostragem	140
Tabela 3. Número mais provável de propágulos de fungos em amostra de solo de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, em dois períodos de coleta	140
Tabela 4. Número mais provável de propágulos de bactérias e actinomicetos em amostra de solos de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, determinados pelo método de plaqueamento de gotas, independentemente do período de coleta	140
Tabela 5. Atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE	141
Tabela 6. Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) entre as variáveis estudadas ($P < 0,05$)	141

Resumo Geral

RESUMO GERAL

Foi analisada a influência da atividade gesseira sobre a ocorrência, a diversidade, o potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), e o estado biológico dos solos. Além disso, utilizou-se a técnica ARDRA na tentativa de diferenciar espécies de FMA encontradas nas áreas de estudo. Coletas de solo foram realizadas nos períodos chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004), em quatro áreas: uma com caatinga nativa preservada (AN) e três em mineradora de gesso: interface entre o depósito de rejeito e área de caatinga degradada pela mineração (AI); arredores da mina (AM) e rejeito (AR). A mineração diminuiu a diversidade de FMA e de plantas nas três subáreas, em relação à caatinga nativa preservada. Foram identificadas 27 e 29 espécies de plantas e 29 e 28 espécies de FMA respectivamente nos períodos chuvoso e seco. Entre os FMA, *Glomus intraradices* e *Paraglomus occultum* foram os melhores representados tolerando as condições edáficas das subáreas impactadas e desse modo mostraram potencial para utilização em programas de revegetação em áreas similares. Baixos índices de similaridade vegetal e de FMA foram verificados entre a área nativa e as afetadas pela mineração. Maior esporulação dos FMA ocorreu no período chuvoso, enquanto o número mais provável (NMP) de propágulos de fungo (incluindo FMA) e a colonização radicular foram maiores no período seco. Houve correlação positiva entre o NMP de FMA e o número de esporos nos dois períodos de coleta. No período chuvoso, o NMP de FMA foi negativamente correlacionado com a colonização radicular. A atividade antrópica exercida nas áreas em estudo teve forte impacto negativo sobre a microbiota do solo, reduzindo o número de bactérias, actinomicetos e fungos, a atividade e a biomassa microbianas. A atividade gesseira reduziu a produção de glomalina facilmente extraível (GFE) e total (GT) em relação ao encontrado na área de caatinga nativa. Esta glicoproteína pode ser utilizada como indicador da qualidade edáfica, considerando que apontou diferenças entre os solos impactados e o nativo, preservado. Alguns FMA obtidos nas áreas de estudo foram distinguidos pela técnica ARDRA-ITS, que mostrou potencial como marcador capaz de diferenciar espécies com elevada afinidade filogenética.

Palavras-chave: ecologia, diversidade, micorriza arbuscular.

ABSTRACT

The effect of the gypsum mining activity on occurrence, diversity and potential infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), as well as on soil quality were determined. Besides, the ARDRA technique was used to distinguish species of AMF found in the studied area. Soil samples were collected during the wet raining (December/2003) and dry seasons (September/2004) in four areas: one with native, preserved “caatinga” vegetation (AN) and three at the mine: interface between the waste deposit and area of degraded caatinga (AI); surrounds of the mine (AM) and waste area (AR). The mining activity decreased AMF and plant diversity in the three areas in relation to the preserved caatinga. Twenty seven and 29 plant species and 29 and 28 AMF species were identified respectively in the raining and dry seasons. Among the AMF, *Glomus intraradices* and *Paraglomus occultum* were the most commonly found, tolerating the soil conditions of the impacted area, thus showing potential for use in revegetation programs in similar areas. Low indexes of similarity between plants and AMF from the native area and those affected by mining were found. Higher AMF sporulation occurred in the raining period, while the most probable number (NMP) of fungi (including AMF) and root colonization were higher in the dry season. A positive correlation between the NMP of AMF and number of spores was found in the two sampling collection periods. In the raining season the NMP of AMF was negatively correlated with root colonization. The mining activity produced a strong negative impact over the soil microbiota, reducing the number of bacteria, actinomycetes and fungi plus, the activity and microbial biomass. Moreover, this mining impact reduced production of easily extractable glomalin (EEG) and total (GT) in relation to the values registered in the native area. This glycoprotein can be used as indicator of soil quality, considering the presented differences between the impacted and preserved soils. Some AMF obtained in the study areas were distinguished by the ARDRA-ITS technique, which has a potential to be used as a marker able to distinguish species with high phylogenetic affinity.

Key words: ecology, diversity, arbuscular mycorrhiza.

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A maior parte do estado de Pernambuco encontra-se na região semi-árida. Dos 185 municípios, 145 estão em áreas com risco de desertificação e há registro de que mais de 4.000.000 ha em PE estão degradados (SECTMA-PE, 2006). A região do Araripe, no sertão do estado, é constituída pelo pólo gesseiro, que possui 40 % das reservas de gipsita do mundo e atende a 95% da demanda de gesso do mercado nacional. A área sofre grande pressão antrópica sobre os recursos naturais, especialmente os florestais. O processo de extração da gipsita resulta em áreas degradadas pelo consumo de lenha, e a exploração do gesso gera grandes quantidades de resíduos originando problemas de saúde nos trabalhadores. Atualmente, devido à utilização inadequada de seus recursos naturais, as espécies de fauna e flora nativas do Araripe encontram-se ameaçadas de extinção (http://www.sectema.pe.gov.br/acoes_todos.asp. Acesso em 19/07/2006).

Estudos têm demonstrado o impacto da mineração sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA): a camada superficial do solo original é substituída por outra com baixo número de propágulos (White et al., 1989), a rede micelial é destruída (Jasper et al., 1994) e os baixos valores de pH encontrados nos solos degradados (Mehrotra, 1998) reduzem a densidade e a diversidade desses fungos.

Como os FMA representam importante mecanismo de adaptação trófica das plantas superiores na competição por fatores limitantes de crescimento que permitem a sobrevivência e evolução no ambiente terrestre, a introdução destes simbiossiontes é crucial na reabilitação de solos degradados. Os FMA podem facilitar o crescimento das plantas, com benefícios na reposição de matéria orgânica do solo (substrato para a microbiota) que é essencial para manter a funcionalidade dos ecossistemas (Siqueira & Soares, 2005), diminuindo os efeitos negativos da compactação do solo, facilitando a reciclagem de nutrientes, promovendo a formação e a estabilidade de agregados e induzindo maior tolerância das plantas ao déficit hídrico (Tisdall & Oades, 1979; Rillig, 2004) e salinos (Maia & Yano-Melo, 2005).

É imprescindível considerar a importância que a ecologia dos FMA assume quando o interesse está no manejo agrícola e ambiental de tais fungos, visando à otimização dos efeitos benéficos da simbiose (Silveira, 1998). Desta forma, é preciso conhecer as espécies de FMA que ocorrem em regiões impactadas, tais como a de mineração de gesso, sendo necessários extensivos estudos morfológicos e moleculares para identificação das espécies. É urgente

também a caracterização da diversidade destes fungos, para definir estratégias de conservação.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar aspectos ecológicos de FMA em áreas sob impacto ambiental pela mineração de gesso; b) verificar a influência da atividade gesseira sobre a ocorrência, a diversidade e o potencial de infectividade de FMA; c) avaliar o estado biológico dos solos e a produção de glomalina por FMA nas áreas em estudo, fornecendo subsídios para recomendação dessa proteína como indicador bioquímico da qualidade do solo; d) aplicar a técnica ARDRA (Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) visando diferenciar espécies de FMA encontradas nas áreas estudadas.

Revisão de Literatura

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Origem, evolução e classificação dos FMA

Micorrizas (do grego, mykes = fungo, rhiza = raiz) são associações simbióticas entre certos fungos do solo e raízes de plantas. Com base na morfoanatomia das raízes colonizadas, as micorrizas são agrupadas em ectomicorrizas, ectendomicorrizas, endomicorrizas. As ectomicorrizas são caracterizadas pela formação de manto micelial sobre a raiz, penetração apenas intercelular do córtex pelo micélio fúngico, com a formação da “rede de Hartig”. As ectendomicorrizas são geralmente ectomicorrizas com penetração intracelular, havendo diferenças anatômicas de acordo com a planta hospedeira. As endomicorrizas mais comuns são as do tipo arbuscular, formada por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que penetram inter e intracelularmente no córtex da raiz hospedeira (Siqueira, 1994). As micorrizas arbusculares encontram-se distribuídas na maioria dos ecossistemas, desde os florestais aos desérticos, em regiões tropicais, temperadas e árticas e representam a mais ampla associação entre plantas e fungos encontrados na natureza (Souza & Silva, 1996). Os FMA surgiram há mais de 400 milhões de anos, coincidindo com o surgimento das plantas terrestres (Simon et al., 1993). A origem dos FMA foi confirmada por análises em materiais fósseis do Devoniano, os quais revelaram a presença de estruturas fúngicas similares àquelas formadas pelos atuais fungos micorrízicos (Pirozynski, 1981). Recentemente Dotzler et al. (2006) encontraram registros fósseis de uma espécie ancestral de *Scutellospora*, a qual batizaram de *Scutellosporytes*, enfatizando ainda mais a teoria.

O primeiro gênero de FMA (*Glomus*) foi descrito em 1845, por Tulasne & Tulasne (apud Silva, 2004) com as espécies *G. macrocarpum* Tulasne & Tulasne e *G. microcarpum* Tulasne & Tulasne. O gênero *Sclerocystis* Berkeley & Broome (1873) foi descrito 28 anos depois. Isso ocorreu antes mesmo do termo micorriza ter sido criado (Frank, 1885 apud Silva, 2004) considerando que a natureza da associação ainda não era bem compreendida. Em 1922, Thaxter publicou uma revisão sobre Endogonaceae, considerando quatro gêneros: *Endogone* (no qual foi incluído *Glomus*), *Sphaerocreas*, *Sclerocystis* e *Glaziella* (Allen, 1996). Revisando a família Endogonaceae, Gerdemann & Trappe (1974) forneceram até hoje as bases para identificação e classificação dos FMA. Esses autores separaram o gênero *Glomus* de *Endogone* e criaram os gêneros *Acaulospora* e *Gigaspora*, todos incluídos em Endogonaceae, ficando desta forma os FMA agrupados nos gêneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Sclerocystis*. Em 1979 Ames & Schneider descreveram o gênero *Entrophospora*.

Walker & Sanders (1986) dividiram as espécies de *Gigaspora* em dois gêneros com base na presença (*Scutellospora*) ou ausência de placa germinativa (*Gigaspora*) e parede interna nos esporos. Os FMA continuaram sendo agrupados na família Endogonaceae até que, em 1989, Pirozynski & Dalpé, com base em registros fósseis, propuseram a família Glomaceae, com os gêneros *Glomus* e *Sclerocystis* e mantendo os demais gêneros em Endogonaceae. Morton (1990) estabeleceu que os FMA formavam um grupo monofilético, devido à escassa relação com os membros de Endogonales. No mesmo ano, Morton & Benny (1990) agruparam os FMA na ordem *Glomales*, constituída pelas subordens Glomineae (Glomaceae e Acaulosporaceae) e Gigasporineae (Gigasporaceae), com seis gêneros.

A separação entre os gêneros *Glomus* e *Sclerocystis* tornou-se controversa quando Almeida & Schenck (1990) transferiram todas as espécies de *Sclerocystis*, com exceção de *S. coremioides* Berkeley & Broome, para *Glomus*. Mais recentemente, Redecker et al. (2000 b) demonstraram que a sequência do rDNA 18S coloca a espécie dentro do gênero *Glomus*, fazendo a transferência para *Glomus coremioides* (Berkeley & Broome) Morton & Redecker. Com base no seqüenciamento do rDNA 18S e em dados morfológicos, Morton & Redecker (2001) propuseram mudanças na classificação dos FMA: criaram duas novas famílias e gêneros: Archaeosporaceae (*Archaeospora* Morton & Redecker) e Paraglomaceae (*Paraglomus* Morton & Redecker), com as espécies *Archaeospora leptoticha* Morton & Redecker para abrigar *Glomus leptotichum* Schenck & Smith, *Acaulospora gerdemanii* Schenck & Nicolson e *Archaeospora trappei* Spain, substituindo *Acaulospora trappei* Morton & Redecker, enquanto *Paraglomus occultum* Morton & Redecker e *P. brasilianum* Morton & Redecker abrigaram *Glomus occultum* Walker e *G. brasilianum* Spain & Miranda. *Geosiphon pyriforme* Schüßler, antes em Zygomycetes, passou a ser considerado na classificação do grupo, porém sem definição exata quanto ao posicionamento.

Schüßler et al. (2001) forneceram informações essenciais para a atual classificação dos FMA, com a criação do filo Glomeromycota, compreendendo apenas uma classe (Glomeromycetes) e quatro ordens: Diversisporales (Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae e Geosiphonaceae), Archaeosporales (Archaeosporaceae), Paraglomerales (Paraglomeraceae) e Glomerales (Glomeraceae). Também foi criada uma família para *Glomus pyriforme* (Geosiphonaceae) (Figura 1). Oehl & Sieverding (2004) com base em dados moleculares criaram o gênero *Pacispora* Sieverd. & Oehl e o incluíram na família Glomeraceae. *Glomus scintillans* Rose & Trappe, *G. dominikii* Blaszczyk e *G. chimonobambusae*

Wu & Lin foram transferidos para *Pacispora* e quatro novas espécies foram descritas: *Pacispora franciscana* Sieverd. & Oehl, *P. rubigina* Sieverd. & Oehl, *P. coraloidea* Sieverd. & Oehl e *P. boliviana* Sieverd. & Oehl. Com base em dados moleculares, Walker & Schüßler (2004) propuseram a família Pacisporaceae. Esses autores validaram a família Diversisporaceae e a ordem Diversisporales, transferindo *Glomus spurcum* Pfeiffer, Walker & Bloss para *Diversispora spurca* Pfeiffer, Walker & Bloss. Recentemente foi proposta uma nova família (Entrophosporaceae) e dois novos gêneros (*Kuklospora*, *Intraspora*), sendo *Kuklospora* incluída em Acaulosporaceae e *Intraspora* em Archaeosporaceae. Contudo, ainda não há uma árvore filogenética incluindo essa proposta (Sieverding & Oehl, 2006).

A taxonomia é uma ciência dinâmica, o que resulta em mudanças contínuas na classificação e nomenclatura. Recentemente, Goto & Maia (2006) propuseram um novo nome para os esporos dos FMA, que receberam a denominação glomerosporos, por constituir um filo separado do Zigomycota. Hoje há mais de 189 espécies de FMA catalogadas. A partir de dados moleculares essas espécies foram agrupadas no filo Glomeromycota, porém ainda existem dados não elucidados acerca de sua classificação.

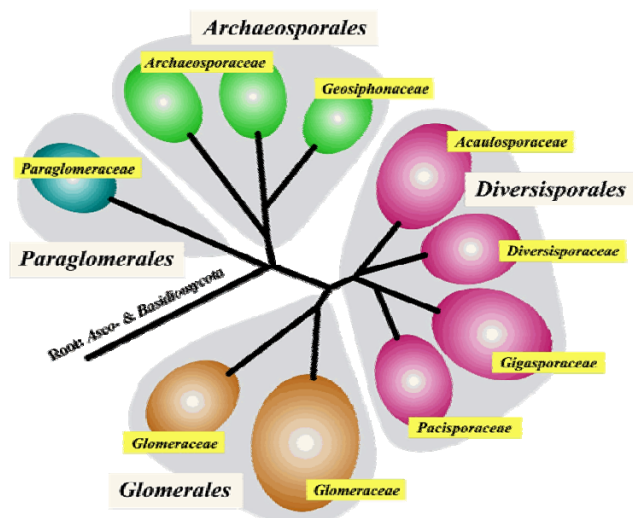


Figura 1. Árvore filogenética representando as relações em Glomeromycota (Walker & Schüßler, 2004) (Fonte: www.tu-darmstadt.de/fb/bio/bot/schuessler/amphylo/amphylo_home.html)

1.2 Métodos morfológicos e moleculares utilizados na identificação dos FMA

De acordo com o modo de formação dos esporos, Tulasne & Tulasne (1845 apud Silva, 2004) descreveram o gênero *Glomus*. Em 1922, revisando a família Endogonaceae, Thaxter transferiu os membros de *Glomus* para *Endogone* com base na semelhança entre os esporocarpos de *Endogone* e *Sclerocystis*. Gerdemann & Trappe (1974) promoveram uma

grande revolução na taxonomia dos FMA, distribuindo os gêneros na família Endogonaceae e fornecendo bases para identificação e descrição das espécies. Walker (1983) nomeou e representou graficamente diferentes “tipos de parede” nos FMA. Até hoje a identificação dos FMA está baseada nos padrões descritos por Walker. Atualmente são conhecidos nove tipos de “parede”: evanescente, amorfa, coriácea, expansiva, membranosa, unitária, laminada, chanfrulada e germinativa (Walker, 1983; Walker, 1986; Morton, 1986; Berch & Koske, 1986; Spain et al., 1989; Koske & Gemma, 1995). Entretanto, um novo padrão na descrição de espécies com base na ontogenia do esporo foi proposto por vários autores (Franke & Morton, 1994; Morton, 1995; Bentivenga & Morton, 1995; Stürmer & Morton, 1997/1999), sendo considerado que a parede do esporo estaria distribuída em apenas dois grupos principais: “parede estrutural” e “parede germinativa”, subdivididas em camadas. Além dos estudos ontogenéticos, estudos de ultraestrutura (Mosse, 1970 a e b; Maia & Kimbrough, 1993/1994; Maia et al., 1994) têm contribuído para o entendimento das estruturas subcelulares da parede dos esporos de FMA.

A impossibilidade de crescimento dos FMA em meios sintéticos na ausência de raízes metabolicamente ativas e a não caracterização da fase sexuada em seu ciclo de vida, faz com que a identificação e classificação destes fungos esteja baseada, quase que exclusivamente, na morfologia e estrutura de seus esporos vegetativos (Morton, 1993). As dificuldades de cultivar os FMA “in vitro” representam um obstáculo ainda não superado, limitando os estudos de sua biologia e aplicação biotecnológica. A identificação e a caracterização dos fungos são os primeiros passos para seu estudo. Segundo Morton & Benny (1990), a identificação dos FMA ao nível genérico é baseada na ontogenia dos esporos. Caracteres relacionados com as propriedades da parede dos esporos tais como espessura, pigmentação, reações histoquímicas, subunidades e ornamentação podem ser utilizadas para identificação ao nível específico (Bentivenga & Morton, 1994). Ainda segundo esses autores, a forma e o comprimento das ornamentações das paredes celulares diferem bastante a ponto de separar gêneros, porém estes caracteres não são taxonomicamente informativos para separar espécies.

A caracterização fenotípica pode ser influenciada por condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento dos esporos, introduzindo problemas para a identificação precisa de populações de FMA oriundas do campo, bem como para o acompanhamento de espécies introduzidas. Além disso, é extremamente difícil distinguir as espécies de FMA durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares (Salles & Souza, 1998). Segundo Merryweather &

Fitter (1998), a produção dos esporos nem sempre está relacionada com a colonização das raízes e antes que a esporulação ocorra, a estrutura intra-radical do FMA permite apenas em alguns casos a identificação da família, o que inviabiliza a identificação de espécies na ausência do esporo. Além do mais, várias espécies recentemente caracterizadas não coram com os procedimentos padrões (Redecker et al., 2000 a). Atualmente, diversas técnicas moleculares vêm sendo empregadas no estudo de FMA, visando um maior conhecimento de aspectos filogenéticos, citogenéticos, funcionais e ecológicos. A biologia molecular tem permitido identificar fungos a partir de esporos coletados diretamente do campo e também identificar FMA que estão colonizando as raízes. Deste modo, espécies ativas de FMA dentro das raízes podem ser apenas analisadas através dos métodos moleculares. Os métodos baseados no DNA não são afetados por mudanças durante a ontogênese ou diferenciação de órgãos. Por esta razão, vários métodos de detecção com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos nos anos recentes e alguns têm sido aplicados sob condições de campo (Clapp et al., 1995).

Análises de fragmentos de restrição de DNA amplificados por PCR constituem uma ferramenta poderosa que permite a detecção de moléculas de ácidos nucléicos específicos presentes em pequenas quantidades e tem sido aplicada com sucesso na identificação de FMA. Entretanto, a maior parte das seqüências já caracterizadas destes fungos está relacionada aos genes ribossomais (18S, 5.8S e 28S) (Figura 2) que são separados por regiões mais variáveis, os ITS (Internal Transcribed Spacer) e intergênicos IGS (Intergenic Spacers), que por apresentarem taxas de evolução mais rápidas que o DNA ribossomal podem ser utilizadas na caracterização de diferentes espécies (Salles & Souza, 1998). As análises de genes ribossomais estão entre as mais promissoras seqüências alvo de DNA, porque em muitos organismos elas são encontradas em múltiplas cópias por genoma e suas regiões são altamente conservadas. Isto permite gerar “primers” de PCR com larga aplicabilidade (Redecker et al., 1997). Vários autores, usando a comparação de seqüências ITS, regiões altamente variáveis no rDNA dos FMA, têm desenvolvido “primers” capazes de identificar espécies de FMA a partir da amplificação de DNA extraído dos esporos ou de raízes colonizadas (Gardes et al., 1991; Bonito et al., 1995; Zezé et al., 1996; Harney et al., 1997; Redecker et al., 1997; Lanfranco et al., 1999; Redecker, 2000). A partir dessas seqüências os autores desenvolveram “primers” específicos para *Glomus mosseae* [(Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe] (Lanfranco et al., 1995; Millner et al., 1998),

Scutellospora castanea Walker (Zezé et al., 1996), *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Gigaspora decipiens* Hall & Abbott, *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck (Lanfranco et al., 2001), *Glomus monosporum* Gerdemann & Trappe (Millner et al., 1998), *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann (Millner et al., 2001a), *Glomus occultum* Walker e *Glomus brasilianum* Spain & Miranda (Millner et al., 2001b).

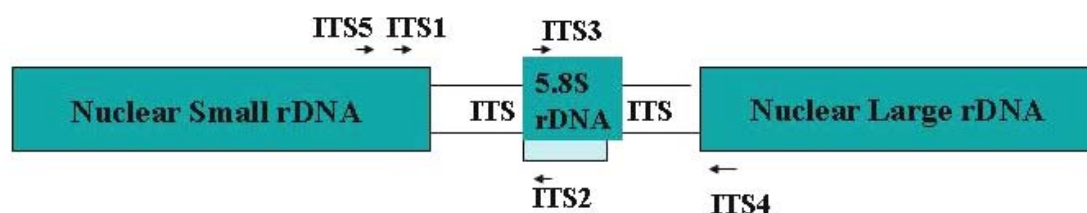


Figura 2. Representação de uma unidade de rDNA mostrando o ITS (espaços internos transcritos) e a posição de anelamento dos principais “primers” (White et al., 1990).

Simon et al. (1993) desenvolveram “primers” táxon-específicos para *Glomus etunicatum* (VALETC) e *Glomus* sp. (VAGLO) e para as famílias Acaulosporaceae (VAACAU) e Gigasporaceae (VAGIGA) que, utilizados em conjunto com os “primers” VANS1, amplificaram um fragmento do gene do 18S rRNA. O produto obtido por PCR foi então analisado por SSCP (polimorfismo de conformação da fita simples do DNA), onde as amostras são analisadas através de gel de poliacrilamida de alta resolução, sob condições não desnaturantes. As duas fitas de DNA são desnaturadas imediatamente antes de serem aplicadas no gel, migrando separadamente de acordo com a conformação que cada uma irá adotar. Esta técnica é capaz de detectar alterações de até uma única base entre os fragmentos homólogos, sem que haja necessidade de sequenciamento do fragmento. Os “primers” desenvolvidos permitiram a identificação dos fungos ao nível de família, sendo a técnica SSCP aplicada com sucesso na caracterização de amostras de raízes colonizadas por FMA (Simon et al., 1993). Recentemente, Rodriguez et al. (2005) analisaram caracteres morfológicos e moleculares para investigar a diversidade entre isolados de *Glomus claroideum* Schenck & Smith e *G. etunicatum*. A diversidade das seqüências inter e intra-isolado da região D2 da LSU do gene rRNA de oito isolados de *G. claroideum* e *G. etunicatum* foi estudada usando a técnica de PCR-SSCP.

Outra técnica molecular atualmente utilizada é a DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante), onde a variabilidade nas seqüências do rDNA 16S pode ser avaliada

através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante. Essa técnica foi utilizada primeiramente por Muyzer et al. (1993) e consiste na separação dos fragmentos de DNA (principalmente do rDNA 16S) em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de formamida e uréia. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem sua migração em posições diferentes (Muyzer, 1999). O comportamento de migração do fragmento de DNA no DGGE é governado não apenas pela composição de nucleotídeos (conteúdo de G+C), mas também pelas interações entre estes, dentro da molécula (Breslauer et al., 1986, Sugimoto et al., 1996). A PCR-DGGE da região V9 do rDNA 18S é um método rápido e confiável para identificar espécies de *Gigaspora* e de *Scutellospora* (De Souza et al., 2004/2005), para avaliar a diversidade de espécies de FMA em condições de campo e para caracterizar a heterogeneidade inter e intra-específica do rDNA (Kowalchuk et al., 2002; Öpik et al., 2003; De Souza et al., 2004/2005).

Estudando a diversidade de FMA em populações naturais, Sanders et al. (1995) promoveram a amplificação do DNA genômico de um único esporo e o produto proveniente da amplificação foi cortado com enzimas de restrição. Por essa técnica, conhecida como RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR), foram detectados diferentes padrões de bandejamento obtidos de diversos isolados.

A identificação dos FMA por meio de uma abordagem molecular apresenta resultados excelentes, mas o número de espécies para as quais “primers” espécie-específicos foram desenhados ainda é escasso e não permite abordagem ecológica da diversidade de FMA. Portanto, pesquisas nessa área são de extrema importância para tentar resolver conflitos na identificação dos FMA. A análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) é uma técnica do tipo RFLP e está baseada no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenéticos. A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade de um ambiente (Grifoni et al., 1995). Recomenda-se que o fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado por esse método, no caso de análise da diversidade intra-específica ou entre grupos de isolados com elevada afinidade filogenética, deve incluir o espaços internos transcritos (Figura 2), uma região que apresenta maior variabilidade tanto na composição de bases quanto no tamanho (Rosado et al., 1999).

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) possibilita a detecção de polimorfismo sem que haja conhecimento anterior da sequência nucleotídica. O bandejamento

obtido pode ser utilizado como marcador molecular ou na construção de “primers” ou sonda a ser usada na detecção de uma determinada espécie. Esta técnica não permite a detecção de FMA diretamente das raízes, já que utiliza “primers” inespecíficos, que amplificam também o genoma da planta (Salles & Souza, 1998). Wyss & Bonfante (1993), usando RAPD, verificaram variação entre isolados de uma mesma espécie de FMA. Lanfranco et al. (1995) produziram “primers” espécie-específico para *Glomus mosseae* a partir de análise de RAPD. A partir de análises de RFLP obtidos de esporos ou raízes colonizadas Redecker (2000) desenhou “primers” específicos para determinados grupos de FMA. Abbas et al. (1996), utilizando a mesma técnica, identificaram seqüências de DNA específicas para *Glomus mosseae* e *Gigaspora margarita*, a partir das quais foram construídos “primers” isolados-específicos, capazes de detectar a presença destes fungos em mistura de esporos e raízes colonizadas.

É urgente o desenvolvimento de ferramentas para detecção e identificação de FMA durante todos os estádios de seu ciclo de vida. Sem esta perfeita caracterização, torna-se difícil o uso otimizado desta simbiose em campo, pois estudos básicos ligados à competição, sobrevivência, dispersão e eficiência ficam comprometidos quando executados em comunidades complexas como as encontradas em solos tropicais (Salles & Souza, 1998). Técnicas moleculares são ferramentas poderosas e têm sido de grande utilidade na taxonomia e caracterização dos fungos. É importante salientar que na maioria dos casos, classificações baseadas em marcadores moleculares corroboram classificações feitas com base em características morfológicas (Leal-Bertioli, 1998). Desta forma, uma análise mais completa dos FMA implica em estudos morfológicos e moleculares, visando melhorar o conhecimento taxonômico e filogenético sobre o grupo.

1.3 Diversidade de espécies de FMA

Os FMA, importantes componentes da comunidade microbiana do solo, participam do processo de sucessão vegetal e contribuem para a diversificação e estabilidade de ecossistemas naturais (Van der Heidjen et al., 1998). De acordo com Allen et al. (2003), na maioria dos ecossistemas a diversidade de FMA, determina a diversidade das plantas. O estudo das comunidades de FMA e suas respectivas populações é fundamental para diferentes abordagens de pesquisa sobre esses fungos. Em sistemas naturais, tais estudos podem

contribuir para o entendimento da simbiose e do seu papel nos diferentes ecossistemas (Silva-Júnior, 2004).

O termo comunidade pode ser definido como um conjunto de espécies (populações) que ocorre conjuntamente em determinado tempo e dado espaço. De modo geral, o estudo das comunidades baseia-se em atributos, tais como: a composição específica ou o catálogo de espécies que compõem a comunidade; a diversidade expressa pela riqueza de espécies; a dominância e a equitabilidade; a estrutura espacial; a dinâmica temporal e os fenômenos de interdependências, dentre esses atributos o mais comumente estudado é a diversidade (Pinto-Coelho, 2000).

A riqueza de espécies, um indicador da abundância relativa de espécies (táxons) numa comunidade, é representada pelo número de espécies por área. Entre os índices usados para medir a riqueza de espécies encontram-se: a) índice de Margalef ($R = 1/\log.n$) e b) índice de Menhinick ($R = S/n$), onde R = riqueza de espécies, S = número total de espécies e n = número total de indivíduos. As equações de Margalef e Menhinick são baseadas na suposição de que qualquer medida de riqueza tem dependência inerente ao tamanho da amostra (Kennedy & Smith, 1995).

A diversidade pode ser medida por intermédio de índices matemáticos, que levam em consideração informações taxonômicas na definição das unidades de medida. Alguns índices, como o de diversidade de Shannon-Wiener e Simpson; de riqueza, de Margalef e Menhinick; e de equitabilidade, de Pielou, fornecem informações importantes acerca do padrão de distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema (Kennedy, 1999). Os índices de diversidade que avaliam a riqueza e dominância mais usados são o de Shannon-Wiener e o de Simpson (Pielou, 1983).

O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), segundo Pielou (1983), representado pela fórmula $H' = - \sum (X_i/X_o) \cdot \log (X_i/X_o)$, onde X_i = densidade de esporos de cada espécie em 100 mL de solo e X_o = densidade total de esporos de todas as espécies, assume que os indivíduos são amostrados ao acaso de uma população indefinidamente grande e que toda as espécies estão representadas na amostra coletada sendo relativamente independente do tamanho da amostra (Odum, 1988; Pielou, 1983). O H' é considerado como ideal quando se deseja estudar os efeitos das perturbações sofridas pelos ecossistemas, pois é um índice que atribui maior peso às espécies não dominantes, consideradas como espécies raras, que são as primeiras a sofrer os efeitos dos impactos ambientais (Rosso, 1996). Segundo esse autor, o

ideal é utilizar um índice de diversidade que atribua maior peso às espécies não-dominantes, como é o caso do índice de Shannon. As espécies raras geralmente têm dispersão heterogênea no domínio amostral. No caso do índice de Shannon, as espécies raras levam ao aumento da variância entre os elementos, portanto, seria indicado para quantificações mais precisas o emprego de uma prova estatística não-paramétrica.

O índice de dominância de Simpson (C) (Pielou, 1983), mede o grau em que uma dada espécie predomina em uma comunidade devido ao seu tamanho ou abundância e é expresso pela equação: $C = \sum (X_i/X_o)^2$. Este índice exprime, basicamente, a abundância das espécies mais comuns, sendo conseqüentemente mais sensível a mudanças que ocorrem nestas espécies.

Alguns autores têm utilizado análise de variância e teste de médias para avaliar as diferenças dos índices de diversidade de espécies entre comunidades de FMA (Koske et al., 1996; Gravina, 1998, Franke-Snyder et al., 2001). Porém, segundo Franke-Snyder et al. (2001) a utilização de índices de diversidade apresenta limitações para caracterizar comunidades de FMA, por causa da biologia destes fungos. Dois fatores contribuem para isto: os pesquisadores ainda estão limitados ao uso dos esporos para identificar e contar os fungos que representam a diversidade de FMA (Morton et al., 1995) e a morfologia e o número de esporos podem não necessariamente refletir a estrutura da comunidade de FMA (Douds & Millner, 1999).

Estudos de diversidade, em todos os níveis e aspectos, dependem da discriminação das espécies ou táxons presentes no ambiente. Esta discriminação só pode ser feita utilizando-se bases taxonômicas que possibilitem a identificação das espécies (Caproni, 2001). Portanto, estudos ecológicos necessitam ser iniciados e desenvolvidos com o apoio de taxonomistas.

1.4 Distribuição de FMA no Brasil

As micorrizas arbusculares são importantes componentes da microbiota dos solos nos ecossistemas naturais e agrícolas contribuindo para a vida do planeta. Os estudos existentes sobre a ocorrência das micorrizas arbusculares são realizados por pesquisadores interessados na avaliação dos fungos e da simbiose em diferentes ecossistemas e hospedeiros, com vistas em enfatizar os fatores bióticos e abióticos que influenciam a ecologia destes fungos, bem como sua simbiose. Segundo Siqueira & Klauberg-Filho (2000) a ocorrência das micorrizas arbusculares é determinada por avaliações quantitativas, que envolvem procedimentos pouco

elaborados, determinando a colonização radicular e a densidade de esporos no solo, e qualitativas, em que a presença de diferentes fungos é determinada para gênero e/ou espécie, em termos de frequência e abundância relativa. Para esses autores, estes estudos têm-se concentrado principalmente na região sudeste do Brasil, com grande ênfase em espécies de interesse agrícola e, em alguns casos, florestais. Os ecossistemas naturais não têm recebido muita atenção, ficando restritos a levantamentos realizados nos estados de Minas Gerais (Fernandes & Siqueira, 1989), Santa Catarina (Stürmer & Bellei, 1994), São Paulo (Bononi & Trufem, 1983; Trufem, 1990; Trufem et al., 1994; Gomes & Trufem, 1998; Bononi et al., 2000), Bahia (Silva et al., 2001/2005) e Pernambuco (Yano-Melo et al., 1997; Yano-Melo et al., 2003 a,b; Melo, 2004; Mergulhão et al., 2004).

As micorrizas arbusculares são de ocorrência generalizada nas plantas superiores; estima-se que existam cerca de 300.000 espécies de plantas, sendo a grande maioria capaz de formar associação. Essas micorrizas são formadas pela maioria das Fanerógamas (97%), incluindo quase todas as espécies de interesse agrônomo, pastoril e florestal tropical (Moreira & Siqueira, 2002). Embora vários trabalhos tenham sido desenvolvidos, a riqueza, a diversidade e o potencial simbiótico das populações de FMA nos ecossistemas brasileiros precisam ser mais conhecidos. Atualmente há registros de 189 espécies de FMA (<http://www.tu.darmstadt.de>). Segundo Yano-Melo et al. (2003 a) no Brasil foram registradas cerca de 80 espécies de FMA e das oito famílias de FMA consideradas, seis estão representadas no semi-árido, com destaque para Glomeraceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Trufem (1990) identificou 35 espécies de FMA na rizosfera de plantas nativas e mencionou sete novas espécies de FMA no estado de São Paulo. Diversos trabalhos sobre levantamentos de FMA foram publicados na região Sudeste (Schenck & Siqueira, 1987; Siqueira et al., 1989; Trufem et al., 1994; Trufem & Malatinszky, 1995; Gomes & Trufem, 1998; Trufem, 1999; Carrenho et al. 2001 a e b; Carrenho et al. 2002; Klauberg-Filho et al., 2002; Weber et al., 2004), no Sul (Stürmer & Bellei, 1994; Zangaro et al., 2000; Focchi et al., 2004), no Centro-Oeste (Spain & Miranda 1996 a e b), no Norte (Caproni et al., 2003) e no Nordeste, onde trabalhos sobre a ocorrência de FMA em ecossistemas agrícolas foram iniciados por Maia & Trufem (1990). Posteriormente foram realizados levantamentos em áreas de caatinga degradada ou não (Yano-Melo et al., 2003b; Souza et al., 2003; Mergulhão et al., 2004; Silva et al., 2001/2005) e em Mata Atlântica (Melo, 2004). Outros trabalhos também foram realizados em sistemas agrícolas (Yano-Melo et al., 1997; Gugel, 2004). Há

registro de pelo menos 38 espécies de FMA identificadas em solos de áreas de mata e caatinga no Nordeste (Maia et al., 2002).

As características químicas e físicas dos solos influenciam a composição de espécies de FMA. A fertilidade do solo pode afetar a densidade de esporos e distribuição dos FMA de forma indireta, influenciando diferentemente o crescimento das plantas (Day et al., 1987). Um dos fatores mais influentes na distribuição dos FMA é o pH; o conhecimento da eficiência e distribuição dos FMA em relação ao pH, em conjunto com outros fatores do solo, ajuda a obter maior sucesso no manejo de solos degradados, onde prevalecem a compactação e a acidez (Hayman & Tavares, 1985). A acidez do solo pode reduzir a colonização radicular, a germinação e produção de esporos de FMA e assim afetar a absorção de nutrientes e o crescimento das plantas (Bartolome-Esteban & Schenck, 1994). Segundo Sylvia & Williams (1992), alguns isolados de FMA são eficientes em solos distintos, porém a maioria parece estar adaptada a valores de pH próximos ao do solo de origem. Alterações no pH e alumínio são fatores de grande importância para a ecologia e distribuição dos FMA. Algumas espécies têm preferências ou tolerância a certas condições, como por exemplo: *Glomus diaphanum* Morton & Walker, *G. occultum*, *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck, *Scutellospora* sp., *Gigaspora margarita*, *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe, que predominam em condições de elevada acidez, enquanto *G. mosseae*, *G. clarum* Nicolson & Schenck, *G. fasciculatum* Gerdemann & Trappe e *G. etunicatum* “preferem” solos pouco ácidos ou neutros e *A. scrobiculata* Trappe, *A. morrowiae* Spain & Schenck, *G. agregatum* Schenck & Smith são indiferentes à acidez do solo (Siqueira, 1994). Dados semelhantes foram observados por Habte (1994): solos alcalinos favoreceram a germinação de *Glomus mosseae*, enquanto esporos de *Scutellospora coralloidea* Walker & Sanders e *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders germinaram melhor em pH 5 e 6, respectivamente.

Alto nível de fósforo no solo pode influenciar negativamente a efetividade dos FMA (Vierheilig et al., 2000). Segundo Lambais & Cardoso (1988), o efeito do nível de fósforo na simbiose micorrízica está muito relacionado com as espécies de FMA. Esses autores verificaram que o nível de fósforo inibiu a colonização radicular, sendo que a colonização por *Acaulospora scrobiculata* foi menos afetada do que a colonização por *Gigaspora margarita* e *Glomus macrocarpum* Tulasne & Tulasne. Sylvia & Schenck (1983) observaram que em alguns casos a adição de fósforo pode estimular a esporulação do fungo e que algumas espécies de FMA estabelecem simbiose em ambiente com alto nível deste nutriente. Souza et

al. (2003) verificaram correlação positiva entre o nível de fósforo no solo e o número de propágulos infectivos; o mesmo não foi verificado em relação ao pH. Silva et al. (2001) verificaram que em áreas de caatinga nativa o elevado nível de P no solo aparentemente inibe o desenvolvimento de propágulos micorrízicos. Schachtman et al. (1998) mostraram que os baixos níveis de colonização em plantas crescendo em solos com alto nível de fósforo não são resultado da regulação direta da atividade dos fungos pelo fósforo do solo, mas é a planta que regula a atividade do fungo. Segundo Siqueira et al. (1984), o fato de algumas combinações fungo-hospedeiro, mesmo sob alto nível de fósforo disponível, apresentarem taxa de colonização alta, indica que o mecanismo de controle pode diferir entre vários hospedeiros e fungos.

Em áreas de caatinga, Silva et al. (2001) observaram menor número de esporos devido aos elevados valores de Cu e Fe e ao pH alcalino desses locais. Alta disponibilidade de nutriente muitas vezes inibe a simbiose micorrízica (Allen, 1991; Daniels & Graham 1976). Cloro e sódio podem afetar negativamente a emissão do tubo germinativo em esporos de FMA (Vallini et al., 1993). A temperatura e a umidade influenciam a fase pré-simbiótica (Siqueira et al., 1985). Daniels & Trappe (1980) verificaram que a temperatura entre 18-25 °C é ideal para germinação de esporos de *Glomus versiforme* Berch. Solos com elevada umidade (81%) inibiram a germinação de *Glomus clarum*, *G. macrocarpum* e *G. etunicatum*, sendo o efeito devido à redução na aeração do solo (Sylvia & Schenck, 1983). Carrenho et al. (2001 b) notaram que a colonização radicular de amendoim, sorgo e milho foi influenciada pela textura do solo; a colonização de sorgo foi maior em solo argiloso que em solo arenoso. A luminosidade também pode afetar o crescimento micelial assimbiótico de FMA; Varela-Castejón et al. (1998) registraram redução na germinação de *Glomus macrocarpum* quando os esporos foram expostos à luz. Segundo Silva (2006), o tipo de resíduo orgânico aplicado no solo pode prejudicar a fase assimbiótica de *Gigaspora albida* Schenck & Smith, não sendo recomendado o uso de esterco bovino não maturado, pois reduz a taxa de germinação e o crescimento micelial. Ainda segundo esse autor, a presença de glomalina no meio de crescimento estimula o crescimento micelial de *Gigaspora albida*, com benefício variando em função da dose empregada. O emprego de tampões orgânicos interfere na fase pré-simbiótica de FMA, mas as respostas variam com o tipo de substância utilizada (Silva et al., dados não publicados).

Apesar de reconhecidamente importantes na maioria dos ecossistemas terrestres, dados ecológicos e biológicos básicos sobre os FMA são escassos (Fitter, 1990) com poucos trabalhos sobre a sua ocorrência em ecossistemas naturais no Brasil. Pesquisas sobre a ecologia dos FMA precisam ser incentivadas visando melhor conhecimento sobre a taxonomia, fisiologia e genética desses fungos. Com esses dados seria possível selecionar isolados eficientes de FMA para utilização em diferentes ecossistemas.

1.5 Importância dos FMA em solos degradados

A degradação do solo é um problema dos tempos modernos, produzindo impactos econômicos e ecológicos e devendo ser, portanto, enfrentada com prioridade. A degradação tem várias causas e pode ocorrer em escala local, regional, nacional e global, determinando a perda da biodiversidade, diminuição da fertilidade do solo e interferência nos recursos hídricos, além da brusca alteração da paisagem (Mendes-Filho, 2004). O Brasil busca atualmente sua independência mineral, embora sem adequado planejamento, o que tem gerado a utilização desordenada dos recursos naturais e contribuído para uma generalização das áreas degradadas em todo o território nacional, não havendo ainda precisa avaliação da real dimensão do problema (Ferreira, 2000). As atividades mineradoras, buscando a extração dos recursos minerais, embora importantes do ponto de vista econômico, trazem sérias consequências para o ambiente. Tais áreas tornam-se degradadas, perdendo a vegetação nativa e a fauna, além da remoção ou alteração da camada fértil do solo, o que provoca danos aos mananciais de água e causa forte impacto na composição qualitativa e quantitativa da microbiota edáfica (Ribeiro, 2000; Mendes-Filho, 2004).

A atividade mineradora pode levar à geração de subprodutos e rejeitos os quais produzirão depósitos improdutivos sobre o solo. Uma vez impactado pela mineração, o ambiente é alterado de tal maneira que não mais consegue retornar ao estado original por seus próprios meios naturais (Pfleger et al., 1994). A mineração produz impactos ambientais significativos em todas as suas fases, desde o momento da prospecção até o fechamento da mina. A reabilitação de áreas degradadas por mineração é difícil e vagarosa. Em zonas áridas, devido às condições edafoclimáticas e à competição existente por água e nutrientes, o crescimento de plantas é lento, sendo necessário bastante tempo para que o ambiente seja recuperado (Sharma et al., 1997).

Em áreas em que atividade mineradora predomina, o solo apresenta limitações ao estabelecimento e desenvolvimento espontâneos da cobertura vegetal, em função, essencialmente, entre outros fatores, dos baixos teores de matéria orgânica e de nutrientes (Mendes-Filho, 2004). Em regiões de mineração, além da perda da vegetação natural, verifica-se movimentação muito intensa do solo no local de abertura da lavra, podendo apresentar volumes de rejeito capazes de contribuir para a degradação do ambiente. A perda de matéria orgânica é a pior consequência deste processo, pois além de prejudicar a estrutura do solo, torna insuficiente a atividade biológica, a disponibilidade de água e o suprimento de nutrientes às plantas, como o fósforo (Franco et al., 1995). Ruivo et al. (2001) avaliaram a reabilitação de áreas mineradas submetidas a revegetação e destacaram que, devido aos baixos teores de carbono, nitrogênio e fósforo encontrados, há necessidade de maior aporte de matéria orgânica e estímulo à atividade biológica para que ocorra recuperação mais rápida desses solos alterados. Resultados semelhantes foram obtidos por Ros et al. (2003), estudando o efeito da aplicação de composto orgânico sobre os atributos químicos e biológicos de solos de regiões semi-áridas degradados.

Jasper & Davy (1993) destacam que o restabelecimento de ecossistemas só será alcançado se todo o processo de ciclagem de nutrientes, incluindo os FMA, for também restabelecido. Tem sido demonstrado que a presença de FMA é fundamental para regeneração de ecossistemas, pois esses fungos têm papel significativo no aumento do estabelecimento e da produtividade de espécies arbóreas em regiões áridas e semi-áridas, onde a produtividade da planta é limitada devido à baixa fertilidade do solo e escassez de água (Rao & Tarafdar, 1998). A associação micorrízica é crítica para o estabelecimento, desenvolvimento e manutenção dos ecossistemas naturais e para a recuperação daqueles severamente perturbados (Reeves & Redente, 1991), pois a planta associada a FMA está mais apta a colonizar áreas degradadas, uma vez que apresenta estratégia nutricional superior à da planta não colonizada (Souza & Silva, 1996). A contribuição dos FMA deve-se principalmente à melhoria nutricional da planta hospedeira, em particular os nutrientes de baixa mobilidade na solução do solo como P, Zn e Cu, gerando maior tolerância a estresses abióticos e favorecendo a agregação do solo (Jasper, 1994). Assim, a presença de FMA facilita a ciclagem de nutrientes, diminui os efeitos negativos da compactação do solo (Sylvia & Williams, 1992) e promove a formação e estabilidade de agregados (Rillig, 2004), melhorando o ambiente, a capacidade

invasora e a formação de comunidades vegetais em áreas degradadas (Janos, 1988). Destaca-se ainda a tolerância ao déficit hídrico, geralmente comum nestas condições.

Observações no padrão de sucessão de plantas em regiões semi-áridas indicam que os FMA desempenham importante papel ecológico na composição e estabilidade das comunidades de plantas. A inoculação desses fungos melhora a produtividade das plantas pelo aumento da tolerância à seca (essencialmente em regiões áridas) e disponibilidade mineral, os primeiros fatores limitantes na estabilidade das plantas em solos sob atividade mineradora (Marx, 2000). Como muitas espécies vegetais dependem dos FMA para completar seu ciclo de vida, o estabelecimento da associação micorrízica é imprescindível em programas de manejo em ecossistemas naturais e na restauração de ambientes degradados. A importância da estabilidade do solo, durante o processo de recuperação de um sistema degradado, demonstra a necessidade de implementar estratégias que promovam a formação de agregados, como o uso de FMA. É recomendável também empregar isolados nativos que possam assegurar o desempenho da associação e com ela o melhor desenvolvimento das espécies vegetais. Isto implica em conhecimento básico da riqueza e abundância de espécies de FMA presentes na área de interesse e de seus efeitos sobre as plantas hospedeiras (Ramos-Zapata & Guadarrama, 2004). Ainda não existe consenso quanto ao melhor indicador relacionado com a importância biológica de cada espécie de FMA. Entretanto, o cálculo do índice de abundância e frequência (IAF), baseado na presença de esporos, tem sido usado para estimar a atividade desses fungos no ambiente natural (Koske et al., 1997). A glomalina também estima a atividade dos FMA, sendo apontada como biomarcador para biomassa e atividade desses fungos no solo (Millner & Wright, 2002).

Em áreas de mineração a população de FMA pode ser reduzida. Gould et al. (1996) observaram que isto poderia estar relacionado à perturbação física e armazenamento inadequado do solo superficial orgânico, provocando a redução dos esporos e rompimento da rede de hifas no solo. A perturbação do solo causada pelas atividades da mineração separa as plantas de seus endófitos micorrízicos associados. Quando o solo superficial orgânico é removido, a população microbiana indígena é alterada. Esta remoção pode deixar poucos propágulos capazes de iniciar a colonização micorrízica nas áreas revegetadas, podendo influenciar a diversidade destes fungos durante o estágio inicial de recuperação e impedir o estabelecimento de espécies vegetais dependentes da micorrização (Loree & Williams, 1987), alterando a diversidade vegetal. Estudos em regiões perturbadas pela extração mineral

mostraram que, em várias dessas áreas, os FMA foram reduzidos ou eliminados e que muitas espécies de plantas eram dependentes dos fungos micorrízicos para o seu estabelecimento e sobrevivência (Allen, 1991). De acordo com Silva et al. (2005), o impacto produzido por uma mineradora de cobre reduziu a comunidade de FMA, quantitativa e qualitativamente afetada pela degradação do solo. Esses autores verificaram que espécies de *Glomus* são comuns em regiões semi-áridas. FMA que mostram tolerância às modificações edáficas causadas pela mineração têm potencial para utilização em programas de revegetação (Stutz et al., 2000). Marinho et al. (2004) indicaram *Glomus macrocarpum* para ser testado como inoculante de espécies arbóreas, uma vez que se estabelece bem em ambientes em recuperação e perturbados.

De acordo com Jasper et al. (1994), nível adequado de infectividade de FMA no solo, depois da mineração, é importante para o sucesso do restabelecimento da diversidade na formação de ecossistema auto-sustentável. Entretanto, também é essencial saber quais fungos estão envolvidos na formação da micorriza para que sua contribuição individual possa ser avaliada (Merryweather & Fitter, 1998). É necessário atentar para o fato de que alterações na vegetação decorrentes das atividades que degradam o ambiente podem provocar modificações na infectividade dos FMA, especialmente daqueles que predominantemente colonizam novas raízes a partir de fragmentos de hifas vegetativas em vez de esporos. Entretanto, ainda é obscura a questão da heterogeneidade espacial da infectividade dos FMA ao longo da sucessão vegetal em um ecossistema (Boerner et al., 1996). A composição de FMA e a formação de micorrizas em áreas degradadas por mineração têm mostrado variações quando ocorre sucessão vegetal (Pfleger et al., 1994; Gould & Hendrix, 1998).

O uso de mudas inoculadas com FMA em viveiros é o principal método de introdução destes fungos em solos minerados. Este método parece ser mais efetivo se as mudas forem inoculadas com FMA adaptados às condições edafoclimáticas nas quais serão introduzidos, por terem um efeito positivo na sobrevivência e crescimento das plantas nas áreas em recuperação (Pfleger et al., 1994). Ainda segundo esses autores, a resposta das plantas aos FMA, quando crescem em solos remanescentes de mineração, tem sido satisfatória mesmo em casos onde inóculos de FMA foram adicionados juntamente com o solo superficial orgânico como tratamento. Em áreas de mineração de bauxita, Melloni et al. (2003) concluíram que as espécies introduzidas na revegetação são fatores determinantes na recuperação da funcionalidade desses fungos no solo. De acordo com Martins et al. (1999), em áreas

degradadas a população de FMA apresenta variação sazonal, e os FMA nativos contribuem significativamente para o estabelecimento da gramínea nativa *Aristida setifolia* em solos de cerrado natural e de áreas degradadas. A introdução de FMA pode ser benéfica se fungos indígenas estiverem ausentes ou se não forem eficientes, ou ainda se o fósforo disponível estiver em baixa concentração e as plantas usadas na revegetação responderem positivamente aos FMA (Reeves & Redente, 1991). Ainda segundo esses autores, a perturbação de solos em escala mundial está se tornando mais intensa e impactos estão sendo observados em escala global. Para que o manejo de FMA em solos minerados se torne possível, é necessário conhecer o grau de perturbação, entender os padrões e processos envolvidos no estabelecimento, manutenção e mudanças nas populações desses fungos no solo, que influenciam o estabelecimento das plantas e a sua sucessão (Abbott & Gazeij, 1994).

Os resultados de estudos comparativos quanto à tolerância de FMA nativos ou não, a áreas degradadas, são ainda discutidos. Alguns autores relatam a baixa eficiência de isolados nativos ao ambiente impactado. Segundo Enkhtuya et al. (2000), isolados de FMA originados de áreas degradadas ou de ambientes impactados artificialmente, quando em simbiose com milho crescido em solo degradado, não mostraram melhor eficiência do que os isolados de origem não perturbada. Por outro lado, há necessidade de maiores informações sobre o estado de dependência de FMA das plantas nativas usadas na revegetação, pois sabe-se que a planta associada ao FMA está mais apta a colonizar áreas degradadas (Souza & Silva, 1996). Uma vez que estas informações estejam disponíveis, o desafio é encontrar as melhores combinações de plantas e fungos para formar associações micorrízicas em diversas condições edafoclimáticas.

1.6 Método quantitativo para contagem de microrganismos

Infectividade micorrízica de um solo é a habilidade do FMA em colonizar raízes de plantas hospedeiras e está relacionada ao número de propágulos de FMA viáveis (Plenchette et al., 1989). Segundo Brundrett & Abbott (1994), o potencial de infectividade dos FMA é definido como a capacidade de seus propágulos em colonizar as raízes de plantas, sendo mensurado pela taxa de colonização nas raízes dos hospedeiros. Alguns fatores, entre os quais o grau de dependência micorrízica das plantas, a densidade de propágulos e as condições ambientais podem interferir no estabelecimento e eficiência da simbiose (Siqueira & Klauberg-Filho, 2000). No solo existem três tipos de propágulos de FMA: esporos de

resistência, fragmentos de raiz micorrizada e hifas do fungo, que apesar de diferirem quanto à capacidade de sobrevivência e potencial infectivo, são formas de inóculo capazes de originar a simbiose (Silveira, 1992). Os esporos são considerados como estruturas estratégicas de sobrevivência para suportar períodos adversos (Hetrick, 1985). Conseqüentemente, o potencial de inóculo de um solo, ou a capacidade dos propágulos fúngicos de um solo infectarem raízes de plantas, pode estar relacionado ao número de esporos presentes (Collozi-Filho & Balota, 1994). Portanto, apesar do número de esporos no solo não fornecer o valor real de sua infectividade, pode dar uma indicação do nível populacional dos FMA (Dodd et al., 1983).

Para a quantificação do número de propágulos infectivos de FMA no solo é freqüentemente utilizado o método do Número Mais Provável (NMP), que estima as populações desses fungos por unidade de volume ou peso de solo, detectando a presença de propágulos viáveis. O NMP determina a infectividade de diferentes diluições de um inóculo e calcula o número de propágulos na amostra original por meios matemáticos (Feldmann & Idczak, 1992; INVAM, 2001). Porém a determinação do NMP de propágulos infectivos com base apenas na colonização das raízes do hospedeiro pode falhar na detecção de esporos dormentes (An et al., 1990). Em solos tropicais de floresta úmida, Louis & Lim (1987) observaram que quando o número de esporos era alto, a percentagem de colonização era baixa, e quando o número de esporos era baixo a colonização era alta. Os autores sugeriram que a colonização pode ser influenciada pela interação entre o estado nutricional dos solos tropicais, a planta hospedeira e o ciclo de vida dos FMA. Parece não haver correlação positiva entre o número de esporos e a colonização radicular, e isso deve ser considerado durante a utilização de métodos onde a colonização é usada para determinar o potencial de infectividade do solo (Silva, 2000). Allen et al. (1998) verificaram em 12 espécies de plantas um alto percentual de colonização radicular tanto na estação seca quanto na chuvosa. No entanto, durante a estação seca houve diminuição do número de esporos e na estação chuvosa esse número aumentou, comprovando a ocorrência de variação sazonal na dinâmica micorrízica. Silva et al. (2001) observaram que o número de esporos e de propágulos infectivos no solo foi baixo em áreas de caatinga nativa e impactada por mineração, e não verificaram diferenças significativas no número de esporos entre os períodos seco e chuvoso. Fischer et al. (1994) obtiveram, em solo de pasto, cerca de 63 propágulos/100g de solo, enquanto em solo desprovido de vegetação o NMP de propágulos infectivos foi de apenas 10 propágulos/100g

de solo, confirmando que a presença de FMA no solo está relacionada com a cobertura vegetal.

Análises microbiológicas constituem ferramentas importantes no monitoramento da poluição do solo. No entanto, tais medidas, quando são utilizadas individualmente, não oferecem informações suficientes. Combinando-se atividade microbiológica e estimativa de números de microrganismos, obtêm-se indicadores mais sensíveis da poluição do solo. Com esta abordagem, é possível avaliar a alteração do solo sem a necessidade de recorrer a longos e dispendiosos experimentos de campo (Brookes, 1995). A contagem de bactérias e fungos é uma destas medidas e pode ser obtida diretamente por microscopia ou estimada por métodos indiretos. Neste último caso, é necessário que os propágulos existentes na amostra sejam capazes de formar colônias. Em todos os procedimentos de isolamento, os microrganismos são coletados em condições naturais e colocados em condições artificiais (Jahnel et al., 1999).

O plaqueamento de diluições de solo (por exemplo, sobre agar-nutriente) pode ser usado para a enumeração de bactérias e fungos. Para este último, o uso deste método reflete o número de fragmentos fúngicos ou “unidades de propágulos”, que incluem esporos individuais e fragmentos de micélio, ou seja, é um método que estima o número total de propágulos fúngicos no solo (Wardle, 1994). De maneira geral, os processos de contagem indireta proporcionam condições de crescimento para bactérias zimógenas, ou seja, bactérias que apresentam metabolismo rápido quando na presença de matéria orgânica facilmente decomponível. Entretanto, pequenas alterações nas condições físico-químicas do solo afetam imediatamente os microrganismos zimógenos (Schinner et al., 1993 apud Jahnel et al., 1999). A contagem de unidades formadoras de colônias é feita a partir de uma suspensão de solo por meio de diluições em série, e cada diluição é transferida para o meio de cultura. No método do número mais provável (NMP), o crescimento em placas com meio de cultura mostra que pelo menos um propágulo com condições de crescimento foi transferido. Apesar de seletivo, o método de estimativa de unidades formadoras de colônias pelo número mais provável tem sido um instrumento bastante útil no estudo de microrganismos do solo (Jahnel et al., 1999). Ainda segundo esses autores, o NMP de fungos e bactérias do solo foi realizado pelo método de plaqueamento por gotas e comparado com o procedimento convencional de contagem de microrganismos do solo em amostras de solo de diferentes texturas. Os autores observaram que o método de quantificação de bactérias e fungos em amostras de solo por plaqueamento

de gotas proporcionou a obtenção de resultados semelhantes àqueles obtidos pelo procedimento tradicional, porém, com a vantagem de economia de reagentes e trabalho.

1.7 Glomalina: a glicoproteína dos FMA

Aspecto importante a considerar sobre os benefícios da atividade dos FMA é o fato deles produzirem uma glicoproteína denominada glomalina, a qual está relacionada à agregação de partículas e ao conseqüente estoque de carbono no solo. A glomalina é capaz de absorver naturalmente o carbono, mantendo-o no solo, e ainda ajuda a fertilizar a terra devido à sua característica de adesão, de modo a agregar as partículas do solo, criando espaços sob a superfície que permitem a penetração de água, oxigênio e raízes (Rillig et al., 2002; Rillig, 2004). Rillig et al. (2003) sugerem que a quantificação da glomalina no solo pode constituir importante indicador de mudanças causadas pelo uso da terra e por isso poderia se tornar bom indicador da reabilitação. Esta estabilidade no solo permite, através de uma única amostragem, estabelecer com razoável segurança o teor de glomalina no solo (Lutgen et al., 2003). Segundo Rillig et al. (2003), outro aspecto interessante relacionado ao teor de glomalina no solo é que sua quantificação experimental tem demonstrado variações em termos de concentração em resposta a perturbações no ecossistema. A presença da glomalina é um dos principais quesitos, além da água, que diferenciam um terreno fértil de um solo arenoso. Quanto mais a terra saudável é perturbada pelo cultivo mecânico, mais se quebra a glomalina, e o carbono antes absorvido volta à atmosfera na forma de dióxido de carbono (<http://www.ibps.com.br/index.asp?idnoticia=1484>).

As hifas externas, esporos e raízes colonizadas são responsáveis pela síntese da glomalina. Este glicoconjugado está positivamente relacionado com a produção de micélio extraradicular (Wright et al. 1996; Treseder et al., 2004). A glomalina é uma glicoproteína insolúvel, hidrofóbica, que apresenta elevada quantidade de ferro (0,8-8%) na sua estrutura química (Wright & Upadhyaya, 1996/1998; Rillig, 2005), sendo considerada o maior componente da fase orgânica do solo (27%) (Wright & Nichols, 2002). Produto da atividade dos FMA, representa 8% da massa seca das hifas (González-Chávez et al., 2004). A glomalina constitui de 4-5% do carbono orgânico do solo e estima-se que possa permanecer no solo por 6 a 42 anos (Rillig et al., 2001 a,b).

A glomalina é quantificada por métodos bioquímicos de dosagem de proteínas (método Bradford, 1976), ou por técnicas imunológicas como ELISA, sendo neste caso

necessária a utilização do anticorpo monoclonal MAb32B11 (Wright et al., 1996). Há duas frações de glomalina: a) facilmente extraível (GFE): extraída em solução de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) após um ciclo em autoclave (121 °C) por 30 minutos; b) glomalina total (GT), extraída em solução citrato de sódio alcalino (50 mM; pH 8,0), este processo pode ser repetido por vários ciclos em autoclave (Wright & Upadhyaya 1996/1998). Segundo Bird et al. (2002) valores de glomalina total não excederam 0,6 mg g⁻¹ solo em regiões semi-áridas. A produção de glomalina total pode chegar a 3,65 mg g⁻¹ solo em áreas revegetadas com plantas micorrizadas (Caravaca et al., 2005). Em áreas agrícolas, Rillig et al. (2003) verificaram que os valores de glomalina facilmente extraível e total estão em torno de 0,5 e 3 mg g⁻¹ solo e, em solos de floresta, Rillig et al (2001 b) extraíram >60 mg glomalina g⁻¹ solo.

Trabalhos têm registrado correlações positivas entre a emissão de CO₂ e o teor de carbono orgânico do solo com a concentração de glomalina (Wright & Upadhyaya 1996; Bird et al., 2002; Rillig et al., 2003). Não foi observada relação entre a produção de glomalina e os teores de Ca Mg, P e K e o pH foi correlacionado negativamente com as frações facilmente extraível e total (GFE e GT). Altas concentrações desses nutrientes também inibiram a produção da fração facilmente extraível (GFE) (Rillig et al., 2003; Lovelock et al., 2004). A glomalina pode servir como fonte de nutrientes no solo (Harner et al., 2005); sua produção é dependente da espécie de FMA (Wright et al. 1996; Rillig et al., 2005) e a presença e o tipo de vegetal afetam a produção desta proteína (Wright & Anderson, 2000; Bird et al., 2002; Rillig et al., 2002). A sazonalidade teve pouca influência na concentração de glomalina no solo (Lutgen et al., 2003).

O uso de FMA com maior potencial para produção desta proteína no solo é indicado por melhorar as condições edáficas e o crescimento do hospedeiro (Piotrowski et al., 2004; Rillig, 2004). Por outro lado, não se conhece o efeito do impacto da atividade gesseira sobre a produção desse glicoconjugado protéico em solos semi-áridos.

1.8 Atividade microbiana do solo

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada no planeta (Whitman et al., 1998). Segundo Lynch & Bragg (1985), a organização e funcionamento dessas comunidades é que governam as transformações bioquímicas que ocorrem no solo, sendo a microbiota do solo responsável não somente pela formação de húmus e ciclagem de nutrientes, mas pela definição da estrutura física e de muitas outras

funções, a vida do solo e os seus processos vitais são expressos e regulados por essa microbiota. A regulação sobre a decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, degradação de poluentes químicos e a sua forte influência sobre a estrutura do solo, faz com que os microrganismos e os processos aos quais estão ligados sejam naturalmente escolhidos como indicadores da saúde ou qualidade do solo (Kennedy, 1998). Segundo Van Bruggen & Semenov (2000), a qualidade está relacionada com as propriedades físicas, químicas e biológicas, enquanto a saúde do solo é determinada pelas características ecológicas. Portanto, solo saudável pode ser definido como uma contínua capacidade do solo em funcionar como um sistema vivo, dentro do ecossistema e do uso da terra, sustentando a produtividade biológica, promovendo a qualidade do ar e da água e mantendo plantas, animais e seres humanos saudáveis (Doran & Safley, 1997).

Práticas e manejos inadequados têm levado os solos do mundo todo à degradação e conseqüentemente à perda de qualidade. Portanto, a perda da qualidade do solo, além de um componente a ele inerente, determinado por suas propriedades físicas, químicas e biológicas, dentro das restrições impostas pelo clima e o ecossistema, inclui um componente determinado pelas decisões de uso da terra (tipo de exploração) e práticas de manejo (modo de exploração) (Doran & Zeiss, 2000). A diversidade microbiana tem sido relacionada com a qualidade do solo, havendo a necessidade de maior investigação das interações e atividades metabólicas dos microrganismos nos processos ecológicos do solo (Taylor et al., 2002). Métodos para estimar a atividade microbiana em solos da região semi-árida são fundamentais no monitoramento ambiental e recuperação de áreas degradadas (Pereira et al., 2004). Estudos sobre o impacto de alterações ambientais nas populações microbianas e suas atividades têm sido referidos utilizando parâmetros como: número total de microrganismos do solo (bactérias e fungos), estimativa do carbono da biomassa microbiana e do quociente metabólico (qCO_2), hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) e taxa respiratória total do solo, entre outros (Alexander, 1977; Garcia et al., 1994; Sarig & Steinberg, 1994).

Parâmetros microbiológicos e bioquímicos podem indicar alterações na qualidade do solo e são recomendados por serem sensíveis a variações na fertilidade e na qualidade edáfica (Pinzari et al., 1999). Os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e aliada à quantificação de bactérias e fungos totais, a avaliação de determinados grupos microbianos dá indicação de como os processos bioquímicos estão ocorrendo. Segundo Brookes (1995), a contagem de microrganismos no solo, apesar de ser

vista com ressalvas, ajuda a entender os processos que nele ocorrem e pode servir como indicador do impacto de diferentes atividades antrópicas. As bactérias e os fungos são responsáveis por cerca de 90% da atividade da biomassa microbiana (Siqueira, 1994). As bactérias do solo apresentam maior abundância e diversidade entre as espécies, encontradas no solo, com cerca de 10^3 a 10^9 organismos por grama de solo. Os fungos, principais contribuintes em peso para a biomassa microbiana do solo, são encontrados com comunidades variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama de solo e podem ser responsabilizados por aproximadamente 70% da matéria seca (Brandão, 1992).

A biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo e funcionalmente atua como agente de transformação da matéria orgânica no ciclo de nutrientes e no fluxo de energia, representando importante compartimento de carbono e nutrientes no solo (Wardle, 1992). O reconhecimento da importância dos microorganismos do solo tem levado a um aumento no interesse em se medir os nutrientes contidos em suas biomassas, cuja estimativa fornece dados úteis sobre mudanças nas propriedades biológicas do solo decorrentes do seu uso. O teor de carbono e a biomassa microbiana são influenciados pelo tipo de uso da terra, sendo importantes indicadores da alteração imposta pelo cultivo do solo (Cattelan & Vidor, 1990 a).

Geralmente observa-se maior sensibilidade da biomassa microbiana a mudanças iniciais do conteúdo de carbono, sendo a relação C microbiano/C orgânico um índice indicativo das alterações em ecossistemas com interferência antrópica (Insan & Domsch, 1988). A biomassa microbiana é influenciada pelo teor de argila dos solos. A argila aumenta a adsorção de compostos orgânicos e nutrientes, proporciona maior capacidade tampão e protege os microrganismos contra predadores. Solos com altos teores de argila apresentam maior imobilização de C e N pela biomassa microbiana (Carvalho, 2005).

A avaliação da biomassa é útil para prover informações rápidas sobre mudanças nas propriedades orgânicas do solo, detectar mudanças causadas por cultivos ou devastação de florestas, ou determinar a regeneração de solos após a remoção da camada superficial e avaliar os efeitos da poluição com metais pesados e pesticidas (Powlson et al., 1987; Grisi, 1995). Segundo Pereira et al. (2004), a biomassa microbiana, a hidrólise do diacetato de fluoresceína e a fosfatase alcalina podem ser usadas como características indicativas de alterações na atividade microbiana em solos do semi-árido. Métodos de estudo da biomassa microbiana do solo apresentam vantagens e desvantagens e em muitos casos “a precisão não é

necessária quando o carbono microbiano está sendo usado para revelar as diferenças relativas entre solos, o efeito de práticas agrícolas e as flutuações entre os períodos climáticos” (Sparling et al., 1990). Nem sempre há correlação entre biomassa e atividade microbiana e entre biomassa e comunidade microbiana. No entanto, resultados obtidos por Cattelan & Vidor (1990 b) em solos degradados mostraram correlações significativas entre biomassa e atividade microbiana e entre biomassa e populações de fungos e bactérias cultiváveis. Silveira et al. (2006) verificaram que atividades antrópicas exercidas em área localizada em Itajubá-MG tiveram forte impacto negativo na microbiota do solo, reduzindo o número de bactérias, fungos, atividade e biomassa microbiana.

A respiração microbiana apresenta grande potencial de utilização como indicador da qualidade dos solos em áreas degradadas, relacionando-se com a perda de carbono orgânico do sistema solo-planta para a atmosfera, reciclagem de nutrientes, resposta a diferentes estratégias de manejo do solo (Parkin et al., 1996). A respiração basal é definida como a respiração sem adição de CO_2 ou consumo de O_2 e traduz a capacidade metabólica da microbiota edáfica em degradar compostos orgânicos em condições aeróbias (Van Cleve et al., 1979). A produção de CO_2 é parte final do metabolismo oxidativo de organismos heterotróficos (Hernández & Garcia, 2003). A respiração é o parâmetro mais antigo utilizado na quantificação da atividade metabólica nos solos (Nsabimana et al., 2004). Assim como outras atividades metabólicas, a respiração é dependente do estado fisiológico da célula, sendo influenciada por diversos fatores no solo, tais como umidade, temperatura, estrutura do solo e disponibilidade de nutrientes (Carvalho, 2005). Em solos com elevados teores de carbonato pode haver liberação abiótica do CO_2 (Hernández & Garcia, 2003). O CO_2 pode ser quantificado por vários métodos, mas freqüentemente se utiliza solução básica (KOH ou NaOH) para adsorção do CO_2 que é titulada com HCl (Grisi, 1978). A interpretação dos resultados da atividade biológica deve ser feita com critério, uma vez que elevados valores de respiração nem sempre indicam condições desejáveis: uma alta taxa de respiração pode significar, a curto prazo, liberação de nutrientes para as plantas e, a longo prazo, perda de carbono orgânico do solo para a atmosfera (Parkin et al. 1996; Vasconcelos et al., 1998).

Anderson & Domsch (1993) propuseram a determinação do quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), que tem por definição a relação entre a quantidades de CO_2 produzida por unidade de C da biomassa microbiana e por unidade de tempo, como componente relevante na avaliação dos efeitos ambientais e antropogênicos sobre a atividade microbiana do solo. O $q\text{CO}_2$,

também denominado de respiração específica é maior em comunidades ecologicamente imaturas ou em comunidades que estejam sob alguma situação de estresse, onde os microrganismos precisam gastar grande quantidade de energia. O quociente metabólico deve ser interpretado com cuidado, uma vez que baixa taxa de respiração específica pode indicar que parte da microbiota é pouco ativa devido à deficiência do substrato, ou devido à proteção física em agregados (Sparlin, 1997).

As enzimas estão associadas à vida das células metabolicamente ativas. Portanto, as fontes de enzimas para o solo são os microrganismos, os vegetais e a fauna. Os microrganismos produzem enzimas extracelulares para a quebra de moléculas de elevado peso molecular, que posteriormente podem ficar na solução do solo. As enzimas também podem ser liberadas pela morte e lise celular dos microrganismos ou ainda por modificação da permeabilidade celular (Burns, 1986). A hidrólise da FDA é usada como indicador geral da atividade hidrolítica, incluindo proteases, lipases e esterases que também são capazes de clivar compostos fluorogênicos (Taylor et al., 2002), sendo essa reação catalisada por enzimas produzidas pelos microrganismos, algas, protozoários, resíduos de tecidos animais ou por enzimas extracelulares, (Battin, 1997; Monteiro, 2000), por isso fornece medida da atividade enzimática geral do solo (Bandick & Dick, 1999). Substâncias fluorogênicas são enzimaticamente transformadas em produtos fluorescentes, indicativos do estágio metabólico celular (Lundgren, 1981).

A ação catalítica pode ser considerada uma medida da atividade microbiana total, embora as enzimas envolvidas nesta reação apresentem atividade externa à célula, podendo se encontrar complexadas com os colóides do solo (Swisher & Carrol, 1980). Em particular, a atividade enzimática no solo proporciona catálise de inúmeras reações necessárias ao ciclo de vida dos microrganismos, na decomposição de resíduos orgânicos durante o ciclo de nutrientes e na formação da matéria orgânica e estrutura do solo (Burns, 1978), onde a presença da cobertura vegetal é um importante fator na qualidade do solo, pelo fornecimento de fontes de energia necessária à manutenção da população microbiana no solo (Pascual et al., 2000).

Os ésteres de fluoresceína são compostos apolares e podem ser transportados através das membranas para o interior de células vivas; por outro lado, os produtos fluorescentes são polares e permanecem dentro das células, podendo ser medidos por espectrofotometria (Monteiro, 2000). O uso da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) é uma alternativa

para se avaliar o impacto de práticas agrícolas na atividade enzimática geral (Aon et al., 2001; Taylor et al., 2002). O diacetato de fluoresceína (3'-6' diacetil-fluoresceína), conjugado por dois radicais de acetato, é um composto incolor e quando hidrolisado pelas enzimas, libera a fluoresceína, que absorve luz fortemente em 490 nm. A hidrólise de FDA tem sido utilizada como medida da atividade microbiana no solo, por ser um método simples, rápido e seguro. Segundo Taylor et al. (2002), a atividade de hidrólise de FDA foi positivamente correlacionada com a abundância de bactérias, teores de matéria orgânica, biomassa microbiana, tanto em solos arenosos quanto argilosos. Correlações positivas entre atividade de hidrólise do FDA e emissão de CO₂ foram também referidas (Araújo et al., 2003; Nsabimana et al., 2004). Pereira et al. (2004) verificaram maior atividade de hidrólise de FDA em solos cultivados com *Atriplex nammularia* durante o período seco, referindo que a hidrólise de FDA não pode ser considerada um parâmetro específico da atividade enzimática de bactérias e fungos no solo, pois essa reação também pode ser catalisada por outros organismos como algas e protozoários.

Os microrganismos estão presentes tanto no solo como na rizosfera, onde realizam atividades metabólicas relevantes para o crescimento das plantas. Estudo sobre a biota do solo como indicadores de bioatividade e das interferências no ambiente são importantes no cenário ecológico e precisam ser incentivados.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, J.D., Hentrick, B.A.D., Jurgenson, J.E. Isolate specific detection of mycorrhizal fungi using genome specific primer pairs. **Mycologia** 88 (6): 939-946, 1996.
- Abbott, L.K., Gazeij, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. **Plant and Soil** 159: 69-78, 1994.
- Alexander, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons. 1977, 472p.
- Allen, M.F. **The ecology of mycorrhizae**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 184p.
- Allen, M.F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. **Mycological Research** 100 (7): 769-782, 1996.

- Allen, E.B., Rincon, E., Allen, M.F., Jimenez, A.P., Huante, P. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in México. **Biotropica** 30 (2): 261-274, 1998.
- Allen, M.F., Swenson, W., Querejeta, J.I., Egerton-Warburton, L.M., Treseder, K.K. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. **Annual Review of Phytopathology** 41: 271-303, 2003.
- Almeida, R.T., Schenck, N.C. A revision of the genus *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales) **Mycologia** 82 (6): 703-714, 1990.
- Ames, R.N.; Schneider, R.W. *Entrophospora*, a new genus in the Endogonaceae. **Mycotaxon** 8: 347-352, 1979.
- An, Z.Q., Hendrix, J.W., Hershman, D.E., Henson, G.T. Evaluation of the “most probable number (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. **Mycologia** 85 (5): 576-581, 1990.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry** 25: 393-395, 1993.
- Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaner, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L., Cortassa, S. I-Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology** 18: 239-254, 2001.
- Araujo, A.S.F., Monteiro, R.T.R., Abarkeli, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere** 52:799-804, 2003.
- Bandick, A.K., Dick, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry** 31: 1471-1479, 1999.
- Bartolome-Esteban, H., Schenck, N.C. Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminum saturation. **Mycologia** 86 (2): 217-226, 1994.
- Battin, T.J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity natural stream sediments biofilm. **The Science of the Total Environment** 198: 51-60, 1997.
- Bentivenga, S.P., Morton, J.B. Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. In: F.L. Pleger; R.G. Linderman (Eds.). **Mycorrhiza and Plant Health**. 1994, p.283-308. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Bentivenga, S.P., Morton, J.B. A monography of the genus *Gigaspora* incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia** 87: 720-732, 1995.

- Berch, S.M., Koske, R.E. *Glomus pansihalos*, a new species in the Endogonaceae, Zygomycetes. **Mycologia** 78: 832-836, 1986.
- Berkeley, M.J., Broome, C.E. Fungy of ceylon. **Journal of the Linnaean Society** 14: 137, 1873.
- Bird, S.B., Herrick, J.E., Wander, M.M., Wright, S.F. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. **Environmental Pollution** 116: 445-455, 2002.
- Boerner, R.E.J., DeMars, B.G., Leicht, P.N. Spatial patterns of mycorrhizal infectiveness of soil along a successional chronosequence. **Mycorrhiza** 6 (2): 79-90, 1996.
- Bonito, R. Di., Elliot, M.L., Des Jardin, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 61 (7): 2809-2810, 1995.
- Bononi, V.L.R., Trufem, S.F.B. Endomicorrizas vesículo-arbusculares do cerrado da reserva biológica de Moji-Guaçu, SP, Brasil. **Rickia** 10: 55-84, 1983.
- Bononi, V.L.R., Trufem, S.F.B., Zangaro, W. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 16: 603-622, 2000.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254, 1976.
- Brandão, E.M. Os componenetes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso, E.J.B.N; Tsai, S.M.; Neves, M.C. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Cap.1, p.1-15, 1992.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** 83: 3746-3750, 1986.
- Brookes, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology Fertility of Soils** 19: 269-279, 1995.
- Brundrett, M.C., Abbott, L.K. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. **New Phytologist** 127: 539-546, 1994.
- Burns, R.G. Interactions between agrochemichals and soil enzymes. In: R.G. Burns (Ed.). **Soil Enzymes**. 1978. p.295-340. Academic Press, London.
- Burns, R.G. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: P.M. Huang, M. Schnitzer (Eds.) **Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes**. 1986, p.429-451. Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin.

- Caproni, A.L. **Fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas remanescentes da mineração de bauxita em Porto Trombeta/PA**. Seropédica – UFRRJ, 186p. 2001, (Tese de Doutorado).
- Caproni, A.L., Franco, A.A., Berbara, R.L.L., Granha, J.R.D.O., Ribeiro, E.M.S., Saggin Jr., O.J. Capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas após mineração de bauxita no Pará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 38 (8): 937-945, 2003.
- Caravaca, F. Alguacil, M.M., Barea, J.M., Roldán, A. Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry** 37: 227-233, 2005.
- Carrenho, R, Silva, E.S., Trufem, S.F.B., Bononi, V.L.R. Sucessive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 32 (4): 262-270, 2001a.
- Carrenho, R; Trufem, S.F.B., Bononi, V.L. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de três espécies de fitobiontes instalados em área de mata ciliar revegetada. **Acta Botanica Brasilica** 15 (1): 115-124, 2001b.
- Carrenho, R., Trufem, S.F.B., Bononi, V.L. Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agroecosystem. **Revista Brasileira de Botânica** 25 (1): 93-101, 2002.
- Carvalho, F. **Atributos bioquímicos como indicadores da qualidade do solo em florestas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no estado de São Paulo**. Piracicaba: USP, 2005. 79p. (Dissertação de Mestrado).
- Cattelan, A. J., Vidor, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 14: 133-142, 1990a.
- Cattelan, A.J., Vidor, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 14 (2): 125-132, 1990b.
- Clapp, J. P., Young, J. P. W., Merryweather, J. W. & Fitter, A. H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist** 130: 259-265. 1995.
- Collozzi-Filho, A., Balota, E.L. Micorrizas arbusculares. In: M. Hungria, R.S. Araújo (eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, Cap. 20, 1994, p.383-418. Brasília, EMBRAPA-SPI.
- Daniels, B.A., Graham, S.O. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. **Mycologia** 68: 108-116, 1976.
- Daniels, B.A., Trappe, J.M. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. **Mycologia** 72: 457-471, 1980.

- Day, L.D., Sylvia, D.M., Collins, M.E. Interactions among vesicular-arbuscular mycorrhizae, soil, and landscape positions. **Soil Science Society of American Journal** 51: 635-639, 1987.
- De Souza, F.A. Kowalchuk, G.A., Leeflang, P., Van Veen, J.A., Smith, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter-and-intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 1413-1424, 2004.
- De Souza, F.A., Declerck, S., Smit, E., Kowalchuk, G.A. Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). **Mycological Research** 109 (6): 697-706, 2005.
- Dodd, J., Krikun, J., Hass, J. Relative effectiveness of indigenous populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from four sites in Negev. **Israel Journal of Botany** 32: 10-21, 1983.
- Doran, J.W., Safley, M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (eds) **Biological indicators of soil Health**. 1997. p.1-28. Wallingford: CAB International.
- Doran, J.W., Zeiss, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology** 15 (1): 3-11, 2000.
- Dotzler, N., Krings, M., Taylor, T.N., Agerer R. Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. **Mycological Progress** 5: 178-184, 2006.
- Douds, D.D., Millner, P.D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 74: 77-93, 1999.
- Enkhtuya, B., Rydlová, J., Vosátka, M. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. **Applied Soil Ecology** 14: 201-211, 2000.
- Feldmann, F., Idczak, E. 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**. 1992, p.799-817. Academic Press, London.
- Fernandes, A.B., Siqueira, J.O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiro da região sul do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 24 (12): 1489-1498, 1989.
- Ferreira, C.A.G. Recuperação de áreas degradadas. **Informe Agropecuário** 21 (202): 127-130, 2000.

- Fischer, C.R., Janos, D.P., Perry, D.A., Linderman, R.G., Sollins, P. Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. **Biotropica** 26 (4): 369-377, 1994.
- Fitter, A. H. The role and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhizas in temperate ecosystems. **Agricultural Ecosystems Environmental** 29: 137-151, 1990.
- Focchi, S.S., Soglio, F.K.D., Carrenho, R., Souza, P.V.D., Lovato, P.E. Fungos micorrízicos em cultivos de citros sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (5): 469-476, 2004.
- Franco, A.A., Dias, L.E., Campello, E.F.C., Silva, E.M.R., & Faria, S.M. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. In: F. Esteves (ed.). **Oecologia Brasilienses**, 1995, p.459-467. UFRJ, Rio de Janeiro.
- Franke, M., Morton, J.B. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. **Canadian Journal of Botany** 72: 122-134, 1994.
- Franke-Snyder, M., Douds JR, D.D., Galvez, L., Phillips, J.G., Wagoner, P., Drinkwater, L., Morton, J.B. Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. **Applied Soil Ecology** 16: 35-48, 2001.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F. Microbial activity of soils under Mediterranean environmental conditions. **Soil Biology and Biochemistry** 26: 1185-1191, 1994.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns, and J. W. Taylor. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal Botany** 69: 180-190, 1991.
- Gerdemann, J.W.; Trappe, J.M. The Endogonaceae of the Pacific Northwest. **Mycologia Memoir** 5: 1-76, 1974.
- Gomes, S.P., Trufem, S.F.B. Fungos micorrízicos arbusculares (Glomales, Zygomycota) na Ilha dos Eucaliptos, Represa de Guarapiranga, São Paulo, SP. **Acta Botanica Brasilica** 12 (3): 393-401, 1998.
- González-Chavez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution** 130: 317-323, 2004.
- Gould, A.B., Hendrix, J.W., Ferriss, R.S. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. 1. Propagule and spore population densities. **Canadian Journal of Botany** 74: 247-261, 1996.

- Gould, A.B., Hendrix, J.W. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. II. Mycorrhizal fungal communities. **Canadian Journal of Botany** 76: 204-212, 1998.
- Goto, B.T., Maia, L.C. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. **Mycotaxon** 96: 129-132, 2006.
- Gravina, G.A. **Densidade de propágulos infectivos e capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), em solo sob leguminosas herbáceas perenes**. Seropédica, 1998. 104p. (Dissertação de Mestrado, UFRRJ).
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Seri, C., Fancelli, S., Fani, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiology Letters** 127: 85-91, 1995.
- Grisi, B.M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura** 30: 82-88, 1978.
- Grisi, B.M. Biomassa e atividade de microrganismos do solo: revisão metodológica. **Revista Nordestina de Biologia** 10 (1): 1-22, 1995.
- Gugel, I.H.F.P. **Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cajueiro anão-precoc (Anacardium occidentale L.): efeito sobre a antracnose**. Recife, 2004. (Dissertação de Mestrado, UFPE).
- Habte, M. Soil acidity as a constraint to the application of vesicular-arbuscular mycorrhizal technology. In: varma, A., Hock, B. **Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology**, 1994, p.594-605. Springer-Verlag, Berlin.
- Harner, M.J., Ramsey, P.W., Rillig, M.C. Protein accumulation and distribution in foodplain and river foam. **Ecology Letters** 7: 829-836, 2005.
- Harney, S.K., Edwards, F.S., Allen, M.F. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. **Mycologia** 89 (4): 547-550, 1997.
- Hayman, D.S., Tavares, M. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. **New Phytologist** 100: 367-377, 1985.
- Hernández, T., Garcia, C. Estimación de la respiración microbiana del suelo. In: C.G. Izquierdo; F.G. Sotres; T.H. Fernández; C.T. Cepeda (eds.). **Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomassa Microbiana**. 2003, p.313-346. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Hetrick, B.A.D. Ecology of VA mycorrhizal fungi. In: C.L.I., Powell, D.J. Bagyaraj (Eds.). **VA Mycorrhiza**. 1985, p.35-55. Boca Raton: CRC Press.

Insam, H., Domsch, K. H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbial Ecology** 15: 177-188, 1988.

INVAM, 2001. <http://invam.caf.wvu.edu/MycInfo/Methods/Assays/MPN.htm>

Jahnel, M.C., Cardoso, J.B.N., Dias, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 23: 553-559. 1999.

Janos, D.P. Mycorrhiza applications in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? In: NG, F.S.P. (Ed.). **Trees and Micorrhizae**. 1988, p.133-188. Kuala Lumpur: Forest Research Institute.

Jasper, D.A. Management of mycorrhizas in revegetation. In: Robson, A.D., Abbott, L.K., Malajczuk, N. (Eds.). **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. 1994, p.211-219. Boston: Kluwer Academic.

Jasper, D.A., Abbott, L.K., Robson, A.D. 1994. Soil disturbance in native ecosystems- The decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi. In: D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter, I.J. Alexander (Eds.) **Mycorrhizas in Ecosystems**. 1994, p.151-155. CAB International, Cambridge.

Jasper, D.A., Davy, J.A. Root characteristics of nature plant species in relation to the benefit of mycorrhizal colonization for phosphorus uptake. **Plant and Soil** 155/156: 281-284, 1993.

Kennedy, A.C., Smith, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. **Plant and Soil** 170: 75-86, 1995.

Kennedy, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 74 (1): 65-76, 1998.

Kennedy, A.C. Microbial diversity in agroecosystem quality. In: Collins, W.W., Qualset, C.O. (Eds.). **Biodiversity in Agroecosystems**. Cap.1, 1999, p.1-17. CRC Press. Boca Raton.

Klauber-Filho, O., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira Ciência do Solo** 26 (1): 125-134, 2002.

Koske, R.E., Gemma, J.N.. *Scutellospora hawaiiensis*: a new species of arbuscular mycorrhizal fungus from Hawaii. **Mycologia** 87 (5): 678-683, 1995.

Koske, R. E., Bonin, C., Kelly, C., Martinez, C. Effects of sea water on spore germination of a sand-dune-inhabiting arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycologia** 88 (6): 947-950, 1996.

Koske, R.E., Gemma, J.N., Jackson, N. Mycorrhizal fungi associated with three species of turfgrass. **Canadian Journal of Botany** 75: 320-332, 1997.

- Kowalchuk, G.A., De Souza, F.A., Van Veen, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology** 11: 571-581, 2002.
- Lambais, M.R., Cardoso, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de FMA e da colonização micorrízica de *Stylosantes guanensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 12: 249-255, 1988.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C., Bonfante, P. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, na arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Ecology** 4: 61-68, 1995.
- Lanfranco, L., Delpero, M., Bonfante, P. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Molecular Ecology** 8: 37-45, 1999.
- Lanfranco, L., Bianciotto, V., Lumini, E., Souza, M., Morton, J.B., Bonfante, P. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytologist** 152: 169-179, 2001.
- Leal-Bertioli, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, Editora: RAPP. 6:197-230, 1998.
- Loree, M.A.J., Willams, S.E. Colonization of western wheatgrass (*Agropyron smitii* Rydb) by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during the revegetation of a surface mine. **New Phytologist** 106: 753-744, 1987.
- Louis, I., Lim, G. Spore density and root colonization of vesicular-arbuscular mycorrhizas in tropical soil. **Transactions of the British Mycological Society** 88 (2): 207-212, 1987.
- Lovelock, C.E., Wright, S.F., Nichols, K.A. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphae growth: an example from a tropical rain forest soil. **Soil Biology and Biochemistry** 36: 1009-1012, 2004.
- Lundgren, B. Fluorescein diacetate as a stain metabolically active bacteria. **Oikos** 36: 17-22, 1981.
- Lutgen, E.R., Muir-Clairmont, D., Graham, J., Rillig, M.C. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a Western Montana grassland. **Plant and Soil** 57 (1): 71-83, 2003.
- Lynch, J.M., Bragg, E. Microorganism and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science** 2: 133-171, 1985.
- Maia, L.C., Trufem, S.F.B. Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botanica** 13 : 89-95, 1990.
- Maia, L.C., Kimbrough, J.W. Ultrastructural studies of spore walls of *Acaulospora morrowiae* and *A. scrobiculata*. **Mycological Research** 97: 1183-1189, 1993.

- Maia, L.C., Kimbrough, J.W. Ultrastructural studies of spores of *Glomus intraradices*. **International Journal of Plant Science** 155: 689-698, 1994.
- Maia, L.C., Kimbrough, J.W., Benny, G. Ultrastructure of hyphae in *Gigaspora albida* Schenck & Smith (Glomales). **Boletim Micológico** 9: 57-63, 1994.
- Maia, L.C., Yano-Melo, A.M., Cavalcanti, M.A. Diversidade de fungos no Estado de Pernambuco. In: Tabarelli, M., Silva, J.M.C. (org.). **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. vol. 1. 2002, p. 15-50. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco. Editora Massangana, Recife.
- Maia, L.C., Yano-Melo, A.M. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils. In: Mehrotra, V.S. (Ed.). **Mycorrhiza: Role and Applications**. New Delhi: Allied Publishers Pvt, 2005. cap. 10, p. 282-302.
- Marinho, N.F., Caproni, A.L., Franco, A.A., Berbara, R. L.L. Resposta de *Acacia mangium* Willd e *Sclerolobium paniculatum* Vogel a fungos micorrízicos arbusculares nativos provenientes de áreas degradadas pela mineração de bauxita na Amazônia. **Acta Botanica Brasilica** 18 (1): 141-149, 2004.
- Martins, C. R., Miranda, J. C. C., Miranda, L.N. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de *Aristida setifolia* Kunth em áreas degradadas do cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34 (4): 655-674, 1999.
- Marx, D.H. Stabilizing ecosystems with VAM fungi: significance of VAM fungi in natural plant succession on disturbed arid and semi-arid lands. **PlantHealthCare.com online magazine**, Fevereiro, 2000.
- Melloni, R., Siqueira, J.O., Moreira, F. M. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 38 (2): 267-276, 2003.
- Melo, A.M.M. **Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em fragmentos de Mata Atlântica, Complexo Catende**. UFPE, Recife, 2004. (Dissertação de Mestrado).
- Mendes-Filho, P.F. **Potencial de reabilitação do solo de uma área degradada, através da revegetação e do manejo microbiano**. Piracicaba: USP, 2004. 89p. (Tese de Doutorado).
- Mergulhão, A.C.E.S., Goto, B.T., Maia, L.C., Burity, H.A., Ribeiro, J.R.A., Pereira, R.C.A. **Estudos preliminares da ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares e vegetais em áreas de caatinga nativa e degradada por mineração de gipsita, na região de Araripina, Pernambuco**. In: FERTBIO (XXVI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, X Reunião Brasileira sobre Micorrizas, VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, V Reunião Brasileira de Biologia do Solo), Lages - SC, 2004.
- Mehrotra, V.S. Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in Índia. **Journal of Agricultural Science** 130: 125-133, 1998.

- Merryweather, J., Fitter A. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. **New Phytologist** 138: 117–129, 1998.
- Millner, P.D., Mulbry, W.W., Reynolds, S.L., Patterson, C.A. A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza** 8: 19-27, 1998.
- Millner, P.D., Mulbry, W.W., Reynolds, S.L. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. **Mycorrhiza** 10: 259-265, 2001a.
- Millner, P.D., Mulbry, W.W., Reynolds, S.L. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of two ancient endomycorrhizal fungi, *Glomus occultum* and *Glomus brasilianum*. **FEMS Microbiology Letters** 196: 165-170, 2001b.
- Millner, P.D., Wright, S.F. Tools for support of ecological research on arbuscular mycorrhizal fungi. **Symbiosis** 33: 101-123, 2002.
- Monteiro, R.T.R. Estimativa da atividade microbiana: método de hidrólise do diacetato de fluoresceína. R.T.S. Frigheto, P.J. Valarini (Coords.). **Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo: Manual Técnico**. 2000, p.133-137. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626p.
- Morton, J.B. Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminium, low pH soils in West Virginia. **Mycologia** 78(4): 641-648, 1986.
- Morton, J.B. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. **Mycologia** 82: 192-207, 1990.
- Morton, J.B., Benny, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes). A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon** 37: 471-491, 1990.
- Morton, J.B. Problems and solutions for the integration of Glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. **Mycorrhiza** 2: 97-109, 1993.
- Morton, J.B. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequence. **Mycologia** 87: 127-137, 1995.
- Morton, J.B., Franke, M., Bentivenga, S.P. Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in glomales (Zygomycetes), In: Varma, A., Hock, B. **Mycorrhiza, Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology**, 1995. 666p. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Morton, J.B., Redecker, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia** 93 (1): 181-195, 2001.
- Mosse, B. Honey-coloured, sessil *Endogone* spores. II. Changes in fine structure during spore development. **Arch Mikrobiol** 74: 129-145, 1970a.
- Mosse, B. Honey colored, sessil *Endogone* spores. III Wall structure. **Arch Mikrobiol** 74: 146-159, 1970b.
- Muyzer, G., Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 695-700, 1993.
- Muyzer, G. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspective. In: International Symposium on Microbial Ecology, 8., Halifax, 1999. **Proceedings**. <http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium16/muyzer.PDF> (9 Mar. 2002).
- Nsabimana, D., Haynes, R.J., Wallis, F.M. Size, activity and catabolic diversity of the microbial biomass as affected by land use. **Applied Soil Ecology** 26: 81-92, 2004.
- Odum, E.P. **Ecologia**, São Paulo, Guanabara, 1988.
- Oehl, F., Sieverding, E. *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungi genus in the Glomeromycetes. **Journal of Applied Botany** 78: 72-82, 2004.
- Öpik, M., Moora, M., Lira, J., Koljalg, U., Zobel, M., Sem, R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. **New Phytologist** 160: 581-593, 2003.
- Parkin, T.B., Doran, J.W., Franco-Vizcaíno, E. Field and laboratory tests of soil respiration. In: Doran, J.W., Jones, E. (Ed.). **Methods for Assessing Soil Quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996, p.231-245.
- Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, T., Moreno, J.L., Ros, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. **Soil Biology and Biochemistry** 32: 1877-1883, 2000.
- Pereira, S.V., Martinez, C.R., Porto, E.R., Oliveira, B.R.B., Maia, L.C. Atividade microbiana em solo do semi-árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (8): 757-762, 2004.
- Pfleger, F.L., Stewart, E.L., Noyd, R.K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: Pfleger, F.L., Linderman, R.G. (Ed.). **Mycorrhizae and plant growth**. St. Paul: APS Press, 1994, p.47-81.

- Pielou, E.C. **Population and community ecology: Principles and methods**. New York: Gordon & Breach, 1983. 424p.
- Pinto-Coelho, R.M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 252 p.
- Pinzari, F., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P. Use of biochemical indices in the mediterranean environment: comparison among soils under different Forest vegetation. **Journal of Microbiological Methods** 36: 21-28, 1999.
- Piotrowski, J.S., Denich, T., Klironomos, J.N., Graham, J.M. & Rillig, M.C. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depends on the interaction between plant and fungal species. **New Phytologist** 164: 365-373, 2004.
- Pirozynski, K. A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany** 59:1824-1827, 1981.
- Pirozynski, K. A., Dalpé, Y. Geological history of the Glomaceae, with particular reference to mycorrhizal symbiosis. **Symbiosis** 7: 1-36, 1989.
- Plenchette, C., Perrin, R., Duvert, P. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. **Canadian Journal of Botany** 67: 112-115, 1989.
- Powlson, D.S., Brookes, P.C., Christensen, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry** 19 (2): 159-164, 1987.
- Ramos-Zapata, J., Guadarrama, P. Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales. **Universidad y Ciencia**, número especial I: 59-65, 2004.
- Rao, A.V., Tarafdar, J.C. Significance of micro-organisms in afforestation programmes in arid zone. **Annals of Arid Zone** 37 (4): 337-346, 1998.
- Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C., Werner, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. **Applied and Environmental Microbiology** 63: 1756-1761, 1997.
- Redecker, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza** 10: 73-80, 2000.
- Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molecular Phylogenetics Evolution** 14: 276-284, 2000a.
- Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. **Mycologia** 92 (2): 282-285, 2000b.

- Reeves, F.B., Redente, E.F. The importance of mutualism in succession. In: J. Skujins (Ed.). **Semiarid lands and deserts, soil resource and reclamation**, 1991, p.423-442. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ribeiro, B.F. **Minérios e ambiente**: Mineração efeitos no meio ambiente e saúde humana, Campinas: Editora UNICAMP, 2000. cap. 18, p.325-339.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Kimball, B.A., Pinter, P.J. Wall, G.W., Ottman, M.J., Leavitt, S.W. Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a *Sorghum* field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. **Global Change Biology** 7: 333-337, 2001a.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F., Torn, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil** 233: 167-177, 2001b.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. **Plant and Soil** 238 (2): 325-333, 2002.
- Rillig, M.C., Ramsey, P.W., Morris, S., Paul, E.A. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. **Plant and Soil** 253 (2): 293-299, 2003.
- Rillig, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science** 28 (4): 355-363, 2004.
- Rillig, M.C. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? **Pedobiologia** 49: 395-399, 2005.
- Rillig, M.C., Lutgen, E.R., Ramsey, P.W., Klironomos, J.N., Grannon, J.E. Microbiota to accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. **Pedobiologia** 49: 251-259, 2005.
- Rodriguez, A., Clapp, J.P., Robinson, L., Dodd, J.C. Studies on the diversity of the distinct phylogenetic lineage encompassing *Glomus claroideum* and *Glomus etunicatum*. **Mycorrhiza** 15: 33-46, 2005.
- Ros, M., Hernandez, M.T., Garcia, C. Soil microbial activity after restoration for a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology and Biochemistry** 35 (3): 463-469, 2003.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Mendonça-Hagler, L.C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Lopes, A.S., Guilherme, L.R.G., Faquin, V., Frutini-Neto, A.E., Carvalho, J.G. (Eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. 1999, p.429-228. Viçosa: SBSCS, Lavras: UFLA/DCS.

- Rosso, S. Amostragem, repartição espacial e diversidade/dominância de comunidades de costões rochosos: uma abordagem metodológica. Laboratório de Ecologia Marinha/USP. Site: <http://www.eco.ib.usp.br/labmar>, 1996.
- Ruivo, M.L., Barros, N.F., Schaeffer, C.E.R. Vegetação, biomassa microbiana e características químicas do solo como indicadores de reabilitação de áreas mineradas na Amazônia Oriental. **Revista de Ciências Agrárias** 36: 137-160, 2001.
- Salles, J. F., Souza, F.A. **Revisões em micorriza I: Técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia, Nov. 1998, 24p (Embrapa – CNPAB. Série Documentos, 68).
- Sanders, J.R., Alt, M., Groope, K., Boller, T., Wiemken, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist** 130 (3): 419-427, 1995.
- Sarig, S., Steinberger, Y. Microbial biomass response to seasonal fluctuation in soil salinity under the canopy of desert halophytes. **Soil Biology and Biochemistry** 26: 1405-1408, 1994.
- SECTMA. Ações e áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Pernambuco. In: **Atlas da Biodiversidade de Pernambuco**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco, Recife. http://www.sectema.pe.gov.br/acoes_todos.asp. Acesso em 19/07/2006.
- Schachtman, D.P. Reid, R.J., Ayling, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology** 116: 447-453, 1998.
- Schenck, N.C., Siqueira, J.O. Ecology of VA mycorrhizal fungi in temperate agroecosystems. In: Sylvia, D.M., Hung, L.L., Graham, J.H. (eds.). **Mycorrhizae in the next decade**. 1987, p. 2-14. 7th North American Conference on Mycorrhizae. Gainesville.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research** 105: 1413-1421, 2001.
- Sharma, K.O., Gough, L.P., Kumar, S., Sharma, B.K., Saxena, S.K. Recent developments in the reclamation of surface mined lands. **Annals of Arid Zone** 36 (4): 311-326. 1997.
- Sieverding, E., Oehl, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. **Journal of Applied Botany and Food Quality** 80: 69-81, 2006.
- Silva, G.A. **Fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga nativa e degradada por mineração, no estado da Bahia, Brasil**. Recife: UFPE, 2000. 69p. (Dissertação – Mestrado).

- Silva, G.A., Maia, L.C., Silva, F.S.B., Lima, P.C.F. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira Botânica** 24: 135-143, 2001.
- Silva, G.A. **Aspectos taxonômicos e filogenéticos em fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota)**. Recife: UFPE 2004, 155p. (Tese de Doutorado).
- Silva, G.A., Trufem, S. F. B., Saggin-Júnior, O.J., Maia, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. **Mycorrhiza** 15:47-53, 2005.
- Silva, F.S.B. **Fase assimiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos**. Recife, 2006. 291p. (Tese de Doutorado).
- Silva-Júnior, J.P. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares associados à pupunha e ao cupuaçu cultivados em sistema agroflorestal e em monocultivo na Amazônia Central**. Piracicaba: USP, 2004, 95p. (Tese de Doutorado).
- Silveira, A.P.D. Micorrizas. In: E.J.B.N. Cardoso, S.M. Tsai, M.C.P. Neves (Coords). **Microbiologia do solo**. 1992, p.257-296. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Silveira, A.P.D. Ecologia de fungos micorrízicos arbusculares. In: Melo I.S., Azevedo, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. 1998, 486p. Jaguariana. Embrapa-CNPMA.
- Silveira, R.B., Melloni, R., Melloni, E.G.P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas em Itajubá/MG. **Cerne** 12 (1): 48-55, 2006.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R. C., Lalonde, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature** 363: 67-69, 1993.
- Siqueira, J.O., Hubbell, D.H., Valle, R.R. Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 19 (12): 1465-1474, 1984.
- Siqueira, J.O., Sylvia, D.M., Gibson, J., Hubbel, D.H. Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology** 31: 965-972, 1985.
- Siqueira, J.O., Colozzi-Filho, A., Oliveira, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 24 (12): 1499-1506, 1989.
- Siqueira, J.O. Micorrizas arbusculares. In: Araújo, R.S., Hungria, M. **Microrganismos de importância agrícola**. 1994. p.152-194. Brasília –DF: EMBRAPA – SPI.

- Siqueira, J.O., Klauberg-Filho, O. Micorrizas arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva. In: R.F. Novais, V.H.V. Alvarez, C.E.G.R. Schaefer (Eds). **Tópicos em Ciência do Solo**. 2000, p.235-259. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Siqueira, J.O., Soares, C.R.F.S. **Micorrizas na reabilitação de solos degradados**. In: XXX Congresso Brasileiro Ciência do Solo, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Recife, 2005.
- Souza, F.A., Silva, E.M.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: J. O. Siqueira (Ed). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. 1996, p.255-290. Lavras: UFLA/DCS e DCF.
- Souza, R.G., Trufem, S.F.B., Sales, M.F., Maia, L.C. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga, na região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 26 (1): 49-60, 2003.
- Spain, J.L., Sieverding, E., Schenck, N.C. *Gigaspora ramisporophora*: a new species with novel sporophoros from Brazil. **Mycotaxon** 34: 667-677, 1989.
- Spain, J.L., Miranda, J.C. *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Gigasporaceae (Glomales) from the cerrado region of Brazil. **Mycotaxon** 60: 129-136, 1996a.
- Spain, J.L., Miranda, J.C. *Glomus brasilianum*: an ornamented species in the Glomaceae. **Mycotaxon** 60: 137-142, 1996b.
- Sparling, G.P. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: Pankhurst, C., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Ed.). **Biological indicators of soil health**. 1997, p.91-119. Wallingford: CAB International.
- Sparling, G.P., Feltham, C.W., Reynolds, J., West, A.W., Singleton, P. Estimation of soil microbial C by fumigation-extraction method: Use soil of organic matter content, and a reassessment of the K_{ec} factor. **Soil Biology and Biochemistry** 22: 301-307, 1990.
- Stürmer, S.L., Bellei, M.M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the Island of Santa Catarina, Brazil **Canadian Journal of Botany** 72: 359-363, 1994.
- Stürmer, S.L., Morton, J.B. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. **Mycologia** 89 (1): 72-81, 1997.
- Stürmer, S.L., Morton, J.B. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patters. **Mycologia** 91 (5): 849-857, 1999.
- Stutz, J.C., Copeman, R., Martin, C.A., Morton, J.B. Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Namibia, Africa. **Canadian Journal of Botany** 78: 237-245, 2000.

- Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M., Honda, K. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. **Nucleic Acids Research** 24: 4501-4505, 1996.
- Swisher, R., Carroll, C.G. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surface. **Microbial Ecology** 6: 217-226, 1980.
- Sylvia, D.M., Schenck, N.C. Application of superphosphate to mycorrhizal plants stimulates sporulation of phosphorus-tolerant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** 95: 655-661, 1983.
- Sylvia, D.M., Williams, S.E. Vesicular arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds.) **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. 1992. p.101-124. Madison: American Society of Agronomy.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S. Burns, R.G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry** 34: 387-401, 2002.
- Thaxter, R. A. Revision of the Endogonaceae. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences** 57: 291-351, 1922.
- Tisdall, J.M.; Oades, J.M. Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. **Australian Journal Soil Research** 17: 429-441, 1979.
- Treseder, K.K., Mack, M.C., Cross, A. Relationships among fires, fungi, and soil dynamics in Alaskan boreal forests. **Ecological Applications** 14: 1826-1838, 2004.
- Trufem, S.F.B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da mata tropical úmida da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 4: 31-45, 1990.
- Trufem, S.F.B., Malatinszky, S.M.M., Otomo, H.S. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de plantas do litoral arenoso do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. 2. **Acta Botanica Brasilica** 8 (2): 219-229, 1994.
- Trufem, S.F.B., Malatinszky, S.M.M. Fungos micorrízicos arbusculares em Melastomataceae e outras plantas resistentes e sensíveis à poluição na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, SP, Brasil. **Hoehnea** 22 (1/2): 77-89, 1995.
- Trufem, S.F.B. Zygomycota. In: Joly, C.A., Bicudo, C.E.M. (Orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. 1. Microrganismos e Vírus**. 1999, p.33-42. São Paulo: FAPESP.
- Vallini, G., Pera, A., Avio, L. Valdrighi, M., Giovannetti, M. Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. **Biology and Fertility of Soils** 16: 1-4, 1993.

- Van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology** 15: 13-24, 2000.
- Van Cleve, K., Coiné, P.I., Goodwin, E., Johnson, C., Kelly, M. A comparison of four methods for measuring respiration in organic material. **Soil Biology and Biochemistry** 11: 237-246, 1979.
- Van der Heidjen, M.G.A., Boller, T., Wienken, A., Sanders, I.R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. **Ecology** 79 (6): 2082-2091, 1998.
- Varela-Castejón, C., González-Penalta, B., Vilariño, AS., Sainz, M.J. Fluorescent light inhibits the germination of propagules on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum*. **Soil Biology and Biochemistry** 30: 1845-1847, 1998.
- Vasconcelos, C.A., Figueiredo, A.P.H.D., França, G.E., Coelho, A.M., Bressan, W. Manejo do solo e a atividade microbiana em latossolo vermelho-escuro da região de Sete Lagoas, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 32: 1897-1905, 1998.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J.M.M., Wyss, U., Piche, Y. Systemic suppression of mycorrhizal colonization of Barley roots already colonized by AM fungi. **Soil Biology & Biochemistry** 32: 589-595, 2000.
- Walker, C. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. **Mycotaxon** 18: 443-455, 1983.
- Walker, C. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: II. A fifth morphological wall type in Endogonaceous spores. **Mycotaxon** 25: 95-97, 1986.
- Walker, C., Sanders, F.E. Taxonomic concept in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. **Mycotaxon** 27: 169-182, 1986.
- Walker, C., Schüßler, A. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. **Mycological Research** 108 (8): 981-982, 2004.
- Wardle, D.A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biology Review** 67: 321-358, 1992.
- Wardle, D.A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: M. Hungria, R.S. Araújo (eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, 1994, p.419-436. Brasília, EMBRAPA-SPI.
- Weber, O.B., Souza, C.C.M., Gondin, D.M.F., Oliveira, F.N.S., Crisóstomo, L.A., Caproni, A.L., Saggin Jr, O.J. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoces. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (5): 477-483, 2004.

- White, J.A., Munn, L.C., Williams, S.E. Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizal in Wyoming Red Desert Soils. **Soil Science of America Journal** 53 (1): 86-90, 1989.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gebfaud, J.J. Sminsky, J.J. White (Eds). **PCR Protocols. A Guide to Methods and Application**, 1990, p.315-322. Academic Press: San Diego.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** 95: 6578-6583, 1998.
- Wright, S.F., Franke-Snyder, M., Morton, J.B., Upadhyaya, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil** 181: 193-203, 1996.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science** 161: 575-586, 1996.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** 198: 97-107, 1998.
- Wright, S.F., Anderson, R.L. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the Central Great Planus. **Biology and Fertility of Soils** 31: 249-253, 2000.
- Wright, S.F., Nichols, K.A. Glomalin: hiding place for a third of the world's stored soil carbon. **Agriculture Research** 50: 4-7, 2002.
- Wyss, P., Bonfante, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research** 97: 1351-1357, 1993.
- Yano-Melo, A.M., Maia, L.C., Morgado, L.B. Fungos micorrízicos arbusculares em bananeiras cultivadas no Vale do Submédio São Francisco. **Acta Botanica Brasilica** 11(2): 115-121, 1997.
- Yano-Melo, A.M., Goto, B.T., Silva G.A., Maia, L.C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares no Brasil. In: Jardim, M.A.G.; Bastos, M.N.C.; Santos, J.U.M. (Eds.). Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal. **54º Congresso Nacional de Botânica e 3ª Reunião Amazônica de Botânica**. Belém: MPEG, UFRA, EMBRAPA, 2003 a, p.173-174.
- Yano-Melo, A.M., Trufem, S.F.B., Maia, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brasil. **Hoehnea** 30 (2): 79-87, 2003 b.

Zangaro, W., Bononi, V.L., Trufem, S.F.B. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 16: 603-622, 2000.

Zeze, A., Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V., Dullieu, H. Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in plant. **Applied and Environmental Microbiology** 62 (7): 2443-2448, 1996.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS IMPACTADAS POR MINERAÇÃO GESSEIRA NA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DE PERNAMBUCO

**Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão · Hélio Almeida Burity ·
Bruno Tomio Goto · Leonor Costa Maia**

**Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas impactadas
por mineração gesseira na região semi-árida de Pernambuco**

A. C. E. S. Mergulhão · H. A. Burity
Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, Laboratório de Biologia do
Solo/Genoma, Av. General San Martin, 1371, Bongi, 50761-000, Recife-PE, Brazil
e-mail: adalia@ipa.br

B. T. Goto · L. C. Maia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Departamento de Micologia, CCB, Av.
Professor Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Resumo Este trabalho teve como objetivos avaliar a influência do impacto ambiental produzido por mineração de gesso sobre a ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), para melhor conhecimento dos aspectos ecológicos incluindo solo, comunidade vegetal e época de coleta. Foram realizadas coletas de solo no período chuvoso (dezembro/2003) e seco (setembro/2004), em quatro áreas de mineração de gesso no semi-árido, em Araripina, Pernambuco: (AN) caatinga nativa preservada; (AM) arredores da mina; (AR) rejeito e (AI) interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração. Foram identificadas 27 espécies de plantas no período chuvoso e 29 no seco. Esporos de FMA foram extraídos do solo por peneiramento úmido e centrifugação, sendo identificados 29 e 28 táxons de FMA, respectivamente, no período chuvoso e seco. Menor dominância de espécies de FMA ocorreu na área preservada. A mineração de gesso causou danos ao local, diminuindo a diversidade de FMA e de plantas nas três áreas afetadas, em relação à caatinga nativa preservada. Baixos índices de similaridade vegetal e de FMA foram verificados entre a área nativa e as afetadas pela mineração. A maioria das espécies de FMA não apresenta o mesmo padrão de esporulação nos períodos chuvoso e seco. *Glomus intraradices* e *Paraglomus occultum* são os fungos mais comumente encontrados, tolerando bem as condições edáficas nas áreas impactadas, podendo assim ser testados em programas de revegetação em áreas afetadas pela mineração de gesso.

Palavras-chave: Áreas degradadas, taxonomia, mineração de gesso, micorrizas.

Introdução

O Brasil busca atualmente sua independência na extração mineral, embora sem adequado planejamento. Utilizando desordenadamente os recursos naturais, contribui para generalização das áreas degradadas em todo o território nacional (Ferreira, 2000). A degradação determina a perda da biodiversidade, diminuição da fertilidade do solo e interfere nos recursos hídricos, além de causar brusca alteração da paisagem (Mendes-Filho, 2004).

Embora importantes do ponto de vista econômico, as atividades mineradoras trazem sérias conseqüências para o ambiente (Siqueira & Soares, 2005), com efeitos negativos sobre processos e organismos do solo, inclusive sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), importantes constituintes da microbiota do solo (Melloni et al. 2003). A contribuição dos FMA deve-se principalmente à melhoria nutricional da planta hospedeira, em particular por disponibilizar nutrientes de baixa mobilidade no solo como P, Zn e Cu, aumentando a tolerância a estresses bióticos e abióticos e a agregação do solo (Jasper, 1994). A presença de FMA é fundamental para regeneração de ecossistemas naturais áridos, pois esses fungos têm papel significativo no estabelecimento e aumento da produtividade de espécies arbóreas em regiões áridas e semi-áridas, onde a produtividade da planta é limitada pela baixa fertilidade do solo (Rao & Tarafdar, 1998).

Em áreas degradadas há necessidade de estratégias que promovam a melhoria da formação de agregados do solo, como o uso de FMA. Nesse contexto, é recomendável a utilização de isolados nativos que assegurem o desempenho da associação e promovam melhor desenvolvimento dos seus hospedeiros vegetais. Isto implica no conhecimento básico da riqueza e abundância de espécies de FMA na área de interesse e de seus efeitos sobre as plantas hospedeiras (Ramos-Zapata & Guadarrama, 2004). Não existe consenso quanto ao melhor indicador relacionado com a importância biológica de cada espécie de FMA. Porém, o

cálculo do índice de abundância e frequência (IAF), baseado na presença de esporos, tem sido usado para estimar a atividade destes fungos no ambiente natural (Koske et al. 1997).

Há cerca de 80 espécies de FMA registradas no Brasil, das quais pelo menos 40 foram citadas no Nordeste (Yano-Melo et al. 2003 b). Trabalhos sobre a ocorrência de FMA em Pernambuco foram iniciados por Maia & Trufem (1990), em ecossistemas agrícolas. A partir de então, outros trabalhos em áreas cultivadas (Farias, 1994; Souza, 1994; Weber & Oliveira, 1994; Yano-Melo et al. 1997a; Gugel, 2004; Weber et al. 2004), impactadas (Yano-Melo et al. 2003a; Mergulhão et al. 2004; Silva et al. 2005), nativas de caatinga (Yano-Melo et al. 1997b; Souza et al. 2003) e em Mata Atlântica (Melo, 2004; Goto & Maia, 2005) foram realizados, aumentando assim o conhecimento sobre a diversidade de FMA na região (Maia et al. 2002). A caatinga é hoje um bioma considerado com grande perda de hábitat sendo um dos menos protegidos e mais vulneráveis (Albuquerque et al. 2002; Sampaio & Araújo, 2005). Entretanto, estudos em áreas do semi-árido são necessários para melhor conhecimento das espécies locais. Por outro lado, trabalhos sobre a ocorrência de FMA em ecossistemas impactados no Brasil são escassos (Carrenho et al. 2001; Melloni et al. 2003; Yano-Melo et al. 2003a; Caproni et al. 2003/2005; Marinho et al. 2004; Silva et al. 2005), não existindo relatos sobre espécies ocorrentes em áreas de mineração de gesso. Pesquisas nessas áreas são importantes para fornecer informações sobre espécies de FMA tolerantes a essa condição de estresse, as quais poderão ser úteis em programas de revegetação.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do impacto ambiental produzido pela mineração de gesso sobre a ocorrência e diversidade de FMA em áreas de caatinga, no semi-árido de Pernambuco.

Material e métodos

Áreas de estudo

Foram selecionadas áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita no Município de Araripina, PE ($7^{\circ} 29' 00''$ S, $40^{\circ} 36' 00''$ W). A região apresenta clima Semi-árido mesotérmico, a vegetação predominante é caatinga hiperxerófila sobre Latossolo vermelho amarelo distrófico (Cavalcanti & Lopes, 1994).

Foram realizadas coletas de solo em quatro áreas da mineradora: (a) caatinga nativa preservada (AN): controle; (b) arredores da mina (AM); (c) rejeito (AR); (d) interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração (AI) (Figura 1), em dois períodos de amostragem: chuvoso (Dez/2003) com temperatura mensal entre $34,0^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,6^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,2% (Min.) e precipitação de 28,7 mm (Média); e seco (Set/2004) com temperatura mensal entre $33,2^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,3^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,4% (Min.) e precipitação de 1,3 mm (Média) (Fonte: IPA/Araripina-PE). Em cada área foram coletadas dez amostras de solo (5-20 cm de profundidade) preferencialmente na rizosfera de plantas, sendo os pontos definidos aleatoriamente. Em cada ponto de coleta de solo foi considerado um raio de 2 m, onde foram coletadas as espécies vegetais ocorrentes. Parte do solo foi encaminhada para análises físicas, químicas e de fertilidade do solo na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) (Tabela 1). O restante do solo foi usado para as demais análises. As espécies vegetais foram identificadas no Laboratório de Botânica do IPA.

Extração de esporos

Esporos de FMA foram extraídos do solo por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose a 50% (Jenkins, 1964), montados em lâminas com PVLG ou reagente de Melzer + PVLG (1:1) e observados ao microscópio. Para identificação

taxonômica foram consultados Schenck & Pérez (1990) e a home page <http://invam.caf.wvu.edu>.

Culturas armadilha

Foram preparadas culturas armadilha para FMA com o solo coletado, diluído em areia (2:1) em copos plásticos com capacidade para 500 mL, tendo como plantas hospedeiras no mesmo pote o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e o sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivar IPA-7301011. Foram mantidos três ciclos (de 3 meses) das culturas em casa de vegetação, sendo as plantas regadas em dias alternados.

Densidade Relativa (DR_i), Frequência Relativa (FR_i) e Frequência de Ocorrência (F_i)

Foi estimada a DR_i de cada espécie de FMA em cada época e no período total de amostragem, considerando o número de esporos de uma dada espécie em proporção ao número de esporos de todas as espécies naquele período, seguindo a equação: $DR_i = n_i / \sum n$ onde DR_i = densidade relativa das espécies i , n_i = número total de esporos da espécie i , em 50g de solo, $\sum n$ = soma do número dos esporos de todas as espécies em 50g de solo. A FR_i de cada espécie de FMA foi estimada para o período inteiro de amostragens, como a proporção da soma das frequências para todas as espécies, representada pela equação a seguir: $FR_i = f_i / \sum f$ onde FR_i = frequência de ocorrência relativa de uma dada espécie i , f_i = frequência de ocorrência de uma dada espécie i , $\sum f$ = soma das frequências de todas as espécies. A F_i de cada espécie foi calculada, em cada época de amostragem, pela determinação da porcentagem de amostras em que cada espécie foi isolada, em relação ao número total de amostras, representada pela fórmula: $F_i = J_i / k$ onde F_i = frequência de ocorrência da espécie i , J_i = número de amostras nos quais a espécie i ocorreu, k = número total de amostras de solo (Brower & Zar, 1984).

Índice de abundância e frequência

O índice de abundância e frequência (IAF) foi calculado para cada espécie de FMA pela soma da frequência relativa (FR_i) e a densidade relativa (DR_i) dos esporos para o período inteiro de amostragens (períodos chuvoso e seco). As espécies foram ordenadas em quatro categorias, com base na contribuição para a população total de esporos, segundo Koske et al. (1997):

- Nenhuma importância: $IAF = 0$
- Pouca importância: $0 < IAF \leq 10$
- Moderada importância: $10 < IAF \leq 30$
- Grande importância: $IAF > 30$

Coeficiente de similaridade

A similaridade vegetal e de FMA (após três ciclos de multiplicação em casa de vegetação) entre as áreas foi avaliada pelo Índice de Sørensen (Brower & Zar, 1984): $S = 2c/a + b \times 100$, onde c = número de espécies comuns às duas áreas (1 e 2); a = número de espécies na área 1; b = número de espécies na área 2.

Índices de diversidade e dominância das espécies de FMA

Os índices foram calculados para análise das comunidades, considerando cada amostra de solo, antes da instalação das culturas armadilhas (Hendrix *et al.* 1995). O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') foi obtido de acordo com a fórmula: $H' = - \sum (X_i/X_0) \cdot \log(X_i/X_0)$ onde X_i = densidade de esporos de cada espécie em 50g de solo e X_0 = densidade total de esporos de todas as espécies. O índice de dominância de Simpson (C) foi calculado pela fórmula: $C = \sum (X_i/X_0)^2$.

Análise estatística

Os índices de diversidade e dominância foram obtidos pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (Noether, 1983), considerando dez repetições por tratamento. As diferenças na densidade de esporos por espécie de FMA, entre as épocas de amostragem, nas áreas, foram analisadas usando o teste de Mann-Whitney.

Resultados

Nas áreas estudadas foram identificadas 42 espécies de plantas, pertencentes a 37 gêneros, distribuídos em 25 famílias, sendo registradas 27 espécies no período chuvoso e 29 no período seco (Tabela 2). Dessas, apenas 14 foram encontradas nos dois períodos. A diversidade vegetal nas áreas impactadas foi reduzida, com diferença na ordem de até 69% em comparação à caatinga nativa preservada. As espécies nativas *Zizyphus joazeiro*, *Croton* sp. e a exótica *Prosopis juliflora* aparentemente são tolerantes ao estresse causado pela mineração nas áreas mais afetadas, apresentando potencial para plantio em áreas degradadas. As famílias melhor representadas foram Leguminosae (Mimosoidae) e Euphorbiaceae, com seis e quatro espécies, respectivamente.

Para os FMA, 34 espécies foram identificadas e destas, 29 encontradas nos solos coletados no período chuvoso e 28 no período seco. Vinte e três espécies de FMA foram detectadas nos dois períodos de coleta (Tabela 3). O maior número de espécies (11) de FMA identificadas pertencem ao gênero *Glomus*, e representam 32% do total de espécies encontradas. *Acaulospora* e *Scutellospora* foram representadas por sete espécies cada, enquanto de *Gigaspora* foram coletadas duas espécies. Dos demais gêneros (*Archaeospora*, *Entrophospora* e *Paraglomus*) registraram-se apenas uma espécie.

Níveis mais elevados de P, Mg, Ca e pH foram observados nos arredores da mina e na área de rejeito, onde houve maior incidência de *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* e *Paraglomus occultum*, em ambos os períodos de amostragem. Esses dados refletem, de certo modo, a tolerância dessas espécies às condições edáficas da área impactada. De modo geral, quanto maior o índice de ocorrência de determinada espécie, maior sua amplitude de distribuição em relação às características do solo, ou seja, ocorrem em faixas mais amplas de pH, P, Ca e Mg no solo (Tabelas 1 e 3). A maioria das espécies de FMA foi encontrada na área preservada onde o pH estava mais próximo da neutralidade (6,28-6,43) e os níveis de P, Ca e Mg menores do que nas outras áreas. Número menor de espécies, entre as quais *Acaulospora mellea*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus etunicatum*, *G. intraradices*, *G. mosseae* e *P. occultum* parecem ser mais resistentes a valores mais elevados de pH e de vários elementos (P, Ca, Mg, SO₄), sendo encontradas em todas as áreas (nativa e degradada).

Dezesseis espécies de FMA foram registradas apenas na área nativa e outras 14 ocorreram tanto na área nativa quanto nas impactadas. *Acaulospora* sp., *Gigaspora gigantea*, *Glomus pallidum* e *Scutellospora biornata* foram encontrados apenas nas áreas sob impacto (Tabela 3). As espécies *Glomus ambisporum*, *Glomus coremioides*, *S. biornata*, *Scutellospora gregaria* e *Scutellospora scutata* foram encontradas apenas durante o período chuvoso, enquanto *Acaulospora longula*, *Gi. gigantea*, *G. pallidum*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora heterogama* foram observadas apenas no período seco (Tabela 4).

Este constitui o primeiro registro de *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *Entrophospora infrequens*, *Gi. gigantea*, *Gigaspora margarita*, *G. ambisporum*, *Glomus clavisporum*, *G. coremioides*, *G. etunicatum*, *Glomus glomerulatum*, *Glomus halonatum*, *G. intraradices*, *Glomus macrocarpum*, *G. mosseae*, *G. pallidum*, *Glomus sinuosum*, *P. occultum*, *S. biornata*

Scutellospora pellucida e *S. scutata* em áreas de caatinga nativa preservada e impactada por mineração de gesso no semi-árido.

Em geral as famílias de FMA foram melhor representadas na área nativa preservada, porém Glomeraceae teve maior densidade de esporos nas áreas de maior degradação (Fig. 2). Nos dois períodos de amostragem *Glomus* foi o gênero mais encontrado (39,29%) (Fig. 3).

Verificou-se grande número de esporos de *G. intraradices* (807 e 606 50g⁻¹ solo) e *P. occultum* (110 e 151 50g⁻¹ solo) nos arredores da mina, nos dois períodos, respectivamente. *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Glomus* sp.1 e *P. occultum* apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) no número de esporos em relação aos períodos de amostragem. Diferente de *P. occultum* que apresentou maior esporulação a partir de material coletado na estação seca, em todas as áreas, *G. intraradices* teve comportamento variado, em relação à área e época de coleta (Tabela 4). De modo geral, maior densidade de esporos foi registrada no período seco (3.805 em 50 g⁻¹ solo) em relação ao chuvoso (1.994 em 50 g⁻¹ solo).

Esporos de *A. scrobiculata* ocorreram em 17,5% das amostras em ambos os períodos, com maior densidade relativa (20,9%) no período chuvoso (Tabela 5). *Scutellospora auriglobosa* e *Glomus* sp.1 apresentaram maior densidade relativa no período chuvoso (11,1 e 29,5%) e maior frequência no período seco (10 e 20%), respectivamente. Durante o período seco as espécies *G. intraradices*, *G. mosseae* e *P. occultum* apresentaram maior densidade relativa de esporos e frequência de ocorrência quando comparadas com as demais. Esporos de *A. longula*, *S. calospora*, *S. heterogama* e *Gi. gigantea* foram observados apenas no período seco enquanto *S. biornata*, *S. gregaria* e *S. scutata* foram detectadas apenas no período chuvoso. Dez espécies apresentaram maior densidade relativa de esporos no período chuvoso, enquanto outras seis produziram mais esporos no período seco. De modo geral, maior densidade relativa de esporos foi registrada no período seco (Tabela 5).

A maioria das espécies de FMA, dentre os 29 táxons identificados, mostrou baixo ou nulo índice de abundância e frequência (IAF) e não estava presente em todas as áreas avaliadas. Nas áreas de interface e nos arredores da mina maior IAF foi registrado para *Glomus* sp.1, enquanto *G. intraradices* e *P. occultum* mostraram-se como as mais adaptadas na área de rejeito (Fig. 4).

Baixos índices de similaridade vegetal foram verificados entre a área nativa e as demais áreas, nos dois períodos de amostragem com maior semelhança registrada entre a vegetação nos arredores da mina e na área de interface (Tabela 6). Também com relação aos FMA, menores índices de similaridade foram registrados entre a área nativa (AN) e as afetadas pela mineração. Neste caso, foram os solos das áreas de rejeito e dos arredores da mina que apresentaram maior similaridade de espécies de FMA (Tabela 7).

Não houve diferença significativa no índice de diversidade de FMA entre os períodos seco e chuvoso nas quatro áreas estudadas. Por outro lado, considerando separadamente os períodos de coleta, a área nativa apresentou sempre maior diversidade que as áreas impactadas (Tabela 8).

Durante o período seco, o índice de dominância de espécies de FMA foi maior nas áreas impactadas quando comparado à área de caatinga nativa. Entretanto, o mesmo não ocorreu no período chuvoso. Do mesmo modo, não houve diferença significativa nesse índice entre os períodos de amostragem (Tabela 9).

Discussão

A diversidade vegetal nas áreas impactadas foi reduzida em relação à de caatinga nativa preservada. A área com rejeito tem a menor cobertura vegetal, o que é motivado pela quantidade de rejeito depositado sobre a superfície do solo, cobrindo a vegetação nativa. Silva

et al. (2005) observaram em área impactada por mineração de cobre, no semi-árido da Bahia, número reduzido de espécies vegetais, sobretudo nas localidades mais afetadas. *P. juliflora*, uma espécie exótica, ocorreu nas áreas impactadas pela mineração de gesso, embora não seja encontrada com facilidade em meio à caatinga nativa preservada. Dado semelhante foi registrado por Silva et al. (2005). Na ausência de plantas nativas, o uso das leguminosas exóticas, *Mimosa caesalpinifolia* Benth e *Leucaena leucocephala* Lam. podem constituir alternativas em programas de revegetação (Dias et al. 1995). No semi-árido, plantas das famílias Leguminosae (Mimosoidae) e Euphorbiaceae são comumente referidas (Correia, 1996; Silva et al. 2005).

Alguns táxons de *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Glomus* não foram identificados ao nível específico e provavelmente constituem espécies ainda não descritas. Vários autores têm registrado a ocorrência de espécies de *Glomus* em áreas impactadas (Yano-Melo et al. 2003 a; Silva et al. 2005; Caproni et al. 2003). A diversidade de espécies de FMA neste trabalho foi relativamente alta, porém são necessários mais estudos para permitir o registro inclusive daquelas espécies ainda não conhecidas para a ciência. Os diversos trabalhos sobre FMA (Souza et al. 2003; Yano-Melo, 2002; Maia & Gibertoni, 2002; Silva et al. 2001) no semi-árido brasileiro apontam para a presença de número considerável de espécies, que chega a mais de 80. Considerando o número total de espécies conhecidas, verifica-se que mesmo em região considerada pouco propícia ao crescimento desses fungos como altas temperaturas e baixa precipitação, algumas espécies de *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Glomus* e *Scutellospora* possuem ampla distribuição geográfica (Allen et al. 1995).

Intensa redução na população de FMA e de plantas causada pela mineração, em sequência de intenso revolvimento do solo foi observada no Canadá (Kabir et al. 1997).

Allen (1991) menciona que em áreas perturbadas pela extração mineral, os FMA e muitas espécies de plantas que dependem da micorrização para sobrevivência e estabelecimento foram reduzidos ou totalmente eliminados. A maioria das pesquisas tem demonstrado que a adaptação do fungo ao tipo de solo e às condições edafoclimáticas é mais determinante do que a “especificidade” entre fungo e a espécie vegetal (Sieverding, 1991).

O pH das áreas mais impactadas aumentou devido aos altos depósitos de rejeito (gipsita), dificultando o estabelecimento de espécies de FMA nativas da caatinga que normalmente ocorrem em pH mais baixo (≈ 6). Algumas espécies no entanto suportam pH mais elevados, como observado em relação a *Glomus* sp. e *P. occultum*, que ocorreram em áreas com pH em torno de 7,0 (Silva et al. 2005). Em área de caatinga nativa, a maioria das espécies de Acaulosporaceae e Glomeraceae foi registrada em solos com baixo pH ($\approx 5,8$) (Souza et al. 2003). Tem sido mencionado que a presença de espécies de *Glomus* é mais comum em solos com pH neutro a alcalino (Schenck & Siqueira, 1987; Zambolim & Siqueira, 1985).

Nas áreas estudadas foi observada maior incidência de *G. intraradices*, *G. mosseae* e *P. occultum*. Maia & Trufem (1990) referiram a presença constante de *G. mosseae* em coletas na área de Araripina, PE, mesmo Município onde se localiza a mineradora. Marinho et al. (2004) registraram a presença de *G. intraradices* e *P. occultum* em áreas de mineração de bauxita e em floresta primária na Amazônia.

A maioria das espécies de FMA esteve representada nos dois períodos de coleta, sendo que *A. scrobiculata*, *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Glomus* sp.1 e *P. occultum* destacaram-se por apresentar maior densidade relativa de esporos, em relação às demais espécies. Caproni et al. (2005) mencionaram maior densidade relativa de esporos durante o período seco, em área

de mineração de bauxita revegetada. A influência da estação do ano sobre a esporulação dos FMA tem sido mencionada por outros autores (Mehrotra, 1998).

Os FMA com baixo índice de abundância e frequência (IAF) em geral tem maior dificuldade de adaptação em áreas de mineração, o que indica que o ambiente estudado apresenta fatores limitantes à expressão da capacidade gênica destes fungos em se estabelecer (Marinho et al. 2004). Por outro lado, aqueles com IAF médio e grande (*A. scrobiculata*, *Gigaspora* sp.1, *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Glomus* sp.1, *P. occultum* e *S. auriglobosa*) mostram-se mais adaptados às condições do local estudado. Trabalhando em áreas degradadas por mineração, Marinho et al. (2004) registraram elevado IAF para *Glomus claroideum* e *G. macrocarpum*, o que sugere que essas espécies podem ser testadas para o uso como inóculo em áreas degradadas, pois se estabelecem bem em ambientes fortemente impactados.

Maior similaridade vegetal observada nas áreas impactadas pode estar relacionada à presença de plantas nativas invasoras tal como observado, sobretudo, nas áreas de margem (AM) e de interface entre o rejeito e a caatinga degradada (AI). Para os FMA, maior similaridade foi verificada entre as áreas AM e AR, devido provavelmente à contaminação pelo solo degradado, pois o solo da área dos arredores da mina foi depositado na área de rejeito. Isso resultou em pequeno número de espécies estabelecidas. O efeito negativo da atividade mineradora sobre as plantas e os FMA é conhecido (Silva et al. 2005, 2001; Melloni et al. 2003; Mehrotra, 1998; Souza & Silva, 1996) e foi confirmado pelos baixos índices de similaridade da vegetação e de fungos micorrízicos entre a área de caatinga nativa preservada e as demais.

Maior diversidade de FMA foi observada na caatinga nativa onde houve diferença entre os períodos de amostragem (chuvoso e seco). Nessa área onde os FMA estão bem representados em termos de abundância, havia mais plantas e, conseqüentemente, maior

disponibilidade de raízes, com o solo apresentando condições mais propícias para estabelecimento de diversas espécies de FMA. Segundo Scheublin et al. (2004) a amostragem da área e o número de espécies de plantas influenciam os valores de diversidade de FMA. Caproni et al. (2003) registraram índices de diversidade variando entre 0,2 a 0,8 em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, PA. Por outro lado, Beena et al. (2000) observaram maior diversidade de FMA em dunas moderadamente degradadas (2,18), enquanto em dunas severamente degradadas esse valor não ultrapassou 0,86. A análise da ocorrência mundial da comunidade de FMA sugere que esses microrganismos podem exibir diferentes padrões de distribuição, resultando em alta variabilidade de riqueza e de composição de espécies entre ecossistemas (Öpik et al. 2006).

Na área nativa, a dominância de espécies de FMA foi inferior a das áreas impactadas, sugerindo aumento na equitabilidade entre as espécies em áreas sob impacto ambiental. Comparando-se o índice de diversidade de espécies de Shannon-Wiener com o de dominância de espécies de Simpson observa-se que, onde a diversidade das espécies foi alta, a dominância foi baixa. Resultado semelhante a esse foi verificado por Caproni et al (2003) em áreas revegetadas após mineração de bauxita. As principais espécies responsáveis por esse efeito nas áreas de mineração de gesso foram *G. intraradices* e *P. occultum*, que apresentaram alta esporulação, indicando alta competitividade nas áreas impactadas. Em área de mata ciliar revegetada (*Croton urucurana*, *Inga striata* e *Genipa americana*) no estado de São Paulo, o índice de dominância (0,17) foi considerado elevado (Carrenho et al. 2001). Por outro lado, Caproni et al. (2003) registraram índice de dominância (0,6) em áreas revegetadas após mineração de bauxita, similar ao encontrado nas áreas afetadas pela mineração de gesso e inferior ao registrado na área de caatinga nativa preservada.

Em resumo, o impacto produzido pela mineração de gesso reduz a comunidade de FMA nas áreas afetadas. Esses fungos não apresentam o mesmo padrão de esporulação na área nativa e nas impactadas, inclusive com variação sazonal. *G. intraradices* e *P. occultum* demonstraram maior capacidade para tolerar as condições edáficas em áreas fortemente impactadas e devem ser testados quanto ao potencial para uso em programas de revegetação nas áreas afetadas por mineração de gesso.

Referências bibliográficas

- Albuquerque UP, Silva VA, Andrade LHC (2002) Uso e conservação da diversidade de florestas secas e úmidas de Pernambuco. In: Tabarelli M, Silva JMC (org.) Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. vol. 2. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco. Editora Massangana, pp. 675-687
- Allen MF (1991) The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge
- Allen EB, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. Plant and Soil 170: 47-62
- Beena KR, Raviraja NS, Arun AB, Sridhar KR (2000) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. Current Science 79: 1459-1466
- Brower JE, Zar JH (1984) Community similarity. In: Brower JE, Zar JH (ed) Field & Laboratory Methods for General Ecology. Win C. Brown Publishers. Dubuque, 226p.
- Caproni AL, Franco AA, Berbara RLL, Trufem SB, Granha JRDO, Monteiro AB (2003) Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38: 1409-1418
- Caproni AL, Franco AA, Berbara RLL, Granha JRDO, Marinho NF (2005) Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. Revista Árvore 29 373-381
- Carrenho R, Trufem SFB, Bononi VL (2001) Fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de três espécies de fitobiontes instaladas em área de mata ciliar revegetada. Acta Botanica Brasilica 15: 115-124
- Cavalcanti AC, Lopes OF (1994) Condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe e viabilidade de produção sustentável de culturas. Brasília: EMBRAPA - SPI, 42p.

- Correia MS (1996) Estrutura da vegetação da mata serrana em um brejo de altitude em Pesqueira-PE. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife
- Dias LE, Franco AA, Campello E, Faria SM, Silva EM (1995) Leguminosas florestais: aspectos relacionados com su nutrición y uso em la recuperación de suelos degradados. Bosque 16:121-127
- Farias MMC (1994) Efeito de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e da adição de fósforo sobre o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.), cultivado em solos com diferentes sistemas de manejo (Serra Talhada-PE). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife
- Ferreira CAG (2000) Recuperação de áreas degradadas. Informe Agropecuário. 21:127-130
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spore of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46:235-244
- Gugel IHFP (2004) Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a antracnose. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife
- Goto BT, Maia, LC (2005) Sporocarpic species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), with a new report from Brazil. Acta Botanica Brasilica 19: 633-637
- Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou 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
- Hendrix W, Guo BZ, An ZQ (1995) Divergence of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. Plant and Soil 170: 131-140
- Jasper DA (1994) Management of mycorrhizas in revegetation. In: Robson AD, Abbott LK, Malajczuk N (ed). Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Boston: Kluwer Academic, p.211-219
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 692p.
- Kabir Z, O'halloran IP, Fyles JW, Hamel C (1997) Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: hyphal density and mycorrhizal root colonization. Plant and Soil 192: 285-293

- Koske RE, Gemma JN, Jackson N (1997) Mycorrhizal fungi associated with three species of turfgrass. *Canadian Journal of Botany* 75: 320-332
- Maia LC, Yano-Melo AM, Cavalcanti MA (2002) Diversidade de fungos no Estado de Pernambuco. In: Tabarelli M, Silva JMC (org). *Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco*. vol. 1. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco. Editora Massangana, p.15-50
- Maia LC, Gibertoni TB (2002) Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: Sampaio EVSB, Goulietti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL (eds). *Vegetação e Flora da Caatinga*. Associação Plantas do Nordeste e Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Recife, p.163-176
- Maia LC, Trufem SFB (1990) Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 89-95
- Marinho NF, Caproni AL, Franco AA, Berbara RLL (2004) Respostas de *Acacia mangium* Willd e *Sclerolobium paniculatum* Vogel a fungos micorrízicos arbusculares nativos provenientes de áreas degradadas pela mineração de bauxita na Amazônia. *Acta Botanica Brasilica* 18: 141-149
- Marx DH (2000) Stabilizing ecosystems with VAM fungi: significance of VAM fungi in natural plant succession on disturbed arid and semi-arid lands. *PlantHealthCare.com* online magazine, Fevereiro.
- Mehrotra VS (1998) Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in Índia. *Journal of Agricultural Science* 130: 125-133
- Melo AMM (2004) Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em fragmentos de Mata Atlântica, Complexo Catende. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Melloni R, Siqueira JO, Moreira FMS (2003) Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 267-276
- Mendes-Filho PF (2004) Potencial de reabilitação do solo de uma área degradada, através da revegetação e do manejo microbiano. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba
- Mergulhão ACES, Goto BT, Maia LC, Burity HA, Ribeiro JRA, Pereira RCA (2004) Estudos preliminares da ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares e vegetais em áreas de

- caatinga nativa e degradada por mineração de gipsita, na região de Araripina, Pernambuco. In: FERTBIO (XXVI Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, X Reunião brasileira sobre micorrizas, VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia do solo, V Reunião brasileira de biologia do solo), Lages - SC
- Noether GE (1983) Casualidade, independência e correlação de postos. In: Noether GE (ed) Introdução à estatística: Uma Abordagem não Paramétrica, Rio de Janeiro: Guanabara Dois. p.168-171
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790
- Ramos-Zapata J, Guadarrama P (2004) Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales. *Universidad y Ciencia*, número especial I: 59-65
- Rao AV, Tarafdar JC (1998) Significance of micro-organisms in afforestation programmes in arid zone. *Annals of Arid Zone* 37: 337-346
- Sampaio EVSB, Araújo MS (2005) Desertificação no nordeste semi-árido. In: Nogueira RJMC, Araújo EL, Willadino LG, Cavalcante UMT (eds) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE. Imprensa Universitária, pp. 490-499
- Schenck NC, Siqueira JO (1987) Ecology of VA mycorrhizal fungi in temperate agroecosystems. In: Sylvia DM, Hung LL, Graham JH (eds.) *Mycorrhizae in the next decade*. Seventh North American Conference on Mycorrhizae, Gainesville, Fla., p.2-4
- Schenck NC, Pérez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3 ed. Synergistic Publ., Gainesville.
- Scheublin TR, Ridgway KP, Young PW, Van der Heijden MGA (2004) Nonlegumes, Legumes, and Root Nodules Harbor Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6240-6246
- Sieverding E (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation. Eschborn: Federal Republic of Germany, 317p.
- Silva GA, Maia LC, Silva FSB, Lima PCF (2001) Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundas de áreas de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira Botanica* 24: 135-143
- Silva AG, Trufem SFB, Saggin-Júnior OJ, Maia LC (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza* 15: 47-53
- Siqueira JO, Soares CRFS (2005) Micorrizas na reabilitação de solos degradados. In: XXX Congresso Brasileiro Ciência do Solo, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Recife.

- Souza CMT (1994) Influência de fungos micorrízicos arbusculares e da adição de fósforo no desenvolvimento do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) cultivado em solos nativos ou queimados do município de Araripina-PE. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Souza FA, Silva EMR (1996) Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: Siqueira JO (ed). Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. UFLA/DCS e DCF, Lavras, p.255-290
- Souza RG, Trufem SFB, Sales MF, Maia LC (2003) Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga, na região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira Botanica* 26: 49-60
- Weber OB, Oliveira E (1994) Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em citros nos Estados da Bahia e Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29: 1905-1914
- Weber OB, Souza CCM, Gondin DMF, Oliveira FNS, Crisóstomo LA, Caproni AL, Saggin JR OJ (2004) Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 477-483
- Yano-Melo AM, Maia LC, Morgado LB (1997a) Fungos micorrízicos arbusculares em bananeiras cultivadas no Vale do Submédio São Francisco. *Acta Botanica Brasilica* 11: 115-121
- Yano-Melo AM, Saggin JR OJ, Maia LC (1997b) Levantamento de fungos micorrízicos arbusculares ocorrentes na rizosfera de espécies de *Prosopis* e *Acacia*. *Pesquisa em Andamento*. (Embrapa Semi-Árido), p.1-3
- Yano-Melo AM (2002) Biologia de fungos micorrízicos arbusculares em solos salinizados. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Yano-Melo AM, Trufem SFB, Maia LC (2003a) Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brasil. *Hoehnea* 30: 79-87
- Yano-Melo AM, Goto BT, Silva GA, Maia LC (2003b) Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares no Brasil. In: Jardim MAG, Bastos MNC, Santos JUM (eds). *Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal*. 54º Congresso Nacional de Botânica e 3ª Reunião Amazônica de Botânica. Belém: MPEG, UFRA, EMBRAPA. p.173-174
- Zambolim L, Siqueira JO (1985) Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 36p. (Série documentos, 26)

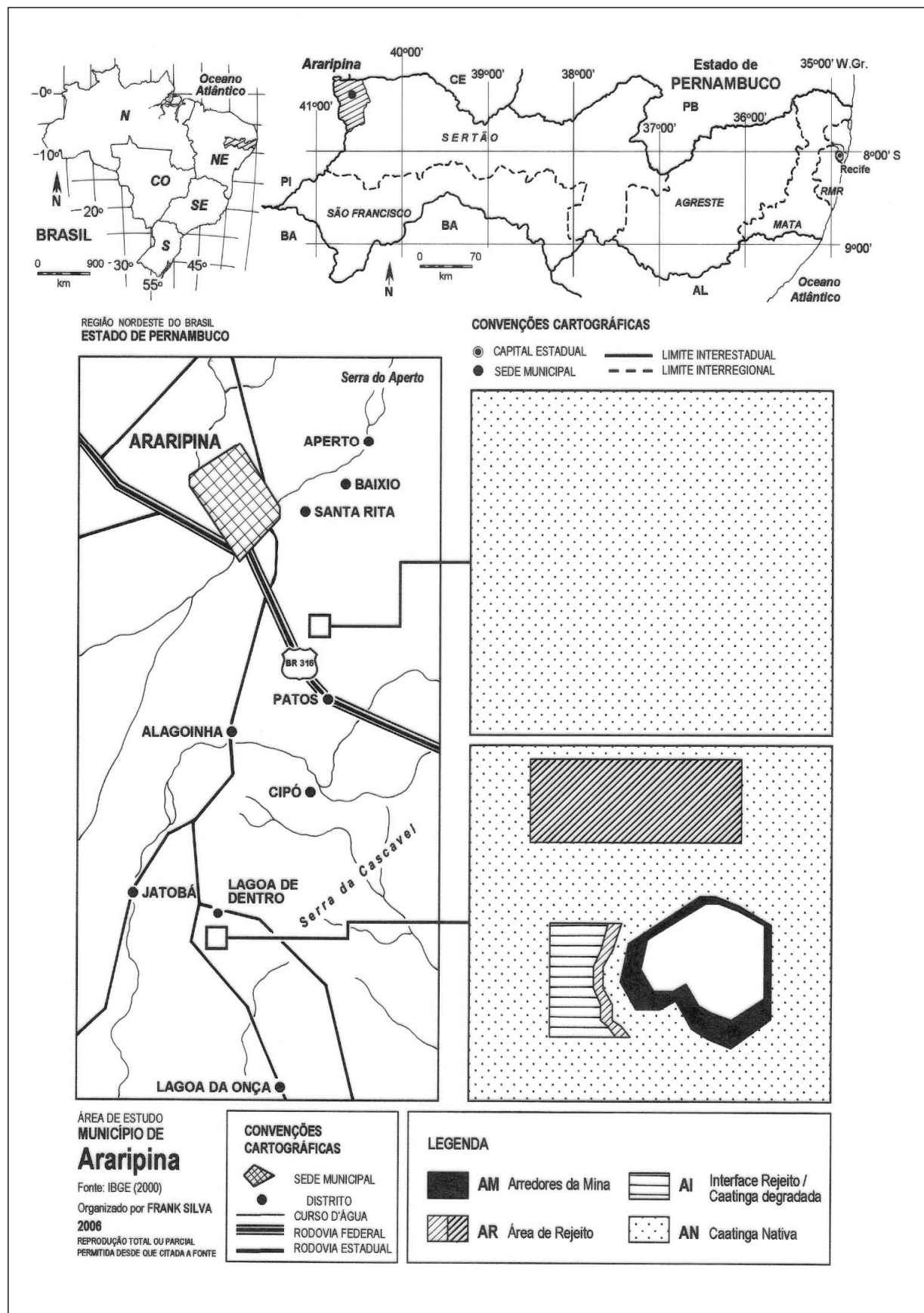


Fig. 1 Mapa do Estado de Pernambuco destacando o Município de Araripina onde foram realizadas as coletas de solos e de plantas: (AN) = caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 1 Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro áreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE

Áreas ¹	pH	P	C	Ca	Mg	K	SO ₄	CO ₃	HCO ₃	Análise Textural (%)			MO	Fe	Dap	Dr	UR	PMP	
	H ₂ O	mg.dm ⁻³	g.Kg ⁻¹	-----	cmolc.dm ⁻³	-----	-----	meq.L ⁻¹	-----				(%)	mg/dm ³	---	g/cm ³ ---	(%)	15	Classe textural
Período Chuvoso																			
AN	6,28	5	1,16	5,90	1,30	0,43	Presença	0,20	1,80	67	8	25	2,00	12,73	1,44	2,50	1,25	4,47	Franco arenoso
AI	5,72	11	1,27	20,00	9,30	0,46	Presença	0,20	0,80	26	45	29	2,19	52,50	1,21	2,55	6,90	20,51	Argiloso
AM	7,64	54	1,34	40,50	6,25	0,19	Forte Presença	0,40	1,60	22	39	39	2,31	0,93	1,20	2,31	8,65	24,88	Franco argiloso
AR	7,65	42	0,72	68,00	9,75	0,34	Forte Presença	0,20	1,20	27	6	67	1,24	0,41	1,28	2,58	7,00	18,14	Franco siltoso
Período Seco																			
AN	6,43	8	1,20	6,20	1,15	0,36	Presença	0,80	5,60	74	8	18	2,07	13,73	1,34	2,59	0,40	4,67	Franco arenoso
AI	5,72	14	1,30	36,25	11,25	0,62	Forte Presença	0,00	0,80	14	59	27	2,24	79,80	1,13	2,44	8,60	30,65	Argiloso
AM	7,52	161	1,33	45,40	3,10	0,40	Forte Presença	0,00	1,60	22	47	31	2,29	0,71	1,10	2,36	6,80	26,93	Franco argiloso
AR	7,56	32	0,65	61,75	1,65	0,46	Forte Presença	0,20	2,40	37	28	35	1,12	0,23	1,22	2,46	6,55	8,29	Franco siltoso

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 2 Espécies de plantas em área com mineração de gipsita, em Araripina, Pernambuco, registradas em dois períodos de amostragem (chuvoso e seco)

Família/Espécie	Período Chuvoso				Período Seco			
	Áreas ¹				Áreas			
	AN	AM	AR	AI	AN	AM	AR	AI
Acanthaceae								
<i>Ruellia paniculata</i> L.						X	X	
<i>Dicliptera</i> sp.					X			
Amaranthaceae								
<i>Alternanthera tenella</i> Colla						X	X	
Anacardiaceae								
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Alemão	X				X			
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	X				X			
Annonaceae								
<i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fries	X				X			
Apocynaceae								
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	X							X
Asteraceae								
<i>Tagetes minuta</i> L.						X	X	
Bignoniaceae								
<i>Arrabidaea corallina</i> (Jacq.) Sandw.		X						
Boraginaceae								
<i>Heliotropium procumbens</i> Mill.								X
Bromeliaceae								
<i>Tillandsia loliacea</i> Mart. ex Schult. f.					X			
Burseraceae								
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) Gillet.	X				X			
Cactaceae								
<i>Pilosocereus</i> sp.				X				X
Caricaceae								
<i>Jacaratia</i> sp.	X				X			
Capparaceae								
<i>Caparis hastata</i> L.	X							
<i>Caparis flexuosa</i> (L.) L.	X					X		
Convolvulaceae								
<i>Ipomoea</i> sp.	X				X			
<i>Ipomoea phyllomega</i> (Vell.) House					X			
<i>Merremia</i> sp.						X		
Euphorbiaceae								
<i>Croton sonderianus</i> Mull. Arg.	X				X			
<i>Croton</i> sp.	X			X	X	X		X
<i>Manihot</i> sp.				X				
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl.) Baill.		X						
Leguminosae Caesalpinoideae								
<i>Bauhinia cheilantha</i> Steud.	X							
<i>Cassia trachypus</i> Mart ex Benth.		X						
Leguminosae Mimosoidae								
<i>Parapiptadenia zehntneri</i> (Harms) M.P.	X							

Continuação da Tabela 2

Família/Espécie	Período Chuvoso				Período Seco			
	Áreas ¹				Áreas			
	AN	AM	AR	AI	AN	AM	AR	AI
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	X							
<i>Mimosa ophthalmocentra</i> Mart. Benth.	X	X						
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.	X			X				
<i>Prosopis juliflora</i> DC.		X	X	X		X	X	X
<i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd.						X		
Leguminosae Papilionoideae								
<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.								X
<i>Canavalia</i> sp.					X			
Malphigiaceae								
<i>Banisteria crotonifolia</i> A. Juss.					X			
Malvaceae								
<i>Sida</i> sp.						X		
<i>Sida cordifolia</i> L.			X				X	
<i>Sidastrum micranthum</i> (A. St. -Hill.)								X
Nyctaginaceae								
<i>Guapira noxia</i> (Netto) Sundell.	X							
Rhamnaceae								
<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.		X		X		X		
Sapindaceae								
<i>Allophylus quercifolius</i> (Mart.) Radlk.	X							
Selaginellaceae								
<i>Sellaginella convoluta</i> Spring.					X			
Vitaceae								
<i>Cissus simsiana</i> Schult & Schult	X							
Total	19	6	2	6	14	10	5	7

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 3 Espécies de FMA em áreas de mineração de gipsita no sertão de Araripina, Pernambuco, coletadas em dois períodos de amostragem (chuvoso e seco)

Espécies de FMA	Período Chuvoso				Presença/área	Período Seco				Presença/área
	Áreas ¹					Áreas				
	AN	AM	AR	AI		AN	AM	AR	AI	
<i>Acaulospora excavata</i> Ingleby & Walker	X				1	X				1
<i>A. foveata</i> Trappe & Janos	X				1	X				1
<i>A. longula</i> Spain & Schenck						X				1
<i>A. mellea</i> Spain & Schenck				X	1	X	X	X	X	4
<i>A. rehmsii</i> Sieverding & Toro	X				1	X				1
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	X	X		X	3	X	X		X	3
<i>Acaulospora</i> sp.				X	1					1
<i>A. tuberculata</i> Janos & Trappe	X				1	X				1
<i>Archaeospora leptoticha</i> Morton &	X				1	X				1
<i>Entrophospora infrequens</i> Ames &		X			1	X	X			2
<i>Gigaspora gigantea</i> Nicol & Gerd										1
<i>G. margarita</i> Becker & Hall	X				1	X		X		2
<i>Gigaspora</i> sp.	X			X	2					1
<i>Glomus ambisporum</i> Smith & Schenck	X				1					
<i>G. clavisporum</i> Almeida & Schenck	X				1	X				1
<i>G. coremioides</i> Redecker & Morton	X				1					
<i>G. etunicatum</i> Becker & Gerd			X		1	X	X	X	X	4
<i>G. glomerulatum</i> Sieverding	X				1					
<i>G. halonatum</i> Rose & Trappe	X				1	X				1
<i>G. intraradices</i> Schenck & Smith	X	X	X	X	4	X	X	X	X	4
<i>G. macrocarpum</i> Tulasne	X				1					1
<i>G. mosseae</i> Nicol & Gerd	X	X	X	X	4	X	X	X	X	4
<i>G. pallidum</i> Hall								X		1
<i>G. sinuosum</i> Almeida & Schenck	X				1	X	X			2

Continuação da Tabela 3

Espécies de FMA	Período Chuvoso					Período Seco					
	Áreas					Presença/área	Áreas				Presença/área
	AN	AIR	AM	AR	AI		AN	AM	AR	AI	
<i>Glomus</i> spp.	X	X	X	X		4	X	X	X	X	4
<i>Paraglomus occultum</i> Morton & Redecker	X	X	X	X		4	X	X	X	X	4
<i>Scutellospora aurigloba</i> Hall	X					1	X				1
<i>S. biornata</i> Spain, Sieverding & Toro					X	1					
<i>S. calospora</i> Nicol & Gerd							X				1
<i>S. gregaria</i> Schenck & Nicol	X					1					
<i>S. heterogama</i> Nicol & Gerd							X				1
<i>S. pellucida</i> Nicol & Schenck	X					1				X	1
<i>S. scutata</i> Walker & Dieder	X					1					
<i>Scutellospora</i> sp.	X					1	X			X	2
Total de espécies	24	6	5	9			22	9	8	13	

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 4 Densidade de esporos (50 g^{-1} solo) por espécie de FMA nas amostras de solo coletadas no período chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004) em áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, após três ciclos de multiplicação, em casa de vegetação

FMA	AN		AI		AM		AR	
	Dez/2003	Set/2004	Dez/2003	Set/2004	Dez/2003	Set/2004	Dez/2003	Set/2004
.....Nº de esporos em 50 g^{-1} solo								
Acaulosporaceae								
<i>Acaulospora</i> sp.	-	-	2	4	-	-	-	-
<i>A. excavata</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>A. foveata</i>	2	2	-	-	-	-	-	-
<i>A. longula</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>A. mellea</i>	-	1	2	1	-	1	-	1
<i>A. rehmsii</i>	1	4	-	-	-	-	-	-
<i>A. scrobiculata</i>	49	60	1	1	2	1	-	-
<i>A. tuberculata</i>	2	3	-	-	-	-	-	-
<i>Entrophospora</i>	-	1	-	-	1	1	-	-
Archaeosporaceae								
<i>Archaeospora leptoticha</i>	4	1	-	-	-	-	-	-
Gigasporaceae								
<i>Gigaspora gigantea</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>G. margarita</i>	3	1	-	-	-	-	-	1
<i>Gigaspora</i> sp.	1	-	3	2	-	-	-	-
<i>Scutellospora aurigloba</i>	33	6	-	-	-	-	-	-
<i>S. biornata</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>S. calospora</i>	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>S. gregaria</i>	15	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. heterogama</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>S. pellucida</i>	2	-	-	2	-	-	-	-
<i>S. scutata</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scutellospora</i> sp.	8	2	-	2	-	-	-	-
Glomeraceae								
<i>Glomus ambisporum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. clavosporum</i>	5	2	-	-	-	-	-	-
<i>G. coremioides</i>	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. etunicatum</i>	-	1	-	7	-	37	10	44
<i>G. glomerulatum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>G. halonatum</i>	1	4	-	-	-	-	-	-
<i>G. intraradices</i>	20*	4	35	157*	807	606	584	1126
<i>G. macrocarpum</i>	3	-	-	2	-	-	-	-
<i>G. mosseae</i>	2	1	7	129*	5	20	10	20
<i>G. pallidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>G. sinuosum</i>	1	2	1	-	-	3	-	-
<i>Glomus</i> sp.1	43	5	26*	4	18	71	2	18*
<i>Glomus</i> sp.2	20	84	-	5	-	4	1	4
<i>Glomus</i> sp.3	-	18	-	-	2	5	-	-
Paraglomeraceae								
<i>Paraglomus occultum</i>	12	459*	101	432*	110	151*	27	271*
Nº esporos por período	236	670	179	749	945	900	634	1.486

[†](AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Mann-Whitney entre os dois períodos de amostragem, em cada área.

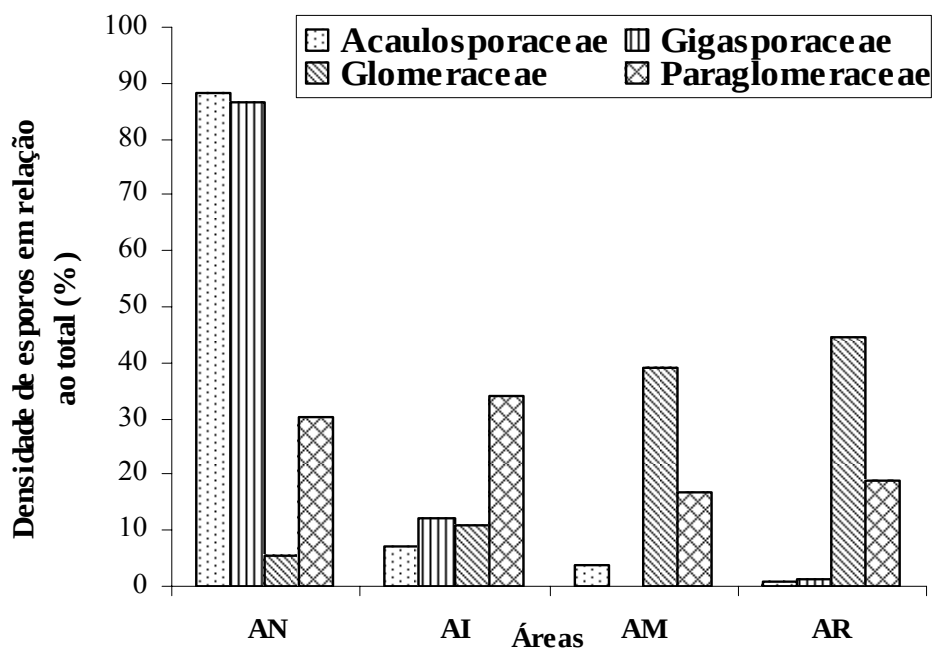


Fig. 2 Densidade de esporos de FMA por família, nas amostras de solo coletadas nos dois períodos de amostragem. (AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

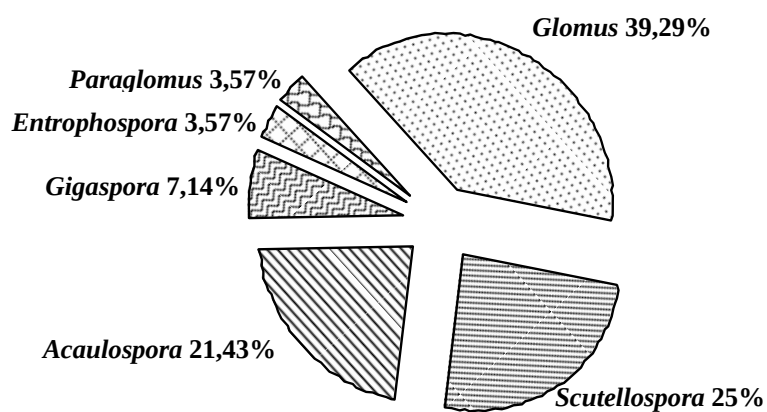


Fig. 3 Representatividade de cada gênero de FMA em relação ao número de espécies registradas nas áreas estudadas em Araripina-PE, nos dois períodos de coleta (chuvoso e seco).

Tabela 5 Densidade relativa de esporos (DRi) e frequência de ocorrência (F) das espécies de FMA nos períodos de amostragem chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004), em áreas nativa e impactadas por mineração de gipsita, Araripina-PE

Espécies de FMA	DRi		F	
	Período chuvoso	Período seco	Período chuvoso	Período seco
	----- % -----			
Archaeosporaceae				
<i>Archaeospora leptoticha</i>	1,3	0,3	2,5	2,5
Acaulosporaceae				
<i>Acaulospora excavata</i>	0,4	0,3	2,5	2,5
<i>A. foveata</i>	0,9	-	2,5	-
<i>A. longula</i>	-	0,6	-	2,5
<i>A. mellea</i>	-	0,3	-	2,5
<i>A. rehmi</i>	-	0,6	-	5,0
<i>A. scrobiculata</i>	20,9	4,2	17,5	17,5
<i>Acaulospora</i> sp.1	-	0,6	-	2,5
<i>A. tuberculata</i>	0,9	0,3	2,5	2,5
<i>Entrophospora infrequens</i>	0,4	0,6	2,5	5,0
Gigasporaceae				
<i>Gigaspora gigantea</i>	-	0,3	-	2,5
<i>G. margarita</i>	1,3	-	5,0	-
<i>Gigaspora</i> sp.1	1,7	0,6	5,0	2,5
<i>Scutellospora auriglobosa</i>	11,1	1,8	7,5	10,0
<i>S. biornata</i>	0,4	-	2,5	-
<i>S. calospora</i>	-	0,9	-	5,0
<i>S. gregaria</i>	6,4	-	2,5	-
<i>S. heterogama</i>	-	0,6	-	2,5
<i>S. scutata</i>	0,9	-	2,5	-
<i>S. pellucida</i>	0,9	0,3	2,5	2,5
<i>Scutellospora</i> sp.1	0,9	-	5,0	-
Glomeraceae				
<i>Glomus ambisporum</i>	0,4	-	2,5	-
<i>G. clavisporum</i>	-	0,3	-	2,5
<i>G. etunicatum</i>	-	0,3	-	2,5
<i>G. halonatum</i>	0,4	1,2	2,5	5,0
<i>Gl. intraradices</i>	2,6	33,5	7,5	22,5
<i>G. macrocarpum</i>	-	0,6	-	2,5
<i>G. mosseae</i>	5,9	6,3	15,0	25,0
<i>G. sinuosum</i>	0,4	0,3	2,5	2,5
<i>Glomus</i> sp.1	29,5	16,3	15,0	20,0
<i>Glomus</i> sp.2	3,0	2,4	2,5	2,5
<i>Glomus</i> sp.3	0,9	1,2	2,5	2,5
Paraglomeraceae				
<i>Paraglomus occultum</i>	8,5	26,6	10,0	17,5

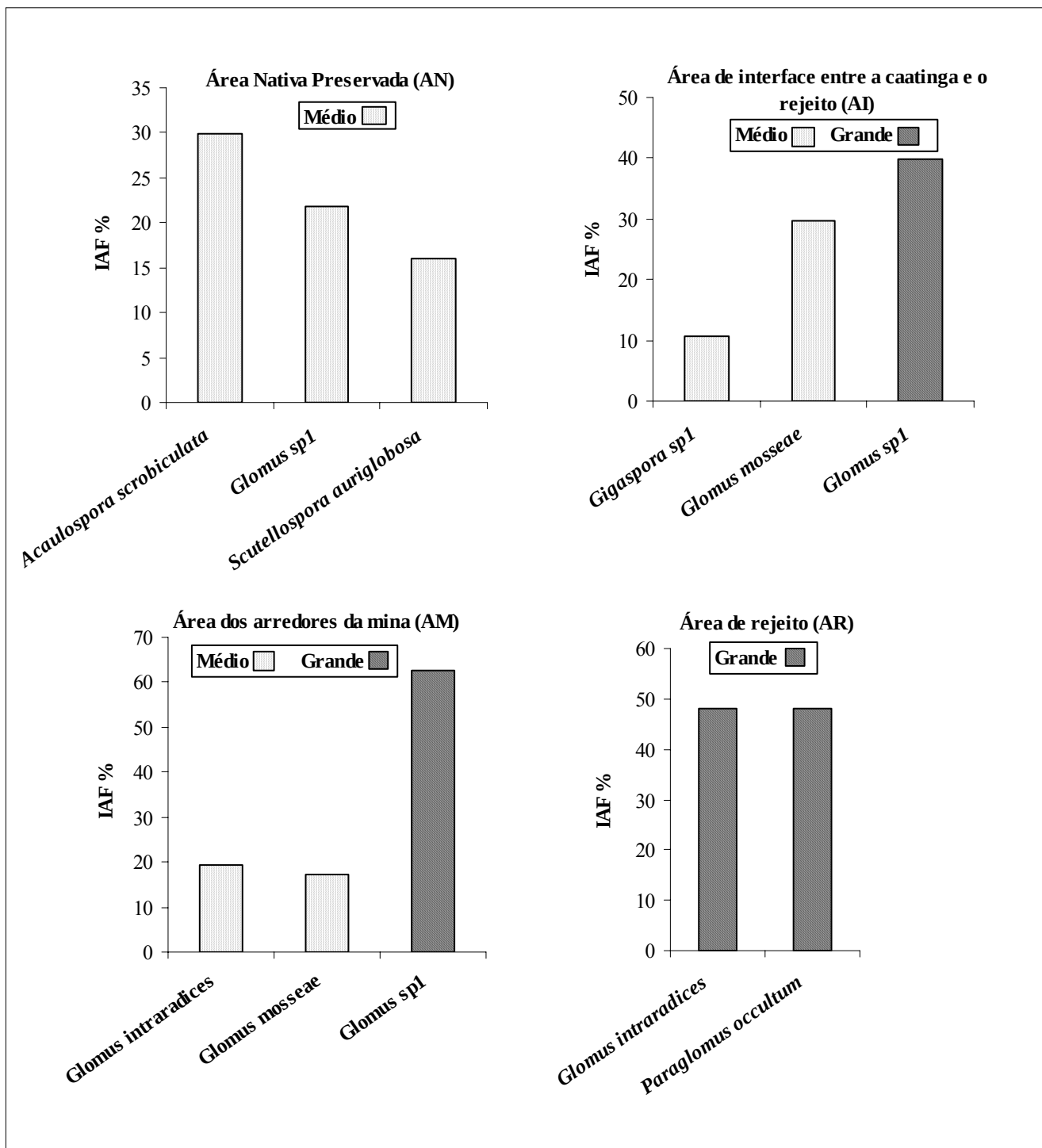


Fig. 4 Índice de abundância e frequência (IAF) de espécies de FMA, com valores de importância entre médio e grande de áreas nativa preservada e impactadas por mineração de gipsita em Araripina, PE. (AN) = área de caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito.

Tabela 6 Percentual de similaridade (Sörensen) vegetal entre as áreas estudadas, em cada período de amostragem (chuvoso e seco)

Áreas ¹	Período Chuvoso			
	AN	AI	AM	AR
AN	100	16	8	0
AI		100	33	25
AM			100	25
AR				100

Áreas ¹	Período Seco			
	AN	AI	AM	AR
AN	100	10	8	0
AI		100	24	17
AM			100	13
AR				100

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = Arredores da mina; (AR) = rejeito.

Tabela 7 Percentual de similaridade (Sörensen) de FMA entre as áreas estudadas, em cada período de amostragem (chuvoso e seco)

Áreas ¹	Período Chuvoso			
	AN	AI	AM	AR
AN	100	36	33	28
AI		100	67	57
AM			100	91
AR				100

Áreas ¹	Período Seco			
	AN	AI	AM	AR
AN	100	46	58	47
AI		100	64	57
AM			100	71
AR				100

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = Arredores da mina; (AR) = rejeito.

Tabela 8 Índice de diversidade (Shannon-Wiener H') de espécies de FMA em áreas de caatinga preservada e impactadas por mineração de gipsita, Araripina/PE, em dois períodos de amostragem

Áreas [*]	Períodos de amostragem	
	Chuvoso ¹	Seco ¹
AN	1,14 aA	1,41 aA
AI	0,64 bA	0,58 bA
AM	0,51 bA	0,52 bA
AR	0,58 bA	0,55 bA

¹Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). Valores seguidos da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05). *(AN) = Caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = Arredores da mina; (AR) = rejeito.

Tabela 9 Índice de dominância (Simpson C) de espécies de FMA em áreas de caatinga preservada e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, em dois períodos de amostragem

Áreas*	Períodos de amostragem	
	Chuvoso ¹	Seco ¹
AN	0,43 aA	0,30 bA
AI	0,60 aA	0,60 aA
AM	0,67 aA	0,68 aA
AR	0,69 aA	0,61 aA

¹Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Valores seguidos da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). *(AN) = Caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = Arredores da mina; (AR) = rejeito.

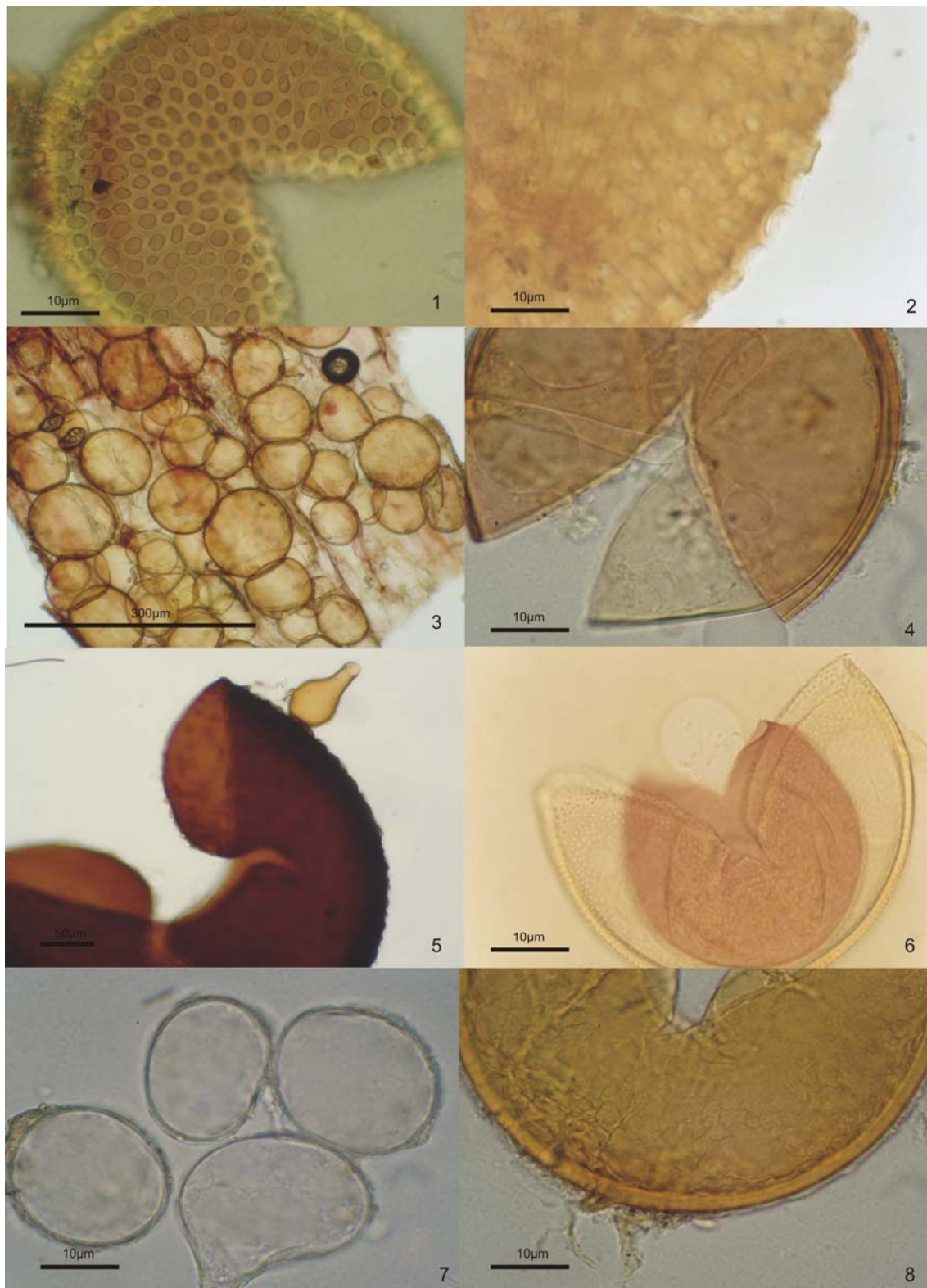


Fig. 5 Fotomicrografias de espécies de FMA presentes em área nativa e impactada pela mineração de gesso em Araripina, PE: 1) *Acaulospora excavata*: aspecto geral do esporo; 2) *Acaulospora excavata*: detalhe da ornamentação da parede do esporo; 3) *Glomus intraradices*: esporos em raiz de amendoim; 4) *Glomus intraradices*: aspecto geral do esporo; 5) *Scutellospora gregaria*: aspecto geral do esporo com bulbo suspensor; 6) *Acaulospora scrobiculata*: aspecto geral do esporo com camadas internas da parede com reação em Melzer; 7) *Paraglomus occultum*: aspecto geral dos esporos; 8) *Glomus etunicatum*: aspecto geral do esporo.

CAPÍTULO II

POTENCIAL DE INFECTIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS NATIVA E IMPACTADAS POR MINERAÇÃO GESSEIRA EM ARARIPINA, PERNAMBUCO

Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas nativa e impactadas por mineração gesseira em Araripina, Pernambuco

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão^{(1)*}, José de Paula Oliveira⁽¹⁾,

Hélio Almeida Burity⁽¹⁾ e Leonor Costa Maia⁽²⁾

⁽¹⁾Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Laboratórios de Biologia do Solo e Genoma, Av. General San Martin, 1371, Bongi, 50761-000, Recife-PE. *Email: adalia@ipa.br. ⁽²⁾Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Micologia, Laboratório de Micorriza, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE.

ABSTRACT - (Infectivity potential of arbuscular mycorrhizal fungi in native and impacted gypsum mining area in Araripina, Pernambuco). The effect of gypsum mining on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was evaluated through number of spores, most probable number (MPN) of infective propagules and root colonization. Samples of rhizospheric soil were collected from four areas in a gypsum mine in Araripina-PE: preserved, native “caatinga” (AN), chosen as control; surroundings of the mine (AM); waste deposit area (AR); interface between the waste deposit and a mining degraded area (AI), in two sampling periods: raining (December/2003) and dry (September/2004). The plants around (2 m diameter) each sampling point were collected, with 42 being identified. The area of native “caatinga” (AN) presented higher number of plant species, spores and infectives propagules of AMF. Number of spores and root colonization differed between the raining and dry periods. Higher sporulation occurred in the raining season, while the MPN of propagules and root colonization were higher in the dry season. Positive correlation was observed between the MPN of propagules and number of spores in both collecting periods. Conversely, in the raining season the MPN of propagules was negatively correlated with root colonization. The mining activity decreased amount of AMF spores, infective propagules and plant riches in the studied areas.

Key words: infective propagules, spores, root colonization

RESUMO - (Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas nativa e impactadas por mineração gesseira em Araripina, Pernambuco). Foi avaliado o efeito da mineração gesseira sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pela quantificação do número de esporos, percentual de colonização radicular e número de propágulos infectivos no solo (NMP). O solo foi coletado em quatro áreas da mineradora de gesso em Araripina - PE: caatinga nativa preservada (AN); arredores da mina (AM); rejeito (AR); interface entre o

depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração (AI), nos períodos chuvoso (Dezembro/2003) e seco (Setembro/2004). Em cada ponto de coleta do solo foi considerado um raio de 2 m, onde foram coletadas as plantas, sendo identificadas o total de 42 espécies. A AN apresentou maior número de espécies vegetais, de esporos e de propágulos infectivos de FMA, quando comparada com as demais. O número de esporos e a colonização radicular diferiram estatisticamente entre os períodos de coleta. Maior esporulação foi verificada no período chuvoso. O NMP e a colonização radicular foram maiores no período seco. Houve correlação positiva entre o NMP e o número de esporos nos dois períodos de coleta. Entretanto, no período chuvoso o NMP foi negativamente correlacionado com a colonização radicular. A atividade mineradora causou danos ao local, afetando o número de esporos e de propágulos infectivos de FMA e a riqueza de espécies vegetais, em relação à área preservada.

Palavras-chave: propágulos infectivos, esporos, colonização radicular

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são importantes componentes da microbiota dos solos em ecossistemas naturais e agrícolas, formando associação com a maioria das plantas superiores incluindo quase todas as espécies de interesse agrônômico, pastoril e florestais tropicais (Moreira & Siqueira, 2002).

A atividade de mineração exerce impacto sobre os organismos e processos do solo, inclusive sobre os FMA (Melloni et al., 2003). A população de FMA pode ser pequena em áreas de mineração. Gould et al. (1996) observaram que a redução da viabilidade dos esporos de FMA e o rompimento da rede de hifas no solo poderia estar relacionado à perturbação física do solo e o armazenamento inadequado do solo superficial orgânico. A perturbação do solo causada pelas atividades da mineração separa as plantas de seus endófitos micorrízicos associados. Quando o solo superficial orgânico é removido, a população microbiana nativa é alterada. Esta remoção pode deixar poucos propágulos capazes de iniciarem a colonização micorrízica nas áreas revegetadas, podendo assim, influenciar a diversidade destes fungos durante o estágio inicial de recuperação e até mesmo impedir o estabelecimento de espécies vegetais dependentes da associação micorrízica (Loree & Williams, 1987), alterando também a diversidade vegetal.

Observações no padrão de sucessão de plantas em regiões semi-áridas indicam que os FMA desempenham importante papel ecológico na composição e estabilidade das comunidades de plantas. A inoculação desses fungos melhora a produtividade das plantas pelo aumento da tolerância a seca (essencialmente em regiões áridas) e disponibilidade de nutrientes minerais, que são os primeiros fatores limitantes no estabelecimento das plantas em solos sob atividade mineradora (Marx, 2000). Segundo Jasper et al. (1994), um nível adequado de infectividade de FMA no solo, após o processo de mineração é importante para o

sucesso do restabelecimento da diversidade vegetal na formação de um ecossistema auto-sustentável.

As características químicas e físicas dos solos influenciam a densidade de esporos, a composição de espécies e a distribuição dos FMA, influenciando diferentemente o crescimento das plantas (Day et al., 1987). Altos níveis de fósforo no solo podem influenciar negativamente a efetividade dos FMA, inibindo a colonização radicular (Vierheilig et al., 2000). O pH e o alumínio do solo são fatores influentes na distribuição dos FMA, portanto, o conhecimento da eficiência e distribuição dos FMA em relação ao pH, em conjunto com outros fatores do solo, pode contribuir para o sucesso no manejo de solos degradados, onde prevalece a compactação e acidez (Hayman & Tavares, 1985).

Segundo Brundrett & Abbott (1994), o potencial de infectividade dos FMA é a capacidade de seus propágulos em colonizar as raízes de plantas, sendo mensurado pela taxa de colonização nas raízes dos hospedeiros. Existem no solo três tipos de propágulos de FMA: esporos de resistência, fragmentos de raiz micorrizada e hifas do fungo, que apesar de diferirem quanto à capacidade de sobrevivência e potencial infectivo, são formas de inóculo capazes de originar a simbiose (Silveira, 1992). A estimativa do NMP baseia-se na avaliação dos propágulos infectivos em diluições seriadas até sua extinção (INVAM, 2001), esta técnica enumera todos os propágulos que têm habilidade para colonizar a planta hospedeira (Sieverding, 1991). Uma importante tarefa em estudo ecológico é a determinação do NMP de propágulos infectivos no solo, que está relacionado com a habilidade dos FMA em colonizar as raízes das plantas hospedeiras. E a contagem direta de esporos que indica a diversidade potencial da população de FMA ativa e inativa (dormente ou já em senescência) (Caproni et al., 2003).

Estudos sobre a ecologia dos FMA em ecossistemas naturais e degradados são escassos. Em Pernambuco na região do Nordeste são encontrados apenas os trabalhos de Maia & Trufem (1990), Yano-Melo et al. (1997 e 2003). Aparentemente, não existem trabalhos sobre os FMA em áreas nativas e impactadas pela mineração de gesso no Nordeste do Brasil.

Este trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da mineração gesseira sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pela quantificação do número de esporos, percentual de colonização radicular e número de propágulos infectivos no solo (NMP).

Material e métodos

Foram selecionadas áreas de caatinga nativa preservada e impactada pela mineração de gipsita no município de Araripina – PE ($7^{\circ} 29' 00''$ S, $40^{\circ} 36' 00''$ W). A região apresenta clima Semi-árido mesotérmico, a vegetação predominante é caatinga hiperxerófila e o solo do tipo Latossolo vermelho amarelo distrófico (Cavalcanti & Lopes, 1994).

As coletas foram realizadas em quatro áreas da mineradora: caatinga nativa preservada (AN), considerada como controle, arredores da mina (AM), rejeito (AR), interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração (AI), em dois períodos de amostragem: chuvoso (Dez/2003) com temperatura mensal entre $34,0^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,6^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,2% (Min.) e precipitação de 28,7 mm (Média); e seco (Set/2004) com temperatura mensal entre $33,2^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,3^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,4% (Min.) e precipitação de 1,3 mm (Média) (Fonte: IPA/Araripina-PE). Em cada área foram coletadas dez amostras compostas (três subamostras) de solo (cinco a 20 cm de profundidade) preferencialmente na rizosfera de plantas, sendo os pontos definidos aleatoriamente. Em cada ponto de coleta do solo foi considerado um raio de 2 m, onde foram coletadas as plantas ocorrentes. Uma parte do solo foi encaminhada à Empresa Pernambucana

de Pesquisa Agropecuária (IPA) para análises físicas, químicas e de fertilidade (Tabela 1). As espécies vegetais foram identificadas no Laboratório de Botânica do IPA.

Os esporos de FMA foram extraídos do solo por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose (Jenkins, 1964) e contados em microscópio estereoscópico. A colonização micorrízica foi estimada em 200 fragmentos de raízes com cerca 1cm (considerado colonizado aquele que continha arbúsculos, esporos, micélio interno e/ou externo, além de vesículas), as raízes foram diafanizadas (KOH 10%) e coradas com 0,05% de azul de Tripiano em lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970).

O número mais provável de propágulos (NMP) infectivos de FMA foi obtido através da técnica descrita em Feldmann & Idczak, (1992). Foram montados quatro bioensaios em casa de vegetação, um para cada área e para cada período de coleta. A temperatura e a umidade relativa do ar foram medidas diariamente, variando de 21 a 35 °C e de 31 a 88% respectivamente. Para cada área (AN, AI, AM e AR) foi usada uma amostra composta de solo do campo, homogeneizado, seco, não esterilizado e peneirado (malha de 0,5 cm de abertura), sendo esta a amostra base para as diluições (solo-inóculo). O solo diluente (correspondente à amostra composta de cada subárea) foi homogeneizado, peneirado (malha de 0,5 cm de abertura), autoclavado por 1 h a 120 °C por três dias consecutivos e secado em estufa a 105 °C. As amostras do solo-inóculo foram diluídas em solo diluente nas proporções de 0, 1:10, 1:100 e 1:1000. As amostras diluídas foram colocadas em potes plásticos de 400 mL, com cinco repetições, totalizando 160 unidades. Cada pote recebeu duas sementes de milho (*Zea mays* L.) e após a germinação ($\pm$ 5 dias) apenas uma plântula foi mantida. As plantas foram coletadas aos 30 dias e todo o sistema radicular preparado para verificação da presença de estruturas de FMA. Para o cálculo do NMP são usados três números: o primeiro corresponde ao número de repetições colonizadas na diluição 1:10; o segundo e terceiro números

correspondem às duas maiores diluições. O resultado da combinação dos três números é encontrado na Tabela de Cochran (1950). Para obter o NMP de propágulos cm^{-3} do solo amostrado, o valor dado na tabela é multiplicado por 100.

A densidade de esporo total foi submetida à análise de variância (ANOVA) com dez repetições por tratamento e a percentagem de colonização radicular com 15 repetições por tratamento. Utilizou-se o teste Tukey ($P \leq 0,05$) para comparar as médias das diferentes áreas e época de avaliação pelo programa Sanest (Zonta et al., 1984), o número de esporos foram transformados em $\text{Log}(X+1,5)$, e o % colonização radicular em $\sqrt{(X + 0,5)}$. Foram realizadas análises de correlação simples de Pearson (r) entre as variáveis estudadas (Stasoft, 1997).

Resultados e Discussão

Foram identificadas 42 espécies de plantas, considerando todos os pontos de coleta (período chuvoso + seco) (Tabela 2). A atividade mineradora causou danos ao local, detectado pela baixa diversidade vegetal e quantidade de esporos de FMA (Tabelas 2 e 4) nas três subáreas afetadas (AI, AM e AR), quando comparadas com a área de caatinga nativa preservada (AN). Como a esporulação é dependente da formação de novas raízes (Sieverding, 1991), provavelmente na área nativa (AN) onde as condições ambientais são mais adequadas e não se observa impacto ambiental, a riqueza de espécies vegetais estabeleceu e estimulou o aumento da população de FMA. Silva et al. (2005) verificaram que a atividade mineradora também reduziu o número de espécies vegetais quando comparado às de área nativa. A área de caatinga nativa preservada (AN) apresentou maior número de espécies vegetais, de esporos e de propágulos infectivos de FMA.

Elevados teores de fósforo, cálcio e magnésio nos dois períodos de amostragem foram registrados nas áreas fortemente impactadas pela atividade de mineração (AI, AM e AR) (Tabela 1). Possivelmente, os baixos valores verificados no número de esporos, número de

espécies vegetais e no NMP de propágulos infectivos de FMA durante o período chuvoso (Tabelas 2, 3 e 4) foram devido às severas condições edáficas observadas nessas subáreas. A presença de espécies de FMA não esporulante pode ser a razão da baixa densidade de esporos encontrada nessas subáreas afetadas. Douds (1994) também observou que o incremento de P no solo diminuiu a produção de esporos de FMA. É difícil separar os fatores mais importantes nessa interação, embora esteja definido que, em campo, as concentrações de propágulos de FMA são correlacionadas principalmente com as condições de solo (pH, textura, concentração de nutrientes) e cobertura vegetal (Sieverding, 1991). Ainda segundo Sieverding (1991) os menores números de propágulos de FMA são geralmente encontrados em áreas com vegetação degradada. Gould et al. (1996) observaram que o Mg foi inversamente relacionado com a ocorrência de esporos, em áreas mineradas e revegetadas. Segundo Siqueira et al. (1986) o efeito negativo de altas doses de Ca no solo sobre *Gigaspora margarita* parece ter sido na redução da ramificação do tubo germinativo.

Verificou-se maior NMP de propágulos infectivos de FMA durante o período seco quando comparado ao chuvoso em todas as subáreas estudadas (Tabela 3). É possível que algumas espécies de FMA (presentes em solos obtidos durante o período chuvoso) cujos esporos não apresentam longo período de dormência, germinem e não encontrando hospedeiro disponível, acabem morrendo. Esta hipótese explicaria os baixos valores de NMP infectivos nas subáreas impactadas durante o período chuvoso quando comparado ao seco. Segundo Abbott & Robson (1991), o aumento do nível de fósforo no solo pode influenciar espécies de FMA hábeis em colonizar as raízes das plantas e que a técnica do NMP pode ativar alguns propágulos que nas condições de campo não seriam infectivos, o que justifica os diferentes números de propágulos encontrados nas subáreas estudadas.

Houve efeito isolado dos fatores (áreas e períodos de amostragens), mas sem interação para o número de esporos (áreas $P < 0,0001$; períodos de amostragens $P < 0,0001$) e percentual de colonização radicular (áreas $P < 0,0002$; períodos de amostragens $P < 0,0001$). A quantidade de esporos na subárea AN (baixa fertilidade do solo) foi considerada alta (média de 4,2 esporos g^{-1} de solo), diferenciando-se significativamente das demais subáreas. Verificou-se no período chuvoso maior produção de esporos (média 3 esporos g^{-1} solo) (Tabelas 4 e 5). Esses dados foram corroborados por Caproni et al. (2005), que verificaram aumento na densidade de esporos no período chuvoso em áreas revegetadas com *Acacia mangium* com cinco anos de idade após mineração de bauxita na região de Porto Trombetas, PA. Maia & Trufem (1990) verificaram que o número de esporos total na rizosfera de plantas de interesse agrônomo variou de 0,8 a 3,0 esporos g^{-1} de solo. Coelho et al. (1997) também verificaram que a densidade de esporos foi mais alta no período chuvoso em solo sob plantio de *Eucalyptus* em São Paulo. Allen et al. (1998) observaram que durante a estação seca houve uma diminuição do número de esporos e que durante a estação chuvosa houve aumento do número de esporos, esses autores sugeriram, portanto, a ocorrência de variação sazonal na dinâmica micorrízica.

Foi verificado no solo de caatinga nativa preservada (AN) que quando o número de esporos era alto o percentual de colonização era baixo (Tabela 4). Louis & Lim (1987), em solos tropicais de floresta úmida também observaram que quando o número de esporos era alto a percentagem de colonização era baixa, bem como quando o número de esporos era baixo a colonização era alta. Os autores sugeriram que a variação nos percentuais de colonização pode ser influenciada pela interação entre o estado nutricional dos solos tropicais, a planta hospedeira e o ciclo de vida dos FMA.

O percentual de colonização radicular variou de 37,5 a 56,8 % entre as áreas estudadas (Tabela 4). Na área de caatinga nativa (AN) o percentual de colonização radicular foi de

37,5%, valor que se encontra dentro do percentual de colonização radicular que variou de 22 a 50% em solos de áreas de caatinga no estado de Pernambuco (Silva et al., 2001 b).

Foi observado maior percentual de colonização radicular nas áreas sob forte impacto ambiental (AM = 55% e AR = 56,8%) diferenciando significativamente das demais (Tabela 4). A dependência micorrízica de plantas da caatinga pode estar relacionada a diversos fatores que interferem na colonização micorrízica, tais como: susceptibilidade e competitividade nutricional dos hospedeiros, micotrofismo facultativo, fisiologia das raízes e diferentes mecanismos de sobrevivência dos FMA (germinação de esporos, quantidade de inóculo e crescimento hifálico). Maior percentual de colonização dos FMA na rizosfera das plantas foi verificado durante o período seco (Tabela 5). Possivelmente, o alto nível de fósforo no solo verificado neste período, influenciou espécies de FMA hábeis a colonizar as raízes das plantas. Além do mais, o menor percentual de colonização radicular verificado durante o período chuvoso, pode ser uma resposta do aumento da disponibilidade de nutrientes, devido ao aumento da umidade no solo e intensa atividade microbiana na matéria orgânica neste período.

Maior esporulação foi verificada durante o período chuvoso (Tabela 5), porém o NMP infectivo foi menor neste período quando comparado ao período seco (Tabela 3). Provavelmente a presença de esporos dormentes tenha mascarado a análise do NMP de propágulos infectivos no período chuvoso. Os dados mostraram correlação significativa entre o NMP de propágulos infectivos de FMA e o número de esporo total do solo (Tabela 6). Conseqüentemente, o potencial de inóculo de um solo, ou a capacidade dos propágulos fúngicos de um solo infectarem raízes de plantas, pode estar relacionado ao número de esporos presentes (Collozi-Filho & Balota, 1994). Portanto, apesar do número de esporos no

solo não fornecer o valor real de sua infectividade, pode dar uma indicação do nível populacional dos FMA (Dodd et al., 1983).

Correlação negativa significativa foi verificada entre o NMP e a colonização radicular ($r=0,98^*$) durante o período chuvoso (Tabela 6). As subáreas AN e AI apresentaram menor percentual de colonização radicular, provavelmente devido ao elevado NMP de propágulos infectivos verificados nessas subáreas (Tabelas 3 e 4). Isto pode ter ocorrido devido à presença de diferentes tipos de propágulos como esporos, fragmentos de raiz micorrizada e hifas do fungo ter permanecido no solo por mais tempo. De modo geral o NMP de propágulos infectivos de FMA foi sempre superior ao número de esporo total do solo (Tabelas 3 e 4). An et al. (1990) avaliando os métodos de NMP e de contagem direta de esporos, mencionaram que, dependendo da espécie de FMA, o número de esporos pode ser menor ou maior que o de propágulos realmente infectivos. Silva et al. (2001a) observaram que o número de esporos de FMA no solo foi sempre superior ao número de propágulos infectivos.

Conclusões

A atividade mineradora casou danos ao local, afetando o número de esporos e de propágulos infectivos de FMA e a riqueza de espécies vegetais, em relação à área preservada. Confirma-se a importância das plantas e dos FMA na manutenção das áreas afetadas por mineração de gesso. Recomenda-se a revegetação com mudas de leguminosas, visto que é a família melhor representada nas áreas afetadas, podendo ser beneficiada pela micorrização.

Agradecimentos

A Dra. Sandra Farto Botelho Trufem pelas excelentes sugestões. A Capes e ao CNPq, pelas bolsas concedidas respectivamente a A.C.E.S. Mergulhão (PG), L.C. Maia (pesq.), H.A. Burity (pesq.).

Literatura citada

- Abbott, L.K. & Robson, A.D.** 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscula mycorrhizae. *Agriculture, Ecosystems and Environment* v.35, p.121-150.
- Allen, E.B.; Rincón, E., Allen, M.F., Pérez-Jimenez, A., Huante, P.** 1998. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* v.30, p.261-271.
- An, Z.Q., Hendrix, J.W., Hershman, D.E., Henson, G.T.** 1990. Evaluation of the “most probable number (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Mycologia* v.85 p.576-581.
- Brundrett, M.C. & Abbott, L.K.** 1994. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. *New Phytologist* v.127, p.539-546.
- Caproni, A.L., Franco, A.A., Berbara, R.L.L., Granha, J.R.D.O., Ribeiro, E.M.S., Saggin Jr, O.J.** 2003. Capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas após mineração de bauxita no Pará. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v.38, p.937-945.
- Caproni, A.L., Franco, A.A., Berbara, R.L.L., Granha, J.R.D.O., Marinho, N.F.** 2005. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. *Revista Árvore* v.29, p.373-381.
- Cavalcanti, A.C. & Lopes, O.F.** 1994. Condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe e viabilidade de produção sustentável de culturas. Brasília: EMBRAPA - SPI, 42p.
- Cochran, W.G.** 1950. *Biometrics*. v.6, p.105-116.
- Coelho, F.C., Borges, A.C., Neves, J.C.L., Barros, N.F., Muchovej, R.M.C.** 1997. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*, nos municípios de Botucatu, São José dos Campos e São Miguel Arcanjo, São Paulo. *Revista Árvore* v.21, p.563-573.
- Day, L.D., Sylvia, D.M., Collins, M.E.** 1987. Interactions among vesicular-arbuscular mycorrhizae, soil, and landscape positions. *Soil Science Society of American Journal* v.51, p.635-639.
- Dias, L.E., Franco A.A., Campello, E., Faria, S.M., Silva, E.M.** 1995. Leguminosas florestais: aspectos relacionados com su nutrición y uso em la recuperación de suelos degradados. *Bosque* v.16, p.121-127.
- Dodd, J., Krikun, J., Hass, J.** 1983. Relative effectiveness of indigenous populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from four sites in Negev. *Israel Journal of Botany* v.32, p.10-21.

- Douds, D.D.** 1994. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flügge. *New Phytologist* v.126, p.233-237.
- Feldmann, F. & Idczak, E.** 1992. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In NORRIS, J.R.; READ, D.J.; VARMA, A.K. (Eds.). *Techniques for Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology*. Academic Press, London. p.799-817.
- Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H.** 1963. Spore of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* v.46, p.235-244.
- Gould, A.B., Hendrix, J.W., Ferriss, R.S.** 1996. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. 1. Propagule and spore population densities. *Canadian Journal of Botany* v.74, p.247-261.
- Hayman, D.S. & Tavares, M.** 1985. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the simbiotic efficiency of diferent endophytes. *New Phytologist* v.100, p.367-377, 1985.
- INVAM.** 2001. <http://invam.caf.wvu.edu/MycInfo/Methods/Assays/MPN.htm>
- Jasper, D.A.; Abbott, L.K.; Robson, A.D.** 1994. Soil disturbance in native ecosystems- The decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi. In: (Read, D.J.; Lewis, D.H.; Fitter, A.H.; Alexander, I.J. (Eds.) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Cambridge.
- Jenkins, W.R.** 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* v. 48, 692p.
- Loree, M.A.J. & Willams, S.E.** 1987. Colonization of western wheatgrass (*Agropyron smitii* Rydb) by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during the revegetation of a surface mine. *New Phytologist* v.106, p.753-744.
- Louis, I. & Lim, G.** 1987. Spore density and root colonization of vesicular-arbuscular mycorrhizas in tropical soil. *Transactions of the British Mycological Society* v.88, p.207-212.
- Maia, L.C. & Trufem, S.F.B.** 1990. Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* v.13, p.89-95.
- Marx, D.H.** 2000. Stabilizing ecosystems with VAM fungi: significance of VAM fungi in natural Plant sucession on disturbed arid and semi-arid lands. *PlantHealthCare.com* online magazine, Fevereiro.
- Melloni, R., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S.** 2003. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v.38, p. 267-276.

- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O.** 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA. 626p.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S.** 1970. 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.
- Sieverding, E.** 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation. Eschborn: Federal Republic of Germany, 317p.
- Silva, G.A., Maia, L.C., Silva, F.S.B., Lima, P.C.F.** 2001a. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundas de áreas de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. Revista Brasileira de Botânica v.24, p.135-143.
- Silva, G.A., Santos, B.A., Alves, M.V., Maia, L.C.** 2001b. Arbuscular mycorrhiza in species of Commelinidae (Liliopsida) in the State of Pernambuco (Brazil). Acta Botanica Brasilica v.15, p.155-165.
- Silva, A.G., Trufem, S.F.B., Saggin-Júnior, O.J., Maia, L.C.** 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. Mycorrhiza v.15, p.47-53.
- Silveira, A.P.D.** 1992. Micorrizas. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. (Coords). Microbiologia do solo, Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.257-296.
- Siqueira, J.O., Mahmud, A.W., Hubbel, D.H.** 1986. Comportamento diferenciado de fungos formados de micorrizas arbusculares em relação à acidez do solo. Revista Brasileira de Ciência do Solo v.10, p.1-16.
- STASOFT.** 1997. Statistica for Windows. Tulsa, USA.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J.M., Wyss, U., Piche, Y.** 2000. Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. Soil Biology & Biochemistry v.32, p.589-595.
- Yano-Melo, A.M., Maia, L.C., Morgado, L.B.** 1997. Fungos micorrízicos arbusculares em bananeiras cultivadas no Vale do Submédio São Francisco. Acta Botanica Brasilica v.11, p.115-121.
- Yano-Melo, A.M., Trufem, S.F.B., Maia, L.C.** 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brasil. Hoehnea v.30, p.79-87.
- Zonta, E.P., Machado, A.A., Silveira Júnior, P.** 1984. Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas: Departamento de Matemática e Estatística. 151p.

Tabela 1 Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro áreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE

Áreas ¹	pH	P	C	Ca	Mg	K	SO ₄	CO ₃	HCO ₃	Análise Textural (%)			MO	Fe	Dap	Dr	UR	PMP	
		H ₂ O mg.dm ⁻³	g.Kg ⁻¹	-----	cmolc.dm ⁻³	-----	-----	meq.L ⁻¹	-----	Areia	Argila	Silte	(%)	mg/dm ³	---g/cm ³ ---	(%)	15	Atm	Classe textural
Período Chuvoso																			
AN	6,28	5	1,16	5,90	1,30	0,43	Presença	0,20	1,80	67	8	25	2,00	12,73	1,44	2,50	1,25	4,47	Franco arenoso
AI	5,72	11	1,27	20,00	9,30	0,46	Presença	0,20	0,80	26	45	29	2,19	52,50	1,21	2,55	6,90	20,51	Argiloso
AM	7,64	54	1,34	40,50	6,25	0,19	Forte Presença	0,40	1,60	22	39	39	2,31	0,93	1,20	2,31	8,65	24,88	Franco argiloso
AR	7,65	42	0,72	68,00	9,75	0,34	Forte Presença	0,20	1,20	27	6	67	1,24	0,41	1,28	2,58	7,00	18,14	Franco siltoso
Período Seco																			
AN	6,43	8	1,20	6,20	1,15	0,36	Presença	0,80	5,60	74	8	18	2,07	13,73	1,34	2,59	0,40	4,67	Franco arenoso
AI	5,72	14	1,30	36,25	11,25	0,62	Forte Presença	0,00	0,80	14	59	27	2,24	79,80	1,13	2,44	8,60	30,65	Argiloso
AM	7,52	161	1,33	45,40	3,10	0,40	Forte Presença	0,00	1,60	22	47	31	2,29	0,71	1,10	2,36	6,80	26,93	Franco argiloso
AR	7,56	32	0,65	61,75	1,65	0,46	Forte Presença	0,20	2,40	37	28	35	1,12	0,23	1,22	2,46	6,55	8,29	Franco siltoso

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 2. Espécies de plantas em subáreas de mineração de gipsita no sertão de Araripina, Pernambuco, coletadas nos dois períodos de amostragem

Família/Espécie	Nome vulgar	Subáreas ¹			
		AN	AM	AR	AI
Acanthaceae					
<i>Ruellia paniculata</i> L.	-		X	X	
<i>Dicliptera</i> sp.	-	X			
Amaranthaceae					
<i>Alternanthera tenella</i> Colla	Ervanso		X	X	
Anacardiaceae					
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Alemão	Aroeira	X			
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Umbuzeiro	X			
Annonaceae					
<i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fries	Bananinha	X			
Apocynaceae					
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	Pereiro	X			X
Asteraceae					
<i>Tagetes minuta</i> L.	Cravo-branco		X	X	
Bignoniaceae					
<i>Arrabidaea corallina</i> (Jacq.) Sandw.	Cipó de balaio		X		
Boraginaceae					
<i>Heliotropium procumbens</i> Mill.	Borragem				X
Bromeliaceae					
<i>Tillandsia loliacea</i> Mart. ex Schult. f.	-	X			
Burseraceae					
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) Gillet.	Umburana	X			
Cactaceae					
<i>Pilosocereus</i> sp.	Faxeiro				X
Caricaceae					
<i>Jacaratia</i> sp.	Mamãozinho	X			
Capparaceae					
<i>Caparis hastata</i> L.	Feijão-bravo	X			
<i>Caparis flexuosa</i> (L.) L.	Feijão-de-boi	X	X		
Convolvulaceae					
<i>Ipomoea</i> sp.	Jitirana	X			
<i>Ipomoea phyllomega</i> (Vell.) House	-	X			
<i>Merremia</i> sp.	-		X		
Euphorbiaceae					
<i>Croton sonderianus</i> Mull. Arg.	Marmeleiro-preto	X			
<i>Croton</i> sp.	Marmeleiro	X	X		X
<i>Manihot</i> sp.	Maniçoba				X
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl.) Baill.	Pinhão-bravo		X		
Leguminosae Caesalpinoideae					
<i>Bauhinia cheilantha</i> Steud.	Mororó	X			
<i>Cassia trachypus</i> Mart ex Benth.	Canafístula		X		
Leguminosae Mimosoidae					
<i>Parapiptadenia zehntneri</i> (Harms) M.P.	Angico-branco	X			
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Jurema-preta	X			
<i>Mimosa ophthalmocentra</i> Mart. ex. Benth.	Jurema de embira	X	X		
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.	Angico-de-carçoço	X			X
<i>Prosopis juliflora</i> DC.	Algaroba		X	X	X
<i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd.	Anis-de-bode		X		

Tabela 2. (cont.)

Família/Espécie	Nome vulgar	Subáreas ¹			
		AN	AM	AR	AI
Leguminosae Papilionoideae					
<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.	Feijãozinho-de-capoeira				X
<i>Canavalia</i> sp.	-	X			
Malphigiaceae					
<i>Banisteria cotinifolia</i> A. Juss.	-	X			
Malvaceae					
<i>Sida</i> sp.	Malva		X		
<i>Sida cordifolia</i> L.	Malva-grossa			X	
<i>Sidastrum micranthum</i> (A. St. –Hill.)	Malva-preta				X
Nyctaginaceae					
<i>Guapira noxia</i> (Netto) Sundell.	Piranha	X			
Rhamnaceae					
<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.	Juazeiro		X		X
Sapindaceae					
<i>Allophylus quercifolia</i> (Mart.) Radlk.	-	X			
Selaginellaceae					
<i>Sellaginella convoluta</i> Spring.	Jericó	X			
Vitaceae					
<i>Cissus simsiana</i> Schult & Schult f.	Parreira-brava	X			
Total		25	14	5	10

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 3. Número mais provável de propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, em dois períodos de coleta

Áreas ¹	Período Chuvoso	Período Seco
	(N ⁰ propágulos g ⁻¹ solo)	
AN	170 (52-561)*	540 (164-1.782)
AI	26 (8-86)	180 (55-594)
AM	22 (7-73)	140 (42-462)
AR	17 (5-56)	130 (39-429)

*Em parêntese, mínimo e máximo limite de confiança a 95% de probabilidade (Cochran, 1950). ¹(AN) = caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 4. Colonização radicular e número de esporos de FMA em solos de caatinga nativa e impactado por mineração de gipsita, obtidos sem ciclos de multiplicação, independentemente do período de coleta

Áreas ¹	Colonização Radicular (%)*	Número de esporos g ⁻¹ solo**
AN	37,5 b	4,2 a
AI	42,5 b	0,7 b
AM	55,0 a	1,2 b
AR	56,8 a	1,4 b
CV(%) = 23		CV(%) = 30

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05). *Médias originais, transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$ para a análise de variância (n=30). **Médias originais, transformadas em Log (X+1,5) para a análise de variância (n=20). ¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 5. Colonização radicular e no número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em solos de caatinga nativa e impactada pela mineração de gipsita, obtidos sem ciclo de multiplicação, independentemente da área de coleta

Período	Colonização Radicular (%)*	Número de esporos g ⁻¹ solo**
chuvoso	26,4 b	3,0 a
seco	69,5 a	0,7 b
CV(%) = 23		CV(%) = 30

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). *Médias originais porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$ (n=60). **Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em Log (X+1,5) (n=40).

Tabela 6. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA (período chuvoso e seco), número de esporo e percentual de colonização radicular. * = correlação significativa (P<0,05), ns = não significativo

Variáveis	Períodos	
	chuvoso	seco
Esporos X NMP	0,98*	0,95*
Colonização radicular X NMP	-0,98*	-0,66 ns

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DO SOLO RELACIONADA À GLOMALINA E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLOS IMPACTADOS POR MINERAÇÃO DE GESSO NO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO, ARARIPINA-PE

Produção de proteína do solo relacionada à glomalina e atividade microbiana em solos impactados por mineração de gesso no semi-árido brasileiro, Araripina-PE

**A.C.E.S. Mergulhão^{a,*}, F.S.B. Silva^b, S.V. Pereira^c, M.V.B. Figueiredo^a, H.A. Burity^a,
L.C. Maia^b**

^aEmpresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Laboratório de Biologia do Solo, Av. General San Martin, 1371, Bongi, 50761-000, Recife-PE, *E.mail: adalia@ipa.br

^bUniversidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Micologia, Laboratório de Micorriza, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE.

^cInstituto de Tecnologia de Pernambuco-ITEP, Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Av. Prof. Luiz Freire, 700 Cidade Universitária, CEP 50740-540, Recife-PE.

Resumo

As atividades de mineração envolvem a retirada da cobertura vegetal, com remoção da camada orgânica do solo, causando grave impacto ambiental, refletido nas populações microbianas e suas atividades. Áreas de caatinga no semi-árido brasileiro estão sendo utilizadas para extração de gesso, acarretando alterações ambientais que precisam ser avaliadas. Diversos parâmetros são usados para medir a atividade microbiana no solo. Entre esses vem sendo proposta a glomalina, glicoproteína produzida pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), cuja concentração no solo varia em resposta a perturbações no ambiente. Foram estudadas áreas preservada e explorada por mineração gesseira, em Pernambuco, visando avaliar e comparar o estado biológico de solos, assim como quantificar a produção de glomalina por FMA nos períodos de amostragem (chuvoso e seco) e fornecer subsídios para sua recomendação como indicador bioquímico da qualidade do solo. Coletas de solo foram realizadas em 4 áreas: 1- nativa preservada (AN); 2 – arredores da mina (AM); 3 – rejeito (AR); 4 – interface entre a área de rejeito e a área de caatinga degradada (AI), em período chuvoso (Dez/2003) e seco (Set/2004). Em geral, os valores de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), C da biomassa microbiana, respiração basal e o número mais provável de propágulos (NMP) de fungos, bactérias e actinomicetos foram maiores no solo de caatinga preservada quando comparada com as áreas impactadas. A atividade gesseira reduziu a concentração de glomalina facilmente extraível (GFE) em relação ao encontrado na área de caatinga nativa nos dois períodos de amostragem. Maiores depósitos de glomalina total (GT) também ocorreram na área nativa, especialmente durante o período chuvoso. A atividade mineradora produziu impacto negativo na microbiota do solo, reduzindo o NMP de microrganismos e a atividade enzimática total. A biomassa microbiana foi significativamente menor na área de rejeito. Confirma-se a possibilidade de utilização da fração facilmente extraível de glomalina como indicadora da qualidade do solo, considerando que esta apontou diferenças entre os solos das áreas estudadas.

Palavras-chave: Glicoproteína; Biomassa microbiana; Atividade gesseira; FMA; NMP.

Introdução

A região do Araripe, localizada no sertão de Pernambuco, ocupa área total de 1.914,4 Km² e tem como principal atividade econômica a indústria de gesso. O chamado pólo gesseiro do Araripe possui 40% das reservas de gipsita do mundo e atende a 95% da demanda de gesso do mercado nacional. A mineração de gipsita destaca-se pela importância econômica e social, absorvendo sobretudo trabalhadores da região. Entretanto, esta atividade envolve a retirada da cobertura vegetal, com a remoção da camada orgânica do solo, causando grave impacto ambiental. Devido à alta sensibilidade relacionada à atividade antrópica e à simplicidade de determinação, a avaliação de atributos microbiológicos e bioquímicos pode ajudar a identificar as principais limitações do ecossistema impactado e sugerir estratégias visando manter a sua sustentabilidade (Gianfreda & Bollag, 1996; Melloni et al., 2001; Silveira et al., 2006).

Métodos para estimar a atividade microbiana em solos da região semi-árida são fundamentais no monitoramento ambiental e recuperação de áreas degradadas (Pereira et al. 2004). Estudos sobre o impacto de alterações ambientais nas populações microbianas e suas atividades têm utilizado parâmetros como: número total de microrganismos do solo (bactérias e fungos), estimativa do carbono da biomassa microbiana, quociente metabólico (qCO_2), hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) e taxa respiratória microbiana (Sarig & Steinberg, 1994; Garcia et al., 2004).

A biomassa microbiana pode funcionar como reserva de nutrientes facilmente disponível ou como catalisador na decomposição da matéria orgânica (Garcia et al. 2004). Além de atuar como agente da transformação bioquímica dos compostos orgânicos, a biomassa constitui um reservatório de N, P e S no solo (Wardle, 1992). A estimativa da

biomassa microbiana pode fornecer dados úteis sobre modificações nas propriedades biológicas dos solos (Jordan et al., 1995).

A respiração microbiana é utilizada como indicador da qualidade dos solos em áreas degradadas, estando relacionada com a perda de carbono orgânico do sistema solo-planta para a atmosfera, ciclagem de nutrientes e respostas a estratégias de manejo do solo (Parkin et al., 1996). Valores de quociente metabólico (qCO_2), razão entre $C-CO_2$ e C da biomassa são ferramentas fundamentais na elucidação de fluxos de entrada de elementos ou energia através da biomassa microbiana do solo, além de constituírem indicadores sensíveis de sucessões em um ecossistema (Anderson & Domsch, 1989).

O uso da hidrólise do FDA é uma medida para avaliar o impacto de práticas agrícolas no solo (Aon et al., 2001; Taylor et al., 2002), que pode ser afetada por vários fatores. Estes influenciam a produção, a atividade, o comportamento catalítico e a persistência das enzimas no solo (Gianfreda & Bollag, 1996; Andrade & Silveira, 2004).

A perturbação do solo resulta em diminuição das populações de microrganismos, entre os quais se encontram os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), interferindo na comunidade vegetal. Os FMA são componentes importantes de sistemas sustentáveis, melhorando o estado nutricional do fotobionte associado e a estruturação do solo via ação conjunta do micélio externo e seus subprodutos. Entre esses, a glomalina, glicoproteína insolúvel produzida pelos FMA, está relacionada à agregação de partículas devido às suas características adesivas e é considerada a maior fonte de carbono da matéria orgânica no solo (Wright & Nichols, 2002; Rillig, 2004), contribuindo para melhor qualidade edáfica (Rillig et al., 2002). Rillig et al. (2003) sugerem que a quantificação de glomalina no solo pode constituir importante indicador de mudanças causadas pelo uso da terra, indicando também a

sua reabilitação. O efeito do impacto da atividade gesseira sobre a produção de glomalina não é conhecido, sendo esta a primeira investigação sobre o tema.

Constituem objetivos deste trabalho avaliar e comparar o estado biológico de solos em áreas de caatinga nativa preservada e impactada por mineração de gesso, assim como quantificar a produção de glomalina por FMA nos períodos de amostragem (chuvoso e seco) e fornecer subsídios para sua recomendação como indicador bioquímico da qualidade do solo.

Material e Métodos

- **Áreas de estudo:** Foram selecionadas áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita no município de Araripina, Pernambuco ($7^{\circ} 29' 00''$ S, $40^{\circ} 36' 00''$ W). A região apresenta clima Semi-árido mesotérmico, a vegetação que predomina é caracterizada como caatinga hiperxerófila, sobre solo do tipo Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (Cavalcanti & Lopes, 1994).

- **Coletas:** Foram realizadas coletas em quatro áreas da mineradora: 1 - caatinga nativa preservada (AN), considerada como controle; 2 - arredores da mina (AM); 3 - rejeito (AR); 4 - interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração (AI), em dois períodos de amostragem: chuvoso (Dez/2003) com temperatura mensal entre $34,0^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,6^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,2% (Min.) e precipitação de 28,7 mm (Média); e seco (Set/2004) com temperatura mensal entre $33,2^{\circ}\text{C}$ (Máx.) e $17,3^{\circ}\text{C}$ (Min.), umidade relativa de 22,4% e precipitação de 1,3 mm (Média) (Fonte: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA/Araripina-PE). Em cada área foram coletadas dez amostras compostas de solo (5 a 20 cm de profundidade) da rizosfera, sendo os pontos definidos aleatoriamente. Análises físicas e químicas do solo foram realizadas no IPA (Tabela 1).

- **Análises do Carbono microbiano, respiração basal, hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$)**

O carbono da biomassa microbiana foi determinado segundo Vance et al. (1987). Amostra de 5g de solo, com capacidade de campo ajustada a 50% permaneceu em repouso por 24 h no escuro. Após este período adicionou-se 0,4 mL de clorofórmio e o solo permaneceu em recipiente fechado por 30 min. Como solução extratora foi utilizado 40 mL de sulfato de potássio (K_2SO_4 0,5M). Os extratos obtidos após agitação (150 rpm, 1h) e filtração (Whatman nº 1) das amostras foram armazenados a - 4°C, até o momento da análise do carbono microbiano. O mesmo procedimento foi adotado nas amostras não fumigadas. A determinação do carbono da biomassa microbiana foi realizada pelo método de oxidação com dicromato de potássio após digestão ácida a 100 °C e posterior titulação com sulfato ferroso amoniacal, utilizando ferroína como indicador.

A respirometria do solo foi avaliada segundo Grisi (1997). Amostras com 5g de solo, depois de ajustadas a 40% da capacidade de campo, foram mantidas em frascos de vidro hermeticamente fechados contendo um recipiente com 10 mL de KOH 0,5N. Após incubação (28 °C) no escuro por 15 dias, o CO_2 absorvido foi determinado por titulação com HCl 0,1N, usando-se fenolftaleína e alaranjado de metila como indicadores de pH. Os valores de CO_2 acumulados foram expressos em μg de C g^{-1} de solo seco.

O quociente metabólico (qCO_2), razão entre a respiração do solo e a biomassa microbiana foi calculado segundo Anderson & Domsch (1978), expresso em μg h^{-1} de $C-CO_2/\mu g$ g^{-1} de C da biomassa no solo seco.

A atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína (FDA) foi estimada segundo Swisher & Carrol (1980). Amostras de 5g de solo foram transferidas para Erlenmeyer (250 mL), juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio (60 mM) pH 7,6 e 0,2 mL de solução estoque de FDA (2 mg/mL acetona). Após incubação (25 °C, 20 min.) sob agitação (160 rpm), a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona. As suspensões de solo

foram filtradas (filtro Whatman nº 1) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 490 nm. A curva padrão foi obtida adicionando-se alíquotas de FDA nas quantidades de 0-400 µg em 5 mL de tampão fosfato. Os tubos foram pré-hidrolisados em água fervente por 1 h e transferidos para Erlenmeyers contendo 5g de solo e 15 mL de tampão fosfato. Os resultados foram expressos em µg de fluoresceína g⁻¹ de solo seco h⁻¹.

- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Microrganismos do Solo

O NMP de bactéria, actinomicetos e fungos do solo foi determinado pelo método do plaqueamento por gotas, após diluição de amostras de solo em meios de cultura mantidos a 45 °C, conforme Jahnel et al. (1999). Foram preparadas diluições para bactérias a partir de 10⁻³ a 10⁻⁷ e para actinomicetos e fungos a partir de 10⁻² a 10⁻⁶. Os meios utilizados foram: agar nutrientes para bactérias e actinomicetos e meio Martin para fungos totais. Utilizou-se 3 placas (cada com 5 gotas) por diluição, as placas com os meios inoculados foram incubadas em estufa a 28 °C e avaliadas aos três dias para bactérias e aos sete dias para os fungos. A presença de unidades formadoras de colônias (UFC) foi verificada com o auxílio de estereomicroscópio. O crescimento em uma gota indica a presença de pelo menos um propágulo viável transferido para o meio de cultura. Estimou-se o NMP de microrganismos do solo em cada uma das diluições com o auxílio da tabela de probabilidade de ocorrência (Cochran, 1950).

- Análises de glomalina facilmente extraível (GFE) e total (GT): Foram quantificadas duas frações de glomalina a GFE e a GT, seguindo-se a metodologia de Wright & Upadhyaya (1998). Para a GFE, 2 mL de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) foram adicionados a 0,25g de agregados (classe 1-2 mm), seguindo-se a extração em autoclave (121⁰C/30 min) e posterior centrifugação (10000g/5 min). A fração GT foi extraída a partir da adição de 2 mL de citrato de sódio (50 mM; pH 8,0) ao sedimento resultante da extração da fração GFE, sendo

conduzidos oito ciclos (1h) de extração em autoclave. Ao final de cada ciclo, o material era centrifugado e o sedimento resuspenso com 2 mL da solução extratora. Os sobrenadantes de ambas as frações foram armazenados (-4°C) e a glomalina quantificada (Bradford, 1976), usando albumina bovina como padrão.

- Análises estatística

Os dados de biomassa microbiana, FDA, respirometria, GFE, GT (5 repetições/tratamento) e NMP de microrganismos do solo (3 repetições/tratamento) foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$) usando o programa Sanest (Zonta et al., 1984). Para análises, os valores de biomassa microbiana foram transformados em $\sqrt{X}$, os de GT em $\sqrt{X+0,5}$, os do FDA e do NMP em $\sqrt{X+0,5}$.

Resultados e Discussão

A análise de variância indicou interação entre áreas e períodos de amostragem para o FDA ($P<0,0001$) e para o NMP de fungos do solo ($P<0,0001$). Houve efeito isolado do fator área para o carbono da biomassa microbiana ($P<0,002$) e para o NMP de bactérias ($P<0,0002$) e de actinomicetos ($P<0,0001$). Para a respiração basal, houve efeito isolado dos fatores (áreas $P<0,0001$; períodos de amostragem $P<0,0001$), mas sem interação. Para o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) não houve diferenças significativas entre os fatores áreas ($P = 0,10657$) e períodos de amostragem ($P = 0,71469$) e nem para interação ($P = 0,79095$). Houve interação ($P<0,0001$) entre áreas e períodos de amostragem para a produção de glomalina facilmente extraível (GFE). Por outro lado, para a glomalina total (GT) houve efeito isolado dos fatores (áreas $P<0,004$; períodos de amostragem $P<0,0001$), mas sem interação.

O C da biomassa microbiana foi menor nas áreas impactadas, embora só tenha diferido estatisticamente entre a área de rejeito e as áreas nativa e de interface (Tabela 2). Isto pode

estar relacionado ao fato do C orgânico total e a matéria orgânica não ter variado entre as áreas, exceto para a de rejeito (Tabela 1). Os valores encontrados para o C da biomassa microbiana estão dentro da faixa referida por outros autores para o cerrado, mata ciliar e floresta de eucalipto (Alvarenga et al., 1999; Melloni et al., 2001; D'Andréa et al., 2002), porém, valores bem inferiores foram observados em outra área com solo nativo do semi-árido, em Pernambuco (Pereira et al., 2004).

Como a respiração do solo diminuiu nas áreas com maior impacto e não houve severa diminuição na biomassa (Tabela 2), infere-se que a comunidade microbiana estaria com atividade metabólica reduzida por causa do forte impacto da atividade gesseira, o que contribuiu para elevar os níveis de pH nessas áreas (Tabela 1). Ohya et al. (1998) sugeriram que a respiração basal está muitas vezes relacionada com o C da biomassa e com a comunidade metabolicamente inativa ou em estado de dormência. Segundo Insam et al. (1996), solos impactados por ação antrópica estariam sob estresse, havendo menor eficiência de utilização do C, o que resulta em maior liberação de CO₂ por unidade de substrato. Šantrúcková & Straškraba (1991) referiram que mudanças na atividade respiratória devido ao estresse estão relacionadas com alterações na biomassa microbiana.

As amostras de solo da área de caatinga nativa preservada apresentaram maior liberação de C-CO₂ por unidade de tempo que as amostras das áreas impactadas (Tabela 2) durante o período chuvoso em relação ao seco (24,5 e 21,2 µg CO₂ g⁻¹ solo seco dia⁻¹, respectivamente) indicando que a comunidade microbiana nessa área é mais ativa que nas demais. Maior valor de respiração microbiana deve-se à ciclagem mais intensa da população microbiana, com conseqüentemente consumo maior de energia para sobrevivência (Melloni et al., 2001).

Maior número de propágulos foi registrado na área de caatinga nativa, em relação às áreas impactadas (Tabelas 3 e 4). Maior ciclagem de matéria orgânica (Tomar et al., 1983; Fernandes et al., 1997) e/ou presença de resíduos orgânicos propiciando maior relação C/N (Eira, 1992) está favorecendo a população e a atividade de microrganismos nesse ambiente. Nahas et al. (1994) verificaram que parâmetros químicos como pH, fósforo disponível e matéria orgânica estimularam a população de bactérias.

A atividade enzimática total do solo (FDA) foi influenciada pelo período de amostragem, com maiores valores nas áreas nativa e de interface durante o período chuvoso, quando comparado ao seco (Tabela 5). Nas demais áreas impactadas os valores da atividade enzimática não diferiram. Ao contrário do encontrado, Pereira et al. (2004) mencionaram que a atividade de hidrólise do FDA foi maior no período seco em solo do semi-árido cultivado com *Atriplex nummularia*. Swisher & Carroll (1980) demonstraram que esse parâmetro (hidrólise do FDA) é diretamente proporcional à população microbiana.

Em geral o FDA, o C da biomassa microbiana, a respiração basal e o NMP de fungos, bactérias e de actinomicetos foram maiores no solo de caatinga nativa preservada, possivelmente em virtude do maior fornecimento de matéria orgânica para a ciclagem de nutrientes em relação a área de rejeito. Em solos de mata nativa, as perdas de nutrientes são menores em relação aos impactados, em consequência da maior diversidade florística e microbiológica, melhor cobertura do solo durante o ano e maior imobilização no solo (Melloni et al., 2001).

A alteração produzida pela atividade gessreira reduziu a concentração de GFE nas áreas afetadas em relação ao encontrado na subárea de caatinga nativa, nos dois períodos de amostragem (Figura 1). A fração GFE é aquela recém depositada pelas hifas dos FMA no solo (Rillig, 2004). Portanto, o registro de menores valores de glomalina nas áreas impactadas

demonstra a influência negativa da atividade mineradora sobre os FMA, responsáveis pela síntese deste glicoconjugado. Elevados teores de Ca e a forte presença de SO_4 (Tabela 1) nas áreas impactadas podem ter contribuído para a baixa produção de GFE.

Maior concentração de GFE foi registrada no período chuvoso na área de caatinga nativa, enquanto na área AI ocorreu o inverso. Na área nativa, onde as condições ambientais são mais adequadas, o período chuvoso propiciou a formação de novas raízes, necessárias para maior proliferação de FMA e, conseqüentemente, maior concentração de GFE no solo. No período seco, as espécies de FMA presentes na área AI, cuja estrutura do solo está comprometida pela atividade gesseira, utilizaram estratégias de sobrevivência (persistência), aumentando o número de propágulos no solo, como mecanismo de defesa às condições adversas e propiciando aumento da GFE no solo. Hart et al. (2001) sugeriram que os FMA utilizam duas estratégias (colonização e persistência) para sobreviver em um ambiente. No primeiro caso se enquadram as espécies mais hábeis em colonizar novos hospedeiros e no segundo, as que conseguem permanecer no sistema (solo/raiz) mesmo sob condições adversas.

Não houve diferença significativa considerando os períodos de amostragem nas demais subáreas (AM e AR) (Figura 1). Diferenças no número de propágulos infectivos e de esporos de FMA em função do período da amostragem (seco ou chuvoso) têm sido registradas em áreas de caatinga nativa (Souza et al., 2003).

Maior produção de glomalina total (GT) ocorreu no período chuvoso em relação ao seco (3,4 e 2,7 mg glomalina g^{-1} de agregado, respectivamente) na área de caatinga nativa, quando comparada com as demais áreas estudadas, que não diferiram entre si (Figura 2). As baixas estimativas na produção de GT nas áreas impactadas (AI, AM e AR) sugerem que a estrutura do solo foi comprometida pela atividade gesseira. Possivelmente o que foi extraído

representa depósitos anteriores na área nativa, pois a glomalina pode permanecer no solo por até 42 anos (Rillig et al., 2001).

O impacto antrópico representado pela exploração gesseira provavelmente prejudicou a produção de micélio externo, responsável pela síntese de glomalina. Em áreas preservadas consegue-se extrair >60 mg de glomalina total/g de solo (Rillig et al., 2001). No presente estudo os valores foram comparativamente menores (Figuras 1 e 2). Por outro lado, na área nativa a produção de glomalina ($\pm 4,5$ mg glomalina total g⁻¹ solo seco) foi superior ao referido para outros solos de regiões semi-áridas (Bird et al., 2002; Silva, 2006).

De modo similar ao obtido por Rillig et al. (2003), foi registrada relação linear negativa entre pH do solo e as frações de glomalina (Tabela 6), enquanto o C foi positivamente relacionado, como registrado em outras pesquisas (Bird et al., 2002; Wuest et al., 2005). Por outro lado, os teores de P, Ca e Mg no solo foram negativamente relacionados com a produção de glomalina, como referido também por Lovelock et al. (2004). A relação linear negativa entre os teores de Na e a produção de GFE (Tabela 6) indica que este elemento pode afetar a atividade dos FMA, considerando que a presença de sais de sódio no solo influencia a simbiose micorrízica arbuscular (Maia & Yano-Melo, 2005).

A relação linear positiva entre as frações de glomalina e os teores de Fe no solo (Tabela 6) traduz a importância deste elemento para produção da proteína, considerando que esta pode apresentar até 8% de ferro na sua estrutura (Wright & Upadhyaya, 1998).

Concordando com Harner *et al.* (2005) a alta taxa respiratória (Tabela 2) e as maiores concentrações de glomalina facilmente extraível e total (Figuras 1 e 2) observadas na área de caatinga preservada, indicam estado de equilíbrio deste ecossistema e possível habilidade da microbiota heterotrófica aeróbica em utilizar a porção glicídica desta proteína nos processos oxidativos.

Conclusões

O impacto ambiental por atividade gesseira reduz o número de fungos e bactérias, a atividade e biomassa microbianas e a produção de glomalina por FMA, em comparação com a área nativa, que apresenta maior atividade biológica. Confirma-se a possibilidade da utilização da fração facilmente extraível de glomalina como indicadora da qualidade do solo, considerando que apontou diferenças entre os solos da área de caatinga preservada e das áreas impactadas. A sazonalidade tem influência na concentração da glomalina no solo com maiores registros durante o período chuvoso. São necessários novos estudos sobre a glomalina em solos de áreas de extração de gipsita para comparação com os resultados apresentados.

Agradecimentos

À Capes e ao CNPq, pelas bolsas concedidas respectivamente a A.C.E.S. Mergulhão (PG), L.C. Maia (pesq.), H.A. Burity (pesq.) e a F.S.B Silva (PG). A Cynthia Costa, Graziella Gattai e aos alunos de Iniciação Científica Danielle Silva e Thiago Moraes, pela ajuda nas análises.

Referências bibliográficas

- Alvarenga, M.I.N., Siqueira, J.O., Davide, A.C., 1992. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de cerrado com diferentes usos. **Ciência e Agrotecnologia** 23 (3): 617-625.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry** 10: 215-221.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1989. Ratio of microbial biomass carbon in arable soils. **Soil Biology and Biochemistry** 21 (4): 471-479.
- Andrade, S.A.L., Silveira, A.P.D., 2004. Biomassa e atividade microbiana do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (12): 1191-1198.

- Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaner, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L., Cortassa, S., 2001. I-Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in na agricultural soil. **Applied Soil Ecology** 18: 239-254.
- Bird, S.B., Herrick, J.E., Wander, M.M., Wright, S.F., 2002. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. **Environmental Pollution** 116: 445-455.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Cavalcanti, A.C., Lopes, O.F., 1994. **Condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe e viabilidade de produção sustentável de culturas**. Brasília: EMBRAPA - SPI, 42p.
- Cochran, W.G., 1950. **Biometrics**. 6 : 105-116.
- D'andréa, A.F., Silva, M.L.N., Curi, N., Siqueira, J.O., Carneiro, M.A.C., 2002. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no Sul do Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 26 (4): 913-923.
- Eira, A.F., 1992. Solubilização microbiana de fosfatos. In: Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M., Neves, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, p.243-255.
- Fernandes, L.A., Siqueira, J.O., Aquino Guedes, G.A. Curi, N., 1970. Propriedades químicas e bioquímicas de solos sob vegetação de mata e campo cerrado adjacentes. **Ciência e Agrotecnologia** 21(1): 58-70.
- Garcia, M.R.L., Mello, L.M.M., Cassiolato, A.M.R., 2004. Variáveis microbiológicas e produtividade do feijoeiro sob diferentes manejos do solo e calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (10): 1021-1026.
- Gianfreda, L., Bollag, J.M., 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. **Soil Biochemistry** 9: 123-193.
- Grisi, B.M., 1997. Temperature increase and its effect on microbial biomass and activity of tropical and temperate soils. **Revista de Microbiologia** 28: 5-10.
- Harner, M.J., Ramsey, P.W., Rillig, M.C., 2005. Protein accumulation and distribution in foodplain soils and river foam. **Ecology Letters** 7: 829-836.
- Insam, H., Hutchinson, T.C., Reber, H.H., 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biology and Biochemistry** 29: 691-694.

- Jahnel, M.C., Cardoso, J.B.N., Dias, C.T.S., 1999. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 23: 553-559.
- Jordan, D., Kremer, R.J., Bergfield, W.A., Kim, K.Y., Cacio, V.N., 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. **Biology and Fertility of Soils** 19 (4): 297-302.
- Lovelock, C.E., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphae growth: an example from a tropical rain forest soil. **Soil Biology and Biochemistry** 36: 1009-1012.
- Maia, L.C., Yano-Melo, A.M., 2005. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils. In: Mehrotra V.S. (ed), **Mycorrhiza: Role and Applications**. Allied Publishers, New Delhi. pp. 282-302.
- Melloni, R., Pereira, E.G., Trannin, I.C.B., Santos, D.R., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2001. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no Sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia** 25 (1): 7-13.
- Nahas, E., Centurion, J.F., Assis, L.C., 1994. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 18 (1): 49-53.
- Ohya, H., Fujiwara, S., Komai, Y., Yamaguchi, M., 1998. Microbial biomass and activity in urban soils contaminated with Zn and Pb. **Biology and Fertility of Soils** 6: 9-13.
- Parkin, T.B., Doran, J.W., Franco-Vizcaino, E., 1996. Field and laboratory tests of soil respiration. In: Doran, J.W., Jones, A.J. **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, p.231-245.
- Pereira, S.V., Martinez, C.R., Porto, E.R., Oliveira, B.R.B., Maia, L.C., 2004. Atividade microbiana em solo do semi-árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39 (8): 757-762.
- Rillig, M.C., 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science** 28 (4): 355-363.
- Rillig, M.C., Ramsey, P.W., Morris, S., Paul, E.A., 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. **Plant and Soil** 253 (2): 293-299.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V.T., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. **Plant and Soil** 238: 325-333.

- Rillig, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F., Torn, M.S., 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil** 233: 167-177.
- Šantrúcková, H., Straškraba, M., 1991. On the relationship between specific respiration activity and microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry** 23 (6): 525-532.
- Sarig, S., Steinberger, Y., 1994. Microbial biomass response to seasonal fluctuation in soil salinity under the canopy of desert halophytes. **Soil Biology and Biochemistry** 26: 1405-1408.
- Silva, F.S.B., 2006. **Fase assimiobótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos**. Tese Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 291p.
- Silveira, R.B., Melloni, R., Melloni, E.G.P., 2006. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas em Itajubá/MG. **Cerne** 12 (1): 48-55.
- Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Grisi, B.M., Hungria, M., Araujo, R.S., 1994. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. EMBRAPA, Brasília: EMBRAPA-SPI, 142 p.
- Souza, R.G., Maia, L.C., Sales, M.F., Trufem, S.F.B., 2003. 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** 26 (1): 49-60.
- Swisher, R., Carrol, G.C., 1980. Fluorescein diacetate hydrolisis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology** 6: 217-226.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry** 34: 387-401.
- Tomar, N.K., Khanna, S.S., Gupta, A.P., 1983. Evaluation of Mussorie rock phosphate for wheat. **Indian Journal of Agricultural Science** 53 (5): 330-336.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry** 19: 703-707.
- Wardle, D.A., 1992. A comparative assessment of factors with influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biology Review** 67: 321-358.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. A., 1998. Survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** 198: 97-107.

Wright, S.F., Nichols, K.A., 2002. Glomalin: hiding place for a third of the world's stored soil carbon.

Agriculture Research 50: 4-7.

Wuest, S.B., Caesar-Tonthat, T.C., Wright, S.F., Williams, J.D., 2005. Organic matter addition, N and residue burning effects on infiltration biological and physical properties of an intensively tilled silt-loam soil. **Soil**

and Tillage Research 84: 154-167.

Zonta, E.P., Machado, A.A., Silveira Júnior, P., 1984. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**

(SANEST). Pelotas: Departamento de Matemática e Estatística, 151p.

Tabela 1 Características químicas e físicas do solo coletado nos períodos de amostragem (chuvoso e seco), em quatro subáreas da mineradora de gipsita, em Araripina, PE

Subáreas	pH	P	C	Ca	Mg	K	SO ₄	CO ₃	HCO ₃	Análise Textural (%)			MO	Fe	Dap	Dr	UR	PMP		
	H ₂ O	mg.dm ⁻³	g.Kg ⁻¹	-----	cmolc.dm ⁻³	-----	-----	meq.L ⁻¹	-----	Areia	Argila	Silte	(%)	mg/dm ³	---g/cm ³ ---	(%)	(%)	15	Atm	Classe textural
Período Chuvoso																				
AN	6,28	5	1,16	5,90	1,30	0,43	Presença	0,20	1,80	67	8	25	2,00	12,73	1,44	2,50	1,25	4,47		Franco arenoso
AI	5,72	11	1,27	20,00	9,30	0,46	Presença	0,20	0,80	26	45	29	2,19	52,50	1,21	2,55	6,90	20,51		Argiloso
AM	7,64	54	1,34	40,50	6,25	0,19	Forte Presença	0,40	1,60	22	39	39	2,31	0,93	1,20	2,31	8,65	24,88		Franco argiloso
AR	7,65	42	0,72	68,00	9,75	0,34	Forte Presença	0,20	1,20	27	6	67	1,24	0,41	1,28	2,58	7,00	18,14		Franco siltoso
Período Seco																				
AN	6,43	8	1,20	6,20	1,15	0,36	Presença	0,80	5,60	74	8	18	2,07	13,73	1,34	2,59	0,40	4,67		Franco arenoso
AI	5,72	14	1,30	36,25	11,25	0,62	Forte Presença	0,00	0,80	14	59	27	2,24	79,80	1,13	2,44	8,60	30,65		Argiloso
AM	7,52	161	1,33	45,40	3,10	0,40	Forte Presença	0,00	1,60	22	47	31	2,29	0,71	1,10	2,36	6,80	26,93		Franco argiloso
AR	7,56	32	0,65	61,75	1,65	0,46	Forte Presença	0,20	2,40	37	28	35	1,12	0,23	1,22	2,46	6,55	8,29		Franco siltoso

¹(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana e respiração basal em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE, independentemente do período de amostragem

ÁREAS*	C-BIOMASSA MICROBIANA ¹ ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco)**	RESPIRAÇÃO BASAL ² ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo seco dia ⁻¹)
AN	311,91 a	30,50 a
AI	285,24 a	23,19 b
AM	226,28 ab	20,24 c
AR	184,38 b	17,82 c

¹CV(%) = 14,57 ²CV(%) = 9,51

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=5$). **Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{x}$. *(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 3. Número mais provável de propágulos de fungos em amostras de solos de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, em dois períodos de coleta

ÁREAS ³	PERÍODO CHUVOSO ¹ (U.F.C g^{-1} solo) ²	PERÍODO SECO ¹
AN	$1,2 \times 10^5$ bA	$5,9 \times 10^5$ aA
AI	$0,7 \times 10^5$ aA	0,0 bB
AM	$0,3 \times 10^5$ aA	0,0 aB
AR	$0,5 \times 10^5$ aA	$0,4 \times 10^5$ aB

CV(%) = 19

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, ou maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=3$). ²Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$. ³(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 4. Número mais provável de propágulos de bactérias e actinomicetos em amostras de solos de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, independentemente do período de coleta

ÁREAS ³	BACTÉRIAS ¹ (U.F.C g^{-1} solo) ²	ACTINOMICETOS ¹
AN	$3,1 \times 10^5$ a	$25,8 \times 10^5$ a
AI	$0,8 \times 10^5$ b	$1,4 \times 10^5$ b
AM	$0,7 \times 10^5$ b	$0,3 \times 10^5$ b
AR	$0,4 \times 10^5$ b	$0,3 \times 10^5$ b

CV(%) = 21

CV(%) = 35

¹Médias seguidas da mesma letra, minúscula, na coluna, não difere significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=3$). ²Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$. ³(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 5. Atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por mineração de gipsita, Araripina/PE

ÁREAS**	PERÍODO CHUVOSO	PERÍODO SECO
	$\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1*}$	
AN	39,96 aA	29,98 bA
AI	46,59 aA	7,01 bB
AM	26,34 aB	25,89 aA
AR	1,00 aC	1,00 aC
CV(%) 12,93		

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha ou em maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=5$). Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$. **(AN) = Caatinga nativa preservada; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito e (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração.

Tabela 6. Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) entre as variáveis estudadas ($P < 0,05$)

	GFE	GT	Fe	C	P	pH	Ca	Mg	Na
GFE	-								
GT	0,60	-							
Fe	0,60	0,43	-						
C	0,36	ns	ns	-					
P	-0,43	-0,37	-0,39	ns	-				
pH	-0,51	-0,44	-0,56	-0,48	0,58	-			
Ca	-0,71	-0,55	-0,57	-0,44	0,48	0,68	-		
Mg	-0,40	-0,37	ns	ns	ns	ns	ns	-	
Na	-0,47	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-

ns= não significativo; GFE = proteína do solo relacionada à glomalina (fração facilmente extraível); GT = proteína do solo relacionada à glomalina (fração total).

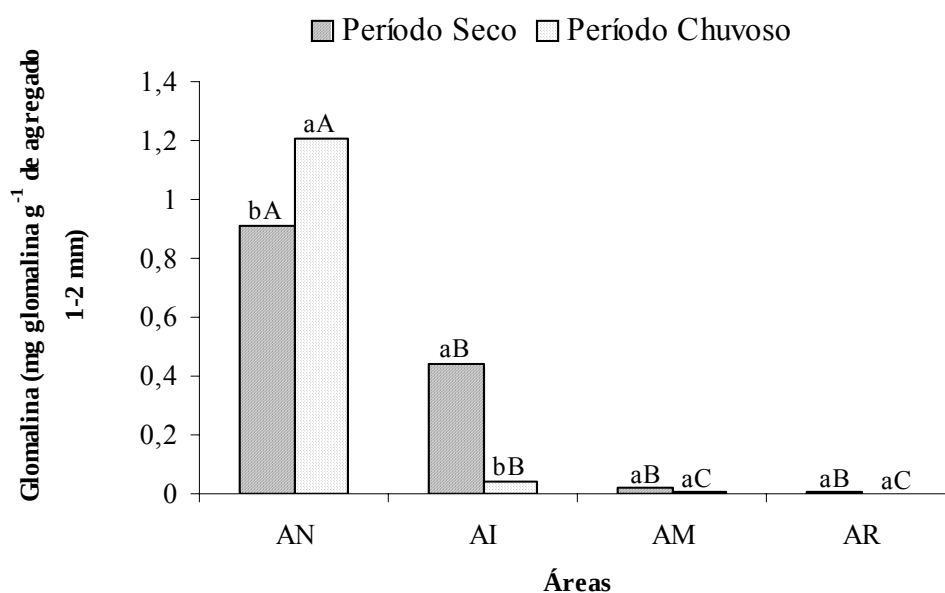


Figura 1. Glomalina facilmente extraível (GFE) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por atividade gesseira em Araripina, PE. (AN) = caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre as áreas em cada período e minúscula, entre os períodos de coleta em cada área, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

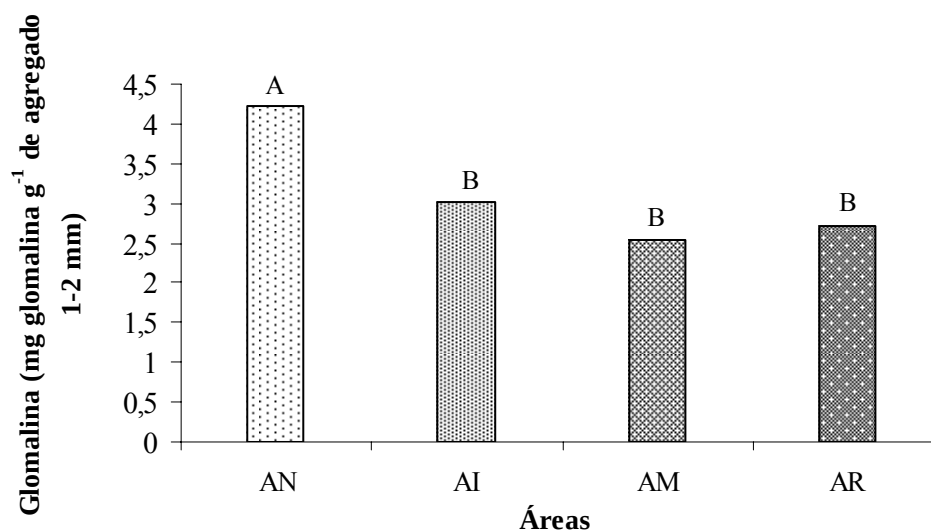


Figura 2. Glomalina total (GT) em amostras de solo de áreas de caatinga nativa e impactada por atividade gesseira em Araripina, PE, independentemente do período de coleta. (AN) = caatinga nativa preservada; (AI) = interface entre o depósito de rejeito e uma área de caatinga degradada pela mineração; (AM) = arredores da mina; (AR) = rejeito. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre as áreas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias originais, porém para a análise de variância foram transformadas em $\sqrt{(X+0,5)}$

CAPÍTULO IV

AMPLIFIED rDNA RESTRICTION ANALYSIS (ARDRA) FOR IDENTIFICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN SEMIARID SOILS

Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for identification of arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid soils

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão^{1*}, Márcia Vanusa da Silva², Hélio Almeida Burity¹, Leonor Costa Maia³

¹*Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Laboratórios de Genoma e Biologia do Solo, Av. General San Martin, 1371, Bongi, 50761-000, Recife-PE, *Email: adalia@ipa.br.* ²*Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Departamento de Biologia/Área Genética, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n Dois irmãos 52171-900, Recife-PE.* ³*Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Micologia, Laboratório de Micorriza, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE.*

ABSTRACT

The ARDRA technique consists of the amplification of rDNA regions like the ITS and digestion with restriction enzymes. It has been used in studies of microbial diversity associated to different soils as it is fast and useful to evaluate differences within phylogenetic groups. Thus, the ARDRA technique was applied to distinguish AMF species from a impacted semiarid soil. The ITS region, amplified with the primers ITS1 and ITS4, of AMF spores was analysed. The products of amplification were digested with the restriction enzymes HinfI, RsaI, MboI, AluI e TaqI. The band patterns obtained by restriction digestion, except for the AluI, allowed the distinction at the molecular level, of the following AMF species: Paraglomus occultum, Glomus mosseae, Glomus intraradices and Glomus etunicatum. The results obtained with the application of ARDRA, especially when TaqI is employed, showed that this technique has a potential to be used as a maker to differentiate the studied AMF species.

Key words: Impacted areas, molecular techniques, restriction enzymes, ITS.

INTRODUCTION

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are distributed in most terrestrial ecosystems, representing the widest association between plants and fungi found in nature. Mycorrhized plants present higher capacity of nutrient uptake, and resistance to biotic and abiotic stresses than non mycorrhized plants (Souza and Silva, 1996). The identification and characterization of these fungi are the first step for studying the association. Many molecular techniques have been used to study the AMF, improving the knowledge of phylogenetic, cytogenetic, functional and ecological aspects, and the selection of one or more techniques is a function of the research objective (Salles and Souza, 1998). Analysis of restriction fragments of PCR amplified DNA constitute a powerful tool that allow the detection of variability from small amounts of DNA and has been applied successfully for identification of AMF (Salles and Souza, 1998). The restriction analysis of the amplified ribosomal DNA (ARDRA) is a technique of the RFLP type (restriction fragment length polymorphism), and is based on the degree of conservation of the restriction sites of the rDNA (nuclear ribosomal DNA unit) that reflect phylogenetic patterns. The ARDRA is very useful for a rapid analysis of fungal diversity in any environment (Grifoni et al. 1995). The fragment of rDNA to be amplified for analysis of intra-specific diversity or between groups of isolates with high phylogenetic affinity should include the internally transcribed spacers (ITS1, ITS2), a region that presents high variability in both, the composition of bases and in the fragment size (Rosado et al. 1999). A number of studies showed the utility of this technique to differentiate bacterial strains and fungal isolates (Azevedo, 1998; Laguerre et al. 1996; Lana, 2004; Martins, 2005; Oliveira and Costa, 2002). Semiarid soils have a high diversity of plant and fungi (AMF) but identification of AMF is based on morphological character of spores is difficult, mainly when spores are in low amounts as occurs in impacted areas, thus alternative techniques should be employed to allow identification and further studies with AMF that can be useful for helping the establishment of plants and revegetation of impacted semiarid areas. The aims of this study are to differentiate AMF species with high phylogenetic affinity by comparison of their ITS

restriction patterns (ITS-ARDRA) and to test the usefulness of the technique for studies on AMF diversity.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples were collected from an impacted gypsite mining area in Araripina, Pernambuco State Brazil. Spores of AMF present in the samples were multiplied in successive cycles of greenhouse pot culturing in soil with sorghum and peanut as hosts. After three months, spores of AMF were extracted from soil by wet sieving (Gerdemann and Nicolson 1963) and sucrose centrifugation (Jenkins 1964) and selected on a stereomicroscope. Similar spores were grouped, mounted in glass slides with PVLG or Melzer reagent + PVLG (1:1) and observed at the light microscope for identification at the species level (Schenck and Pérez, 1990; <http://invam.caf.wvu.edu>). After identifying, spores of four species (*Paraglomus occultum* Morton & Redecker, *Glomus mosseae* Gerdemann & Trappe, *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann and *Glomus intraradices* Schenck & Smith) were separated and the DNA extracted using the method described by Lanfranco et al. (2001). Approximately 150 to 200 spores of each AMF species were sonicated (3 to 4 cycles of 30 s), broken with the aid of a micropestle in 50 µL of 1X reaction buffer (LABTRAD do Brasil LTDA) with 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, incubated at 95 °C for 15 min and centrifuged at 10.000 g for 5 minutes. The supernatant was stored at -20 °C. The PCR reaction consisted of 3 µL of total DNA added to the mix to a final volume of 25 µL, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTPs, 25 ng of each primer ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al. 1990) and 2 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen[®]). The amplification reactions were carried out in thermocycler M. J. Research, Inc. (USA) PCR, model PTC 100, using a program with initial denaturation at 95 °C 3 min, forty cycles of 95 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. After the thermal cycling, an aliquot of the PCR products were digested with the restriction enzymes *Mbo*I, *Hinf*I, *Rsa*I, *Taq*I e *Alu*I, according to the recommendation of the manufacturer (Invitrogen[®]). The restriction products were

separated by eletroforese, at 3V/cm for 2 h, in 1.5% agarose gel, in TBE buffer and stained with Sybr Gold. The banding patterns generated with the restriction of the ITS region were observed and photographed in a photodocumentation system under UV light. The fragment size marker used was the 100 pb DNA Ladder (Invitrogen[®]).

RESULTS AND DISCUSSION

Using the primers ITS1 and ITS4, the amplified product of the locus ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA presented fragments of about 600 pb for *G. mosseae* and *G. etunicatum* and of 700 pb for *P. occultum* and *G. intraradices* (Figure 1). Similar results were observed by Redecker et al. (1997), who mentioned that the amplification products generated for species of *Glomus* presented approximately 600 pb. The amplified products of the ITS1 and ITS2 regions from the rDNA, using the ITS1 e ITS4 primers also generated fragments of about 600 pb for *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Gigaspora decipiens* Hall & Abbott and *Scutellospora* sp. (Lanfranco et al. 1999). Our results showed two polymorphic patterns: one comprising *P. occultum* and *G. intraradices* and the other including the species *G. mosseae* and *G. etunicatum* (Figure 1). The amplification of the ITS region allowed the distinction, at the generic level, of three AMF species: *Scutellospora calospora* Walker & Sanders, *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe and *Glomus deserticola* Trappe; Bloss & Menge using the primers pairs ITS1/ITS2 and ITS1/ITS4, Harney et al. (1997) showed that the spores of these species had enough variation in the ITS region, allowing their genetic distinction in field samples. In our work the ITS1/ITS4 amplification products did not differentiate all the AMF at the species level, but digestion (200 to 900 pb) fragments was carried out with the restriction enzymes *HinfI*, *RsaI*, *TaqI*, *MboI*, that resolved the four AMF species (Figure 2 and 3). The restriction banding patterns showed 2 to 5 fragments per restriction enzyme, with 5 profile for the enzyme *HinfI*, 5 for *RsaI*, 6 for *MboI* and 12 for *TaqI* (Figure 2 and 3). No restriction site was observed for the enzyme *AluI*. Consequently, no variability among these four AMF species was detected with this enzyme (Figure 2). Conversely, the combination of the restriction patterns of the other enzymes allowed the molecular distinction of all AMF species, mainly the profiles obtained with endonuclease

TaqI. Using ARDRA, Oliveira and Costa (2002) were able to genetically differentiate isolates of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc f. sp. *phaseoli* (Burkholder) Snyder & Hansen and *F. solani* (App. & Wollenw.) Snyder & Hans f. sp. *glycines*. The analysis with the same technique allowed the distinction of 83 isolates of *Fusarium* spp. in 19 ARDRA patterns (or haplotypes), presenting a high diversity inside of each haplotype (Martins 2005). Lana (2004) compared the genetic variability of endophytic and pathogenic isolates of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer using ARDRA. The analysis of the restriction patterns of the amplified rDNA internally transcribed spacer allowed the differentiation of the strains at the intraspecific level due to the easily analyzable and reproducible banding patterns generated from ITS region. Different restriction patterns detected between species genetically confirm different species. However, if differences are not observed, the species may or may not be identical, considering that the obtention of distinct banding patterns depends on the presence of specific restriction sites for the enzyme used in the fragment analysis. The lack of restriction sites may have occurred with the species *P. occultum*, digested with the *HinfI*, *G. intraradices* and *G. etunicatum* digested with the *RsaI* and all AMF digested with the *AluI* (Fig.2). Redecker et al. (1997) also observed a lack of restriction sites for the *AluI* endonuclease in a great variety of *Glomus* species. The exception is *Glomus* sp. strain S328. Analysis of the ITS sequence of *G. mosseae* BEG12 (GenBank access n° X84232) referred by Sanders et al. (1995) confirmed the absence of the *AluI* site. The digestion of the ITS fragment with *TaqI* and *MboI* was effective for the inter and intraspecific separation of AMF, constituting an additional technique to study these fungi, and may be used to resolve controversies in the taxonomy of the group. The molecular markers are as important as the morphological and physiological methods. Molecular methods contribute to increase the knowledge of identity and variability of the AMF. The results confirm that the ARDRA technique, using the *TaqI* enzyme, has a potential for utilization as a marker to differentiate species of AMF with high phylogenetic affinity. This is important for ecological studies, mainly in areas with low number of AMF spores due to soil degradation.

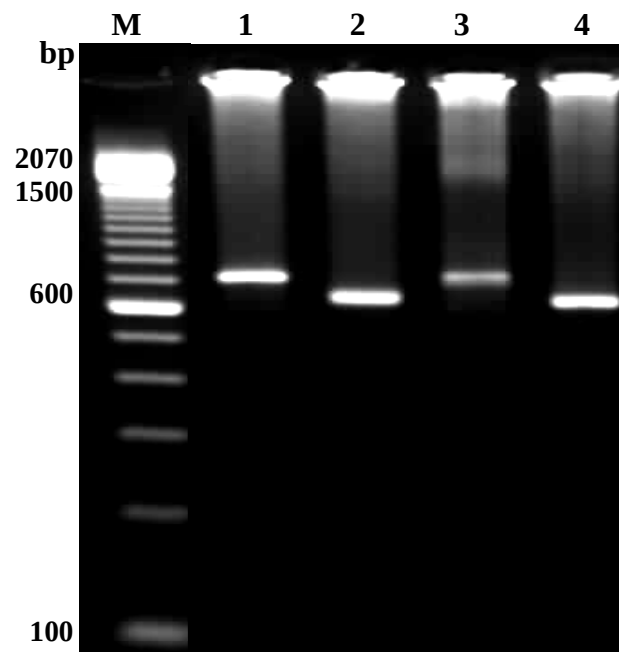


Figure 1. PCR amplification of the ITS regions of AMF isolates using primers ITS1/ITS4. M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*

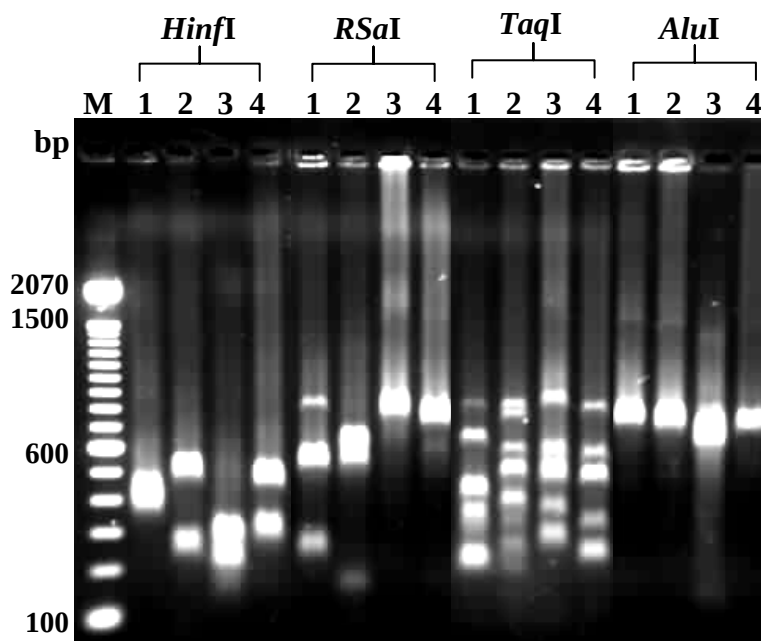


Figure 2. ARDRA banding patterns of the ITS fragments amplified from AMF spores DNA. M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*

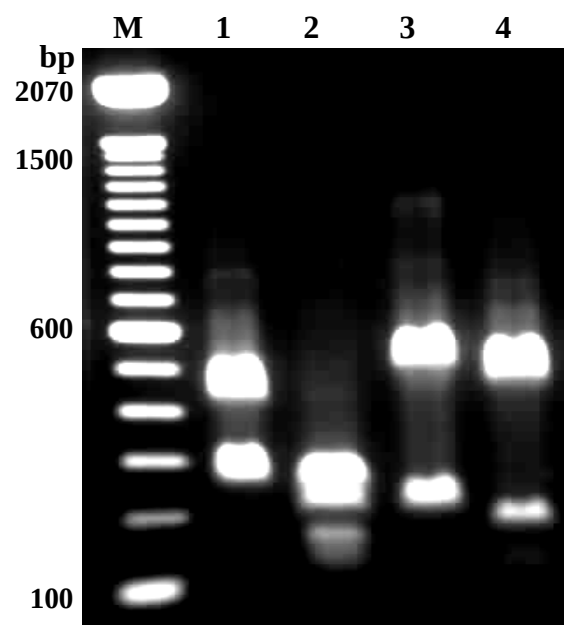


Figure 3. *MboI* restriction profile of the ITS fragments amplified from AMF spores DNA, M = 100 bp DNA Ladder, 1 = *Paraglomus occultum*, 2 = *Glomus mosseae*, 3 = *Glomus intraradices*, 4 = *Glomus etunicatum*

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Dra. Elaine Malosso and Dra. Neiva Tinti de Oliveira for the helpful suggestions. The authors are indebted to Capes and CNPq for financial support: A.C.E.S. Mergulhão (PhD scholarship), L.C. Maia, H.A. Burity and M.V. Silva (research grant).

RESUMO

Solos de regiões semi-áridas têm grande diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), mas a identificação de espécies obtidas de amostras de campo é difícil quando o número de esporos é baixo, como ocorre em áreas impactadas. Os FMA são biotróficos obrigatórios amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres, e a sua identificação é dificultada principalmente porque o processo é baseado nos caracteres morfológicos dos esporos. Algumas técnicas moleculares têm sido testadas para ajudar na identificação de FMA. Estudos moleculares envolvendo o cluster gênico do rDNA têm facilitado a identificação de fungos e contribuído para expandir o conhecimento da diversidade microbiana. A técnica ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado), que consiste na amplificação e posterior digestão da região ITS (espaços internos transcritos) do rDNA com enzimas de restrição, tem sido utilizada para estudos de diversidade microbiana associada a diferentes solos, pois é rápida e útil para avaliar diferenças em grupos filogenéticos. Entretanto, para os FMA esta técnica não tem sido comumente aplicada. A ARDRA foi utilizada para distinguir espécies de FMA obtidas de solos impactados da região semi-árida. A região ITS, amplificada com os primers ITS1 e ITS4 de esporos de FMA foi analisada. Os produtos de amplificação foram digeridos com as enzimas *Hinf*I, *Rsa*I, *Mbo*I, *Alu*I e *Taq*I. Os padrões de bandas obtidos pela digestão com as enzimas, exceto para a *Alu*I, permitiram a distinção em nível molecular das seguintes espécies de FMA: *Paraglomus occultum*, *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum*. Os resultados obtidos utilizando a técnica ARDRA, especialmente com a enzima *Taq*I, mostraram potencial para utilização como marcador capaz de diferenciar as espécies estudadas, sendo recomendadas investigações com espécies de outros gêneros de FMA.

REFERENCES

- Azevedo, M.S. (1998), Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Gerdemann, J.W., and Nicolson, T.H. (1963), Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.*, **46**:235-244.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Seri, C., Fancelli, S., Fani, R. (1995), Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol Lett.*, **127**: 85-91.
- Harney, S.K., Edwards, F.S., Allen, M.F. (1997), Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. *Mycologia*, **89** (4): 547-550.
- Jenkins, W.R. (1964), A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis Rep*, **48**:692.
- Lana T.G. (2004), Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M., Charnay, M., Louvrier, P., Mazurier, S., Rigottier-Gois, L., Amarger, N. (1996), Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium irguminosarum* and ITS different biovars. *Appl Environ Microb.*, **62**: 2029-2036.
- Lanfranco, L., Delpero, M., Bonfante, P. (1999), Intraspore variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* *Mol Ecol.*, **8**: 37-45.
- Lanfranco, L., Bianciotto, V., Lumini, E., Souza, M., Morton, J.B., Bonfante, P.A. (2001), Combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytol.*, **152**: 169-179.
- Martins, M.K. (2005), Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Oliveira, V.C., and Costa, J.L.S. (2002), Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. *Fitopatol Bras.*, **27** (6): 631-634.

- Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C., Werner, D. (1997), Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl Environ Microb.*, **63** (5): 1756-1761.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Mendonça-Hagler, L.C. (1999), A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. *In: Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*, ed. J.O. Siqueira, F.M.S. Moreira, A.S. Lopes, L.R.G. Guilherme, V. Faquin, A.E. Frutini-Neto, J.G. Carvalho. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, pp.429-228.
- Salles, J. F., and Souza, F.A. (1998), Revisões em micorriza I: Técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares. Embrapa Agrobiologia- CNPAB, Seropédica. Série Documentos, 68.
- Sanders, J.R., Alt, M., Groope, K., Boller, T., Wiemken, A. (1995), Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.*, **130** (3): 419-427.
- Schenck, N.C., Pérez, Y. (1990), Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3 ed. Synergistic Publ., Gainesville.
- Souza, F.A., and Silva, E.M.R. (1996), Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. *In: Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*, ed. J.O. Siqueira. UFLA/DCS e DCF, Lavras, pp.255-290.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR Protocols. A Guide to Methods and Application*, ed. M.A. Innis, D.H. Gebfau, J.J. Sminsky, J.J. White. Academic Press: San Diego, pp. 315-322.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Glomus intraradices e *Paraglomus occultum* toleram bem as condições edáficas das áreas estudadas, podendo ser testadas em áreas similares, afetadas por mineração de gesso;

As espécies nativas *Zyzyphus joazeiro*, *Tagetes minuta*, *Alternanthera tenella* e *Ruellia paniculata* apresentam potencial para reabilitação das áreas afetadas por mineração de gesso;

Níveis elevados de P, Mg, Ca e o alto pH encontrado nas áreas afetadas pela atividade gesseira podem atuar negativamente sobre o número de esporos e a diversidade de FMA e de plantas;

A atividade antrópica exercida nas áreas em estudo teve impacto negativo sobre a microbiota do solo, reduzindo o número de todos os grupos de microrganismos (bactérias, actinomicetos e fungos), atividade e biomassa microbianas;

A fração de glomalina facilmente extraível pode ser utilizada como indicador bioquímico da qualidade do solo, considerando que apontou diferenças entre os solos de caatinga nativa preservada e das impactadas pela mineração;

A produção de glomalina facilmente extraível variou conforme o período de amostragem;

A técnica ARDRA-ITS apresenta bom potencial como marcador para diferenciar espécies de *Glomus* e *Paraglomus*, sendo recomendadas investigações com espécies de outros gêneros de FMA.

Anexos



Mycorrhiza

Managing editors: V. Gianinazzi-Pearson; R. Molina

ISSN: 0940-6360 (print version)

ISSN: 1432-1890 (electronic version)

Journal no. 572

Springer Berlin Heidelberg

Instructions for Authors

Manuscript submission

Authors should submit their articles to "Mycorrhiza" online to facilitate even quicker and more efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing time and shortens overall publication time.

Please log directly onto the link below and upload your manuscript following the instructions given on screen.

Editorial Offices

Manuscripts on arbuscular mycorrhiza/ endomycorrhiza:

Dr. Vivienne Gianinazzi-Pearson

Directeur de Recherche CNRS

Managing Editor for Mycorrhiza

UMR INRA 1088/ CNRS 5184/ U. Bourgogne Plante-Microbe-Environnement

INRA-CMSE

BP 86510

21065 Dijon cédex, France

Fax: (+33) (0) 380 69 37 53

e-mail: gianina@epoisses.inra.fr

Manuscripts on ectomycorrhiza/ other mycorrhiza:

Dr. Randy Molina

Managing Editor for Mycorrhiza

625 SE 14th Court

Gresham, Oregon 97080

USA

e-mail: rmolina@fs.fed.us

Legal requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract, or as part of a published lecture, or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

The "Copyright Transfer Statement" has to be signed and faxed to the publisher together with the corrected proofs (see below) with which it will be provided by the publisher shortly after the manuscript has been accepted for publication.

Manuscript preparation

■ All manuscripts are subject to peer review and copy editing.

- Short notes must not exceed 6 manuscript pages (ca. 26 880 characters, plus 1 table, 1 illustration) and should be accompanied by a brief explanation of their novelty and significance.
- Manuscripts must be written in English and should be typed in double-line spacing throughout with at least 2.5 cm (1 inch) margins.
- Use a normal, plain font (e.g., Times New Roman) for text.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- For indents use tab stops or other commands, not the space bar.
- Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.
- Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.
- Footnotes to the title of the paper appear without a symbol; those to the text are numbered consecutively. Footnotes to tables should be with lower-case letters, except those referring to statistical values, where asterisks are used.
- Statistical analyses of data should be given, with the test of significance used and the estimate of probability.
- Genus and species names should be in italics. Authorities must be given for all cultures, strains or isolates used in the published work and these should be identified by a culture collection number for use by others.
- Citations and References
- Literature citations in the text should indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references.

*Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Example:

Donnelly DP, Boddy L, Leake JR (2004) Development, persistence and regeneration of foraging ectomycorrhizal mycelial systems in soil microcosms. *Mycorrhiza* 14: 37-45

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Example:

Bohrer KE, Friesse CF, Amon JP (2004) Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza* DOI 10.1007/s00572-004-0292-7

*Single contributions in a book:

name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Example:

Noirot C (1992) Sexual castes and reproductive strategies in termites. In: Engels W (ed) *Social insects*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 5-35

*Book:

name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication

Example:

Varma A, Hock B (eds) (1999) *Mycorrhiza*. 2nd ed, Springer, Berlin Heidelberg New York

Please arrange your manuscript as follows:

- Title page
- Including name(s) of author(s), a concise and informative title, affiliation(s) of the author(s), e-

mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.

- Abstract
- Key words (up to 5)
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgement(s)
- References
- Tables
- Figure legends

Tables and figures

Tables must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text. They should have a title explaining any abbreviation used in that table.

Illustrations must be restricted to the minimum needed to clarify the text. All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case roman letters (a, b, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lower-case letters will still be used in the figure legends and citations.

The top of the figure, the title of the paper, the author's name, and the figure number should be marked lightly on the reverse side in soft pencil.

Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text. Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text.

- Line drawings
 - Inscriptions should be legible, with initial capital letters and appropriately scaled to the size of the drawing. Scanned line drawings should be digitized with a resolution of 800 dpi relative to the final figure size.
- Computer drawings
 - Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings (minimum resolution of 300 dpi). Computer-drawn curves and lines must be smooth. Lettering must be of high quality; Helvetica is the preferred font. Lettering fonts must be consistent within and among all figures.
- Halftone illustrations (black and white and color)
 - Magnification should be indicated by scale bars. For scanned halftone illustrations, a resolution of 300 dpi is usually sufficient, TIFF is the preferred file format.
- Color illustrations
 - Color illustrations will always be published in color in the online version. In print, however, they will only appear in color if the author agrees to make a contribution of Euro 950/US \$ 1,150 (plus VAT) per article. Otherwise the figures will be printed in black and white. Save color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.
- Vector graphics
 - Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size. EPS is the preferred file format. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure.
- Size of figures
 - The figures, including legends, should either match the column width (86 mm) or the print area of 176 x 236 mm. In case reduction is absolutely necessary, please state the alternative scale desired. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

Electronic Supplementary Material

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is:

- submitted in electronic form together with the manuscript
- accepted after peer review
-

ESM may consist of:

- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format)
- information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (color and black & white), etc.

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the paper.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Offprints

Twenty-five offprints of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs.

Springer Open Choice

In addition to the traditional publication process, Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice (Springer's open access model). A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice upon acceptance of your manuscript, please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Hoehnea publica artigos originais, revisões e notas científicas em todas as áreas da Botânica e da Micologia (anatomia, biologia celular, biologia molecular, bioquímica, ecologia, filogenia, fisiologia, genética, morfologia, palinologia, taxonomia), em português, espanhol ou inglês. Trabalhos de revisão são aceitos, excepcionalmente, a critério do Corpo Editorial, não devendo se restringir a compilações bibliográficas, mas conter análise crítica. As notas científicas devem apresentar avanços técnicos ou científicos relevantes.

O artigo deve conter as informações estritamente necessárias para sua compreensão e estar rigorosamente dentro das normas da revista. Deve ser submetido em três vias impressas (original e duas cópias) para: Editor Responsável - Revista Hoehnea, Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.

Uma vez aceito para publicação, a versão final deve ser encaminhada em duas vias impressas e em disquete, gravado em "Rich Text Format" (.rtf). Serão fornecidas, gratuitamente, 25 separatas por trabalho publicado.

Preparo do original - utilizar Word for Windows versão 6.0 ou superior, fonte Times New Roman, tamanho 12, em espaço duplo, alinhando o texto pela margem esquerda, sem justificar. Usar papel branco, tamanho A4, com margens de 2 cm. As páginas devem ser numeradas e notas de rodapé evitadas. Não ultrapassar 100 laudas digitadas, incluindo tabelas e figuras. Notas científicas devem se limitar a três laudas.

Primeira página - deve conter o título em negrito e apenas com as iniciais maiúsculas, evitando níveis taxonômicos, que devem ser utilizados como palavras-chave; nome completo dos autores, com as iniciais maiúsculas e demais minúsculas; nome da instituição, endereço completo dos autores e endereço eletrônico do autor para correspondência devem ser colocados logo abaixo dos nomes dos autores, indicados por numerais sobrescritos; título resumido. Auxílios, bolsas e números de processos devem constar do item Agradecimentos.

Segunda página - deve conter ABSTRACT e RESUMO (ou RESUMEN), iniciando com o título na língua correspondente entre parentêses, em parágrafo único e sem tabulação, com até 150 palavras. Key words e Palavras-chave (ou Palabras clave), até quatro, separadas por vírgula e sem ponto final. Não utilizar como palavras-chaves aquelas que já constam do título.

Texto - iniciar em nova página. Os títulos de capítulos devem ser escritos em negrito, com letras maiúsculas e minúsculas, com os seguintes tópicos, quando aplicáveis: Introdução, Material e métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Literatura citada. Resultados e Discussão podem ser combinados. Nomes científicos devem ser grafados em itálico.

Citação de figuras e tabelas - devem ser referidas por extenso, numeradas em arábico e na ordem em que aparecem no texto. Em trabalhos de taxonomia, a citação de figuras dos táxons deve ser colocada na linha abaixo do táxon, como no exemplo:

Cordia sellowiana Cham., Linnaea 4: 479. 1829.

Figuras 7-8

Citação de literatura - usar o sistema autor-data, apenas com as iniciais maiúsculas; quando no mesmo conjunto de citações, seguir ordem cronológica;

quando dois autores, ligar os sobrenomes por &; quando mais de dois autores, mencionar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão *et al.*; para trabalhos publicados no mesmo ano por um autor ou pela mesma combinação de autores, usar letras logo após o ano de publicação (ex.: 1944a, b, etc.); não utilizar vírgula para separar autor do ano de publicação e sim para separar diferentes citações (ex.: Dyer & Lindsay 1996, Hamilton 1988); citar referências a resultados não publicados da seguinte forma: (Capelari, dados não publicados).

Citação de material de herbário - detalhar as citações de material de herbário de acordo com o seguinte modelo: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, data de coleta (ex.: 10-IX-1900), *coletor e número de coleta* (acrônimo do herbário). Quando há número de coletor, basta citar o acrônimo do herbário; quando não há número de coletor, citar o acrônimo do herbário seguido do número de herbário entre parênteses [ex.: (SP250874)].

Unidades de medida - utilizar abreviaturas sempre que possível; nas unidades compostas utilizar espaço e não barras para indicar divisão (ex.: mg dia⁻¹ ao invés de mg/dia, µg L⁻¹ ao invés de µg/L, deixando um espaço entre número e a unidade (ex.: 200 g; 50 m); colocar coordenadas geográficas sem espaçamento entre os números (ex.: 23°46'S e 46°18'W).

Literatura citada - digitar os autores em negrito, com iniciais maiúsculas e demais minúsculas; seguir ordem alfabética dos autores; para o mesmo autor ou mesma combinação de autores, seguir ordem cronológica; citar títulos de periódicos por extenso; evitar citar dissertações e teses; não citar resumos de congressos, monografias de cursos e artigos no prelo. Seguir os exemplos:

- Benjamin, L.** 1847. Utriculariae. *In*: C.F.P. Martius (ed.). Flora Brasiliensis. Typographia Regia, Monachii, v. 10, pp. 229-256, t. 20-22.
- Cronquist, A.** 1988. An integrated system of classification of flowering plants. 2 ed. New York Botanical Garden, New York, 1262 p.
- Ettl, H.** 1983. Chlorophyta, I. Phytomonadina. *In*: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süswasser Flora von Mitteleuropa, Band 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 809 p.
- Giannotti, E. & Leitão Filho, H.F.** 1992. Composição florística do cerrado da Estação Experimental de Itirapina (SP). *In*: R.R. Sharif (ed.). Anais do 8º Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Campinas, pp. 21-25.
- Heywood, V.H.** 1971. The Leguminosae - a systematic review. *In*: J.B. Harbone, D. Boulter & B.L. Turner (eds.). Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London, pp. 1-29.
- Trufem, S.F.B.** 1988. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 358 p.
- Veasey, E.A. & Martins, P.S.** 1991. Variability in seed dormancy and germination potencial in *Desmidium* Desv. (Leguminosae). Revista de Genética 14: 527-54

Tabelas - utilizar os recursos de criação de tabela do Word for Windows, fazendo cada tabela em página separada; não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e para fechar a tabela. Iniciar por "Tabela" e numeração em arábico, na ordem em que aparece no texto (ex.: Tabela 1., Tabela 2.), seguidas por título breve e objetivo. Evitar abreviaturas (exceto para unidades) mas, se inevitável, acrescentar seu significado na legenda. Em tabelas que ocupem mais de uma página, acrescentar nas páginas seguintes, no canto superior esquerdo "Tabela 1. (cont.)", repetindo o cabeçalho, mas não o título.

Figuras - enviar o original das figuras acompanhado de três cópias; colocar cada figura ou conjunto de figuras em páginas separadas, identificadas no verso, a lápis, com o nome do autor; as legendas devem ser colocadas em seqüência, em página à parte, nunca junto às figuras. Cada figura (foto, desenho, gráfico, mapa ou esquema) deve ser numerada em arábico, na ordem em que aparece no texto; letras minúsculas podem ser usadas para subdividir figuras; a colocação do número na figura deve ser, sempre que possível, no canto inferior direito. A altura máxima para uma figura ou grupo figuras é de 230 mm, incluindo a legenda, podendo ajustar-se à largura de uma ou de duas colunas (81 mm ou 172 mm) e ser proporcional (até duas vezes) à área final da ocupação da figura (a área útil da revista é de 230 mm de altura por 172 mm de largura). Desenhos devem ser originais, feitos com tinta nanquim preta, sobre papel branco de boa qualidade ou vegetal; linhas e letras devem estar nítidas o suficiente para permitir redução. Fotografias e gráficos são aceitos em branco e preto, e quando coloridos, devem ser custeados pelo autor. A escala adotada é a métrica, devendo estar graficamente representada no lado esquerdo da figura. Utilizar fonte Times New Roman nas legendas de figuras e de gráficos. Figuras com baixa qualidade gráfica ou fora das proporções não serão aceitas.

Endereço eletrônico: hoehneibt@yahoo.com

ENVIRONMENTAL POLLUTION

Guide for Authors

How to submit a manuscript to Environmental Pollution via the Elsevier Electronic System (EES)

Abstract Submission

Potential authors are required to send the abstract of their manuscript and an accompanying paragraph that explains why the work is important and should be published via e-mail to either the Editor-in-Chief or an Associate Editor *before submitting the complete manuscript via the Elsevier Electronic System (EES)*.

Abstracts should be sent to:

Professor William J. Manning, Editor-in-Chief, at environmentalpollution@mindspring.com for all areas

or

Dr. Jan Willem Erisman, Associate Editor, at erisman@ecm.nl for air quality, atmospheric deposition, especially nitrogen

Professor Karl E. Havens, Associate Editor, at khavens@ufl.edu for chemical pollutants in aquatic systems

Professor Kevin C. Jones, Associate Editor, at k.c.jones@lancaster.ac.uk for environmental fate, behavior, and persistence of organic contaminants

Professor Sagar V. Krupa, Associate Editor, at krupa_001@umn.edu for atmospheric processes, global climate change and modelling of cause/effect relationships

The abstract must be approved by the Editor-in-Chief or an Associate Editor before a manuscript can be submitted via EES.

Manuscript Submission

If the Editor-in-Chief, or an Associate Editor, approves the abstract, then the complete manuscript can be submitted via EES at <http://www.ees.elsevier.com/envpol> following all instructions exactly.

Cover Letter

- A cover letter must be sent with the manuscript and must include:
- The name of the editor who approved the abstract
- The names and valid current e-mail addresses for five (5) potential reviewers who are well-qualified to review the manuscript if they are asked to review it.

Potential reviewers should be from the international scientific community and not from one country or region

-The name and e-mail address of the corresponding author

-The EES system will automatically convert your source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which will be used during the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files will be needed for further processing after acceptance.

Types of Contributions and Preparation of Text

General: Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above). Double spacing and wide margins (3 cm) should be used. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure captions on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively. The manuscript should not exceed 5000 words. To facilitate the review process line numbers should be inserted into the text of the manuscript.

Full Papers: Provide the following data on the title page (in the order given).

Title. (Note that concise and informative titles are often used in information-retrieved systems). Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Author's affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure the telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 100-150 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Capsule: In addition to the abstract for the manuscript, authors are required to submit a one-sentence statement that describes the significance of their work to the rest of the scientific community. When necessary, the capsule may be edited before publication.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Note that these keywords will be used for indexing purposes.

N.B. Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Arrangement of the article

Subdivision of the article:

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results. Results should be clear and concise.

Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions. A short Conclusions section is to be presented.

Acknowledgements. Place acknowledgments, including information on grants received, before the references in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References. See separate section, below. Units and symbols. The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if in certain instance, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius.

Figure legends, tables, figures, schemes. Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphic files must always be provided separate from the main text file (see the Preparation of Artwork section below).

Table footnotes. Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single Author:* the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two Authors:* both Authors' names and the year of publication;

3. *Three or more Authors:* first Author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Preparation of Artwork

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: 

<http://authors.elsevier.com/artwork>.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Proofs

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. **In cases where colour is paid for, authors will receive an additional one hundred free offprints.**

Language editing

Information on author-paid and pre-accept language editing services available to authors can be found at <http://authors.elsevier.com/LanguageEditing.html>.

Online Publication

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/02697491>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Author enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway [http://authors.elsevier.com](#).

<http://authors.elsevier.com>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author. In case of problems or questions, authors may contact the Author Service Department, e-mail: authorsupport@elsevier.com.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo

Brazilian Archives of Biology and Technology - BABT **publica artigos originais de pesquisa, notas curtas e artigos de revisão em Inglês em áreas interdisciplinares das ciências biológicas e de engenharia / tecnologia.**

Preparação de manuscritos

A submissão dos artigos implica que não tenha sido publicado ou seja considerado para publicação em outra revista. Cuidados devem ser tomados para preparar um manuscrito compacto com apresentação precisa, o que ajudará os avaliadores na hora de sua aceitação. Todos os artigos estão sujeitos à revisão pelos pares.

MANUSCRITO

Devendo ser enviadas três cópias do manuscrito digitado com espaço simples (máximo de 12 páginas), em papel tamanho A-4 (210x297mm), com margens (2,5 mm esquerda, direita 2,0 mm, superiores e inferior 3,0 mm), sendo preparados com a seguinte disposição de cabeçalhos: ABSTRACT (SUMÁRIO), INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, AGRADECIMENTO, RESUMO, REFERÊNCIAS. Estes cabeçalhos devem ser digitados com letras maiúsculas e em negrito (fonte 12). Para artigos de revisão, os autores devem fazer seus próprios cabeçalhos juntamente com o Resumo e Introdução.

TÍTULO

O título (fonte 18, negrito), iniciais em maiúscula do artigo deve refletir claramente seu conteúdo. Devendo ser seguido pelo nome completo do autor com as iniciais em maiúsculas (fonte 12, negrito) e o endereço (fonte 10, *itálico*) da instituição onde o trabalho foi executado.

ABSTRACT

Cada trabalho deve ser fornecido com um abstract (*itálico*) de 100-150 palavras, descrevendo brevemente o propósito e os resultados do estudo. Deve ser o mais conciso possível.

PALAVRAS -CHAVE

Os autores devem fornecer três a seis palavras-chave que serão usadas na indexação do trabalho.

INTRODUÇÃO

Deve descrever a base da pesquisa e as informações relevantes sobre o trabalho. Deve indicar também o objetivo do trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os autores devem tomar cuidado quanto ao fornecimento de detalhes suficientes para que outros possam repetir o trabalho. Procedimentos padronizados não precisam ser descritos em detalhes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões podem ser apresentados separadamente ou de forma conjunta (autores podem optar pela forma mais fácil). Trabalhos preliminares ou resultados menos relevantes não devem ser descritos. A reprodução dos resultados, incluindo o número de vezes que o experimento foi conduzido e o número de amostras replicadas devem ser expressados claramente.

RESUMO

Todo artigo deve possuir um resumo do em Português e posicionado antes da lista de Referências. Autores de outros países da América Latina podem procurar por ajuda na Editoração da revista, para preparar o resumo em Português de seus artigos.

REFERÊNCIAS

Referências no texto devem ser citadas no local apropriado pelo(s) nome(s) do(s) autor(es) e ano (p. ex.: Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault et al., 1997). Uma lista de referências, em ordem alfabética (fonte 10), deve aparecer no final do manuscrito. Todas as referências na lista devem ser indicadas em algum ponto no texto e vice versa. Resultados não publicados não devem ser incluídos na lista. Exemplos de referências são fornecidas abaixo:

Jornais:

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117

Teses:

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India

Livros:

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechno-logy*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi

Conferências:

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah

TABELAS E FIGURAS

Tabelas e figuras, numeradas consecutivamente com numerais arábico devem ser inseridas no local apropriado no corpo do texto. Devendo ser utilizados somente para apresentar estes dados, os quais não podem ser descritos no texto.

UNIDADES E ABREVIATURAS

O sistema SI deve ser usado para todos dados experimentais. No caso de outras unidades serem usadas, estas devem ser adicionadas em parênteses. Somente as abreviaturas padrões para as unidades devem ser usadas. Pontos não devem ser incluídos nas abreviaturas (por exemplo: m, e não m. ou rpm, e não r.p.m.), também devem ser usados '%' e '/' no lugar de 'porcento' e 'per'.

LAY-OUT DO MANUSCRITO

Sugere-se que os autores sempre consultem a última edição da revista para ver o estilo e layout. Com exceção do título, abstract e palavras-chave, todo o texto deve ser disposto em duas colunas em todas as páginas. No rodapé da primeira página (fonte 8) deve estar sendo indicado o autor para correspondência. Todo o manuscrito deve ser preparado na fonte "Times New Roman", tamanho 11 (exceto na lista de referências, que deve ser em tamanho 10).

ESPAÇAMENTO

Deve ser deixado um espaço entre o título do artigo e o nome dos autores, e entre o cabeçalho e o texto, entre as colunas deixar espaçamento de 0,6 cm. Não deixar espaços entre os parágrafos do texto.

ENVIO ELETRÔNICO

O manuscrito deve estar acompanhado de um disquete indicando o nome e versão do programa editor de texto usado (usar somente MS Word 6/7 ou compatível).

PARES

Ao submeter o manuscrito, solicitamos ao autor sugerir até três pares, fornecendo: nome completo, endereço e quando possível e-mail. Os autores podem solicitar que certos revisores sejam excluídos da revisão de seus manuscritos, caso sintam que estes revisores possam ser tendencialmente desfavoráveis. Contudo, a escolha final dos referees permanecerá com o Editor.

TARIFAS POR PÁGINAS E SEPARATAS

Não há tarifas por páginas. As separatas deverão ser solicitadas sob a aceitação do artigo. O manuscritos e toda correspondência deve ser enviada ao Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol, no endereço abaixo

**R. Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC
81350-010 Curitiba PR Brasil
Tel.: +55 41 3316-3012 / 3316-3052
Fax: +55 41 247-0844**



niet@tecpar.br (2001-2006 Tecpar)