

Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão^{1,4}, Márcia Vanusa da Silva²,
Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra¹, Márcia do Vale Barreto Figueiredo³,
Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva¹ e Leonor Costa Maia²

Recebido: 11.10.2013; aceito: 10.02.2014

ABSTRACT - (Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from gypsum mining areas, Araripina, Pernambuco State, Brazil). The occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in native (AN) and gypsum mining impacted (AI) areas in Araripina, Pernambuco State, Brazil, was determined using as trap cultures sorghum and peanut. The spores were morphologically characterized for identification at species level. DNA was extracted from spores and sequences of the ITS region used for molecular characterization. The molecular study confirmed the identification of three genera and four species (*Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp., *Glomus hoi*, *Claroideoglomus claroideum*) that show ability to support stress conditions. Field work should be carried out to better understand the dynamics and functionality of these AMF species which could be selected for management programs in similar degraded areas.

Keywords: diversity, DNA analysis, Mycorrhiza, trap cultures

RESUMO - (Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil). Foi determinada a ocorrência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em áreas nativa (AN) e impactada (AI) pela mineração de gesso em Araripina, PE, Brasil, utilizando como culturas-armadilha: sorgo e amendoim. Os esporos de FMA foram caracterizados morfológicamente para identificação ao nível de espécie. DNA foi extraído de esporos para caracterização molecular a partir de sequências da região ITS. No estudo molecular foram identificados três gêneros e quatro espécies (*Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp., *Glomus hoi*, *Claroideoglomus claroideum*), que mostram capacidade para tolerar as condições de estresse da área minerada. Trabalhos em campo devem ser realizados para compreender melhor a dinâmica e funcionalidade dessas espécies de FMA que poderiam ser selecionadas para uso em programas de manejo, na recuperação de áreas similares.

Palavras-chave: análises de DNA, culturas-armadilha, diversidade, Micorrizas

Introdução

A região do Araripe, localizada no sertão do Estado de Pernambuco, ocupa área total de 1.914,4 km² e tem como principal atividade econômica a indústria do gesso. O chamado polo 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 remoção da camada orgânica do solo, causando grave impacto ambiental (Siqueira *et al.* 2007), com efeitos negativos sobre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), importantes constituintes da microbiota do solo

1. Instituto Agronômico de Pernambuco, Laboratório de Genoma, Avenida General San Martin, 1371 Bongi, 50761-000 Recife, PE, Brasil
2. Universidade Federal de Pernambuco, Departamentos de Bioquímica e Micologia, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil
3. Instituto de Inovação para o Desenvolvimento Rural Sustentável/Secretaria da Agricultura e Desenvolvimento Agrário de Alagoas, Rua Cincinato Pinto, 348, 2º andar, Centro, 57.020-050 Maceió, AL, Brasil
4. Autor para correspondência: adalia.mergulhao@ipa.br

(Melloni *et al.* 2003). Os FMAs apresentam potencial biotecnológico na agricultura e sua utilização na recuperação de áreas degradadas é fundamental, pois esses fungos têm papel significativo em aumentar o estabelecimento e a produtividade de espécies arbóreas em regiões áridas e semiáridas, onde a produtividade da planta é limitada devido à baixa fertilidade do solo (Rao & Tarafdar 1998). É recomendável também empregar isolados de FMAs nativos que possam assegurar o desempenho da associação e com ela o melhor desenvolvimento das espécies vegetais; isso implica em conhecimento básico das espécies de FMAs presentes na área de interesse.

O estabelecimento, desenvolvimento e manutenção dos ecossistemas naturais são dependentes da associação micorrízica que propicia, aos vegetais, estratégia nutricional superior à de plantas não micorrizadas, favorecendo a sobrevivência em condições de estresse. Assim, as plantas também podem ser beneficiadas em áreas degradadas, sendo os FMA recomendados para recuperação de ambientes severamente perturbados (Souza & Silva 1996, Cavalcante *et al.* 2009).

A contribuição dos FMA deve-se principalmente à melhoria nutricional da planta hospedeira, em particular os nutrientes de baixa mobilidade na solução do solo. Assim, a presença de FMA facilita a reciclagem de nutrientes, diminui os efeitos negativos da compactação do solo, promovendo a formação e a estabilidade de agregados (Rillig 2004), melhorando o ambiente, a capacidade invasora, a formação de comunidades vegetais em áreas degradadas e a tolerância ao déficit hídrico, geralmente comum nestas condições (Klauber-Filho *et al.* 2005).

A identificação de FMA é geralmente baseada em características morfológicas. Entretanto, os descritores das espécies são baseados na análise de um número limitado de isolados, que apresentam alta similaridade; assim, muitas vezes a análise de características morfológicas é ineficiente para a caracterização ao nível de espécie (Novais *et al.* 2010).

Estudos moleculares envolvendo o sequenciamento do rDNA (DNA ribossomal) para a pesquisa com FMA têm facilitado a identificação desses fungos e contribuído para expandir o conhecimento sobre a diversidade e distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie (Avio *et al.* 2009). Devido à importância ecológica e econômica dos FMA, é imprescindível a distinção entre as espécies para aplicabilidade do seu potencial na agricultura. A utilização de técnicas moleculares pode ser útil para esclarecer a identidade e variabilidade de FMA em ambientes nativos e degradados.

Trabalhos sobre a ocorrência de FMA em ecossistemas impactados no Brasil são escassos, não existindo relatos sobre espécies ocorrentes em áreas de mineração de gesso. Conhecer FMA que ocorrem em regiões impactadas é importante para fornecer informações sobre espécies tolerantes a essa condição de estresse, as quais poderão ser úteis em programas de revegetação. Assim, este estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de espécies de FMA em área impactada por mineração de gesso.

Material e métodos

Foram selecionadas áreas de caatinga nativa preservada (AN: considerada como controle) e impactada (AI: área de interface entre os arredores da mina e o depósito de rejeito) por mineração de gipsita no município de Araripina, Estado de Pernambuco (7°29'00"S e 40°36'00"W). A região apresenta clima semiárido mesotérmico, a vegetação predominante é caatinga hiperxerófila e o solo do tipo Latossolo vermelho amarelo distrófico (Cavalcanti & Lopes 1994). Para a coleta do solo foi definida uma área de 1.000 m², sendo obtidas amostras a cada 10 m, em zig-zag. Em cada área, 10 amostras compostas de três subamostras foram obtidas da rizosfera, entre 5 a 20 cm de profundidade. Parte do solo foi encaminhada para o Instituto Agrônomo de Pernambuco para análises física, química e de fertilidade, e o restante foi usado para as demais análises (tabela 1).

Foram preparadas culturas-armadilha para FMA, com o solo coletado das áreas estudadas. O solo foi diluído em areia autoclavada (2:1) e colocado em potes plásticos com capacidade de 1 litro, tendo como plantas hospedeiras o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e o sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivar IPA-7301011. Essas duas plantas hospedeiras são micotróficas facultativas, ou seja, necessitam em diferentes graus da associação micorrízica, dependendo da fertilidade do solo. Além do mais, a utilização desses hospedeiros favorece a esporulação de espécies com germinação tardia; e o sorgo, além de suportar condições adversas do solo, apresenta ciclo de vida mais longo que o amendoim (Sieverding 1991). Foram mantidos três ciclos dessas culturas em casa de vegetação, cada um por cerca de três meses; durante este período, as plantas foram regadas em dias alternados. A temperatura e a umidade relativa do ar foram medidas diariamente, variando de 21 a 35 °C e de 31% a 88%, respectivamente. Após este período, esporos de FMA foram extraídos do solo por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson 1963)

e centrifugação em água e sacarose a 50% (Jenkins 1964), e selecionados em microscópio estereoscópico.

Para caracterização taxonômica das espécies de FMA foram utilizadas duas abordagens: morfológica e molecular. Para caracterização morfológica, esporos similares foram agrupados, montados em lâminas com PVLG ou reagente de Melzer + PVLG (1:1) e observados ao microscópio para identificação ao nível de espécie (Schenck & Pérez 1990, <http://invam.caf.wvu.edu>) (figura 1).

Para caracterização molecular, o DNA foi extraído a partir de esporos dos FMA segundo a metodologia de Lanfranco *et al.* (2001) com algumas modificações. Cerca de 150 a 200 esporos de cada espécie de FMA foram sonicados (3 a 4 ciclos por 30 segundos), quebrados com ajuda de um micropistilo em 50 µL de 1X tampão de reação (LABTRAD do Brasil LTDA) contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, incubados a 95 °C por 15 minutos e centrifugados a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20 °C. A reação de PCR consistiu em 3 µL (20 ng) de DNA de esporos adicionados ao mix para um volume final de 25 µL, contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 25 nmoles de cada *primer* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.* 1990), e 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil) e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador M.J. Research, Inc. (USA) PCR, modelo PTC 100, sob as seguintes condições térmicas: 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C por 45 s, 50 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 72 °C por 5 min. Ao final da reação, o produto foi mantido a -4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações via PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, e corado com

Sybr Gold (Invitrogen do Brasil), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em fotodocumentador sob luz UV. A reação da PCR para o DNA de cada isolado foi realizada 10 vezes nas mesmas condições para obter a reprodutibilidade dos dados.

Os produtos obtidos por PCR foram purificados e clonados em vetor T/A pCR2.1 TOPO (Invitrogen do Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e foram transformados em células de *Escherichia coli* DH5a. As colônias transformadas foram inoculadas em placas de Petri em meio de cultura LB acrescido de 50 mg/L de Kanamicina. Para extração de DNA plasmidial foi utilizado o método de *lise* alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). As sequências de nucleotídeos foram determinadas em sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 377 Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), utilizando o kit "Big Dye Terminator" (Applied Biosystems), pelo laboratório de sequenciamento de DNA do CENARGEN/Brasília, Brasil.

As sequências obtidas foram comparadas no Banco de Dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribossomal Data Base Project) - *Seqmath* (<http://rdp.cme.msu.edu/>). As sequências da região ITS foram alinhadas com outras provenientes do NCBI com auxílio do programa ClustalW (Thompson *et al.* 1999) e, em seguida, construída uma árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) com MEGA 4 (Tamura *et al.* 2004). A confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de bootstrap com 1.000 replicações.

A classificação adotada segue o Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>), sendo consultados também Oehl *et al.* 2011 e Redecker *et al.* 2013.

Resultados e Discussão

De acordo com a análise morfológica, os isolados de FMA foram identificados como: AM9 -

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo coletado em duas áreas de mineradora de gipsita, em Araripina, PE, Brasil. AN: Caatinga nativa preservada; AI: Área de interface entre os arredores da mina e o depósito de rejeito; *FP: Forte presença; **F.A.: Franco arenoso.

Table 1. Chemical and physical characteristics of soil collected in two gypsum mining areas in Araripina, Pernambuco State, Brazil. AN: preserved Caatinga; AI: interface between the mine surroundings and the waste deposit; FP: strong presence; **F.A.: Sandy loam soil.

Áreas	pH	P	C	Ca	Mg	K	SO ₄ *	CO ₃	HCO ₃	Textura (%)	MO	Fe	Dap	Dr	UR	PMP	Classe		
		H ₂ O	mg.dm ⁻³	g.Kg ⁻¹			cmolc.dm ⁻³			meq.L ⁻¹	(%)	mg/dm ³	g/cm ³		(%)	15	textural**		
		Areia	Argila	Silte												Atm			
NA	6,4	8	1,2	6,20	1,1	0,4	Presença	0,8	5,6	74	8	18	2,1	13,7	1,3	2,6	0,4	4,7	F.A.
AI	5,7	14	1,3	36,25	11,2	0,6	FP	0,2	0,8	14	59	27	2,2	79,8	1,1	2,4	8,6	30,6	Argiloso

Funneliformis mosseae (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, AM11 - *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, AM23 - *Claroideogloium etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler e AM25 - *Claroideogloium claroideum* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler



Figura 1. Fotomicrografias de fungos micorrízicos arbusculares presentes em áreas nativa e impactada por mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil. 1. *Rhizophagus intraradices*, esporos em raiz de amendoim. 2. *Rhizophagus intraradices*, aspecto geral do esporo. 3. *Claroideogloium etunicatum*, aspecto geral do esporo.

Figure 1. Photomicrographs of arbuscular mycorrhizal fungi found in native and gypsum mining impacted areas, Araripina, Pernambuco State, Brazil. 1. *Rhizophagus intraradices*, spores in peanut roots. 2. *Rhizophagus intraradices*, general aspect of a spore. 3. *Claroideogloium etunicatum*, general aspect of a spore.

(figura 1 e tabela 2). Alguns táxons de *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Glomus* não foram identificados ao nível específico e, provavelmente, constituem espécies ainda não descritas; mais estudos nas áreas avaliadas podem propiciar, inclusive, o registro de espécies ainda não conhecidas para a ciência. Aparentemente não existem trabalhos sobre FMAs em áreas impactadas por mineração de gesso no Nordeste do Brasil. Vários autores têm registrado a ocorrência de espécies de *Glomus* em áreas impactadas (Caproni *et al.* 2003, Yano-Melo *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005). Segundo Allen *et al.* (1995), mesmo em regiões consideradas pouco propícias ao crescimento dos FMAs, com altas temperaturas e baixa precipitação, algumas espécies de *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Glomus* e *Scutellospora* possuem ampla distribuição geográfica.

Na área impactada foi registrada a ocorrência de *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices*, *Claroideogloium etunicatum* e *Claroideogloium claroideum*. As espécies de FMAs presentes na área degradada, cuja estrutura do solo está comprometida pela atividade gesseira, provavelmente utilizaram estratégias de sobrevivência (persistência), aumentando o número de propágulos no solo, como mecanismo de defesa às condições adversas. Hart *et al.* (2001) sugeriram que os FMAs utilizam duas estratégias (colonização e persistência) para sobreviver em um ambiente. No primeiro caso enquadram-se as espécies mais hábeis em colonizar novos hospedeiros e no segundo, as que conseguem permanecer no sistema (solo/raiz) mesmo em condições adversas. A presença de espécies de FMA não esporulantes pode ser a razão dos baixos registros na área nativa (AN). É difícil separar os fatores mais importantes na interação micorrízica, embora esteja definido que, em campo, as concentrações de propágulos de FMAs são correlacionadas principalmente com as condições de solo (pH, textura, concentração de nutrientes) e cobertura vegetal (Sieverding 1991). Maia & Trufem (1990) referiram a presença constante de *Funneliformis mosseae* em coletas no município de Araripina, PE. Marinho *et al.* (2004) registraram a presença de *Rhizophagus intraradices* e *Paragloium occultum* em áreas de mineração de bauxita e em floresta primária na Amazônia. 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).

Solos de regiões semiáridas têm grande diversidade de 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 da região do Araripe. Daí a importância do uso de culturas-armadilha que fornece visão mais ampla da diversidade de espécies em ambientes com alta proporção de FMAs não esporulantes, além de possibilitar melhor avaliação das espécies indígenas, principalmente em solos de zonas áridas e semiáridas (Stutz e Morton 1996).

O pH da área impactada (AI) provavelmente favoreceu o estabelecimento das espécies de FMA nativas da caatinga que normalmente ocorrem em pH mais baixo (5,7) (tabela 1). Souza *et al.* (2003) verificaram, em área de caatinga, que a maioria das espécies de Glomeraceae e Acaulosporaceae foi registrada em solos com baixo pH ($\approx 5,8$). O aumento do nível de fósforo (14 mg dm^{-3}) observado na área impactada (AI) quando comparado ao da área nativa (AN) (8 mg dm^{-3}) provavelmente influenciou espécies de FMA hábeis em colonizar as raízes das plantas hospedeiras. Atributos químicos como pH, fósforo disponível e matéria orgânica na área impactada podem ter contribuído para a presença de FMA nesse solo. As características químicas

e físicas dos solos influenciam a densidade de esporos, a composição de espécies e a distribuição dos FMA, afetando diferentemente o crescimento das plantas (Day *et al.* 1987). O conhecimento da eficiência e distribuição dos FMA em relação ao pH, em conjunto com outros fatores do solo como níveis de fósforo e alumínio pode contribuir para o sucesso no manejo de solos degradados, onde prevalece a compactação e acidez (Hayman & Tavares 1985).

A região ITS foi sequenciada para melhor análise da diversidade entre os grupos de isolados de FMA com elevada afinidade filogenética, para que pudessem ser identificados, permitindo assim diferenciar inter e intraespecificamente os isolados de FMA oriundos das áreas estudadas (tabela 2 e figura 2).

Na tabela 2 encontramos a identificação por análise morfológica e molecular a partir da análise com o Blastn, onde se observa que a identidade dos isolados de FMA em alguns casos não foi confirmada pelas sequências do GenBank ($< 96\%$), como no caso dos isolados AM11 e AM15. Além disso, o sequenciamento da região ITS forneceu subsídio para complementar a identificação por análise morfológica. A partir de análises moleculares, por meio do sequenciamento do

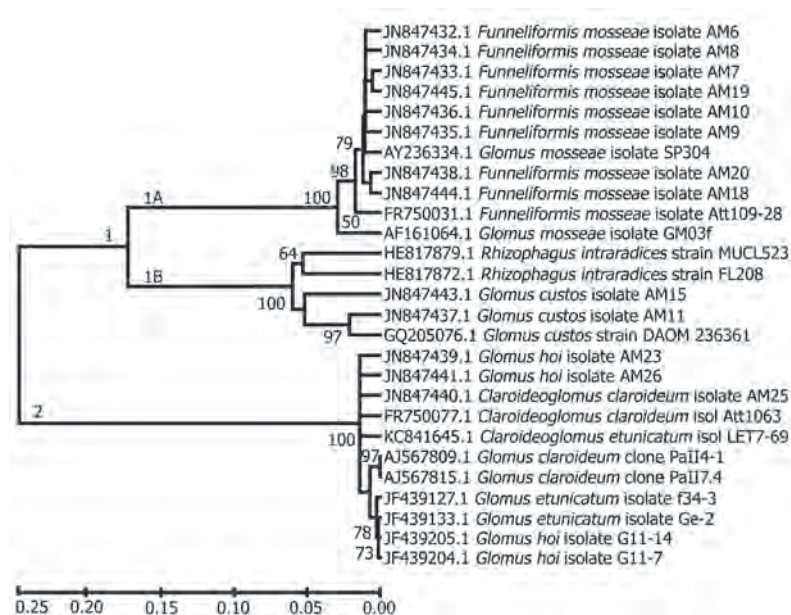


Figura 2. Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS alinhadas pelo programa ClustalW e modelo de nucleotídeo Tamura-Nei no programa MEGA v.4 dos isolados de FMA (AM6 a AM10 e AM18 a AM20: *Funneliformis mosseae*, AM11 e AM15: *Glomus custos*, AM23 e AM26: *Glomus hoi*, AM25: *Claroideoglomus claroideum*) obtidos de áreas nativa e impactada por mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the sequences of the ITS region aligned by the program ClustalW and model of Tamura-Nei nucleotide performed on the program MEGA v.4 of the AMF (AM6 the AM10 and AM18 the AM20: *Funneliformis mosseae*, AM11 and AM15: *Glomus custos*, AM23 and AM26: *Glomus hoi*, AM25: *Claroideoglomus claroideum*) obtained from native and gypsum mining impacted areas, Araripina, Pernambuco State, Brazil.

Table 2. Caracterização morfológica e molecular dos isolados de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) encontrados em áreas nativa (AN) e impactada (AI) por mineração de gesso em Araripina, PE, Brasil.

Table 2. Morphological and molecular characterization of isolates of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) found in native (AN) and gypsum mining impacted (AI) areas in Araripina, Pernambuco State, Brazil.

Identificação morfológica dos isolados	Identificação molecular dos isolados	Acesso (NCBI)	Identificação molecular (GenBank)	Acesso (NCBI)	Tamanho (pb)* / Identidade (%)	Áreas
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM6	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847432.1	<i>Funneliformis mosseae</i>	FN547488.1	561pb (91%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM7	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847433.1	<i>Funneliformis mosseae</i>	FR750026.1	581pb (97%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM8	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847434.1	<i>Glomus mosseae</i>	AJ919278.1	580pb (97%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM9	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847435.1	<i>Glomus mosseae</i>	AY236334.1	581pb (98%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM10	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847436.1	<i>Glomus mosseae</i>	X96832.1	522pb (99%)	AI
<i>Rhizophagus intraradices</i> /AM11	<i>Glomus sp.</i>	JN847437.1	<i>Glomus custos</i>	GQ205076.1	525pb (91%)	AI/AN
<i>Rhizophagus intraradices</i> /AM15	<i>Glomus sp.</i>	JN847443.1	<i>Glomus custos</i>	GQ205074.1	505pb (90%)	AI/AN
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM18	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847444.1	<i>Glomus mosseae</i>	AY236332.1	582pb (97%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM19	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847445.1	<i>Glomus mosseae</i>	AY236334.1	580pb (97%)	AI
<i>Funneliformis mosseae</i> /AM20	<i>Funneliformis mosseae</i>	JN847438.1	<i>Glomus mosseae</i>	AY236332.1	583pb (98%)	AI
<i>Claroideoglossum etunicatum</i> /AM23	<i>Glomus hoi</i>	JN847439.1	<i>Glomus hoi</i>	JF439205.1	592pb (96%)	AI
<i>Claroideoglossum claroideum</i> /AM25	<i>Claroideoglossum claroideum</i>	JN847440.1	<i>Glomus claroideum</i>	AJ567744.1	587pb (96%)	AI
<i>Claroideoglossum etunicatum</i> /AM26	<i>Glomus hoi</i>	JN847441.1	<i>Glomus hoi</i>	JF439206.1	504pb (98%)	AI

*pb = pares de base

SSU rRNA, novos gêneros de FMA foram descritos e algumas espécies recombinadas, a exemplo de *Glomus claroideum* = *Claroideoglomus claroideum*, *Glomus mosseae* = *Funneliformis mosseae*, *Glomus intraradices* = *Rhizophagus intraradices* e *Glomus custos* = *Rhizophagus custos* (Schüßler & Walker 2010).

A árvore filogenética obtida pelo sequenciamento da região ITS1 e ITS2 dos isolados de FMA (figura 2) apresentou dois agrupamentos bem definidos: clado 1 e clado 2. No clado 1 formaram-se dois subclados: 1A e 1B. O subclado 1A agrupou oito dos 13 isolados estudados, sendo classificados como *Funneliformis mosseae*; seis (AM6, AM7, AM8, AM9, AM10 e AM19) com uma distância genética de 98% e dois (AM20 e AM18) com distância de 99%. Logo após os seis primeiros isolados de *F. mosseae*, intercalou-se o isolado SP304a de *Funneliformis mosseae*, oriundo do Genbank, e na base neste agrupamento ficaram os isolados Att109-28 e GM03f de *F. mosseae*.

No subclado 1B, agruparam-se os isolados AM11 e AM15, ambos supostamente *Rhizophagus custos*, com distância genética de 97% e 95%, respectivamente. Neste mesmo subclado apareceram como *Rhizophagus custos* (= *Glomus custos*) e *R. intraradices*, que mostraram alta similaridade, com distância genética de 94%. Vale ressaltar que estas sequências foram oriundas do GenBank.

O clado 2, com relação ao clado 1, mostrou distância genética de 75% e dentro deste clado foi observada grande variação entre as espécies. Apenas três isolados AM26 (*Glomus hoi*), AM23 (*G. hoi*) e AM25 (*Claroideoglomus claroideum*) foram agrupados neste clado, apresentando a mesma distância genética e incluindo também *C. claroideum* e *Claroideoglomus etunicatum*, provenientes do NCBI. A base da árvore foi composta pelos acessos do banco de dados (NCBI) usado como referência; as espécies agrupadas foram: *Claroideoglomus* (= *Glomus*) *claroideum*, *Claroideoglomus* (= *Glomus*) *etunicatum* e *G. hoi*, todas do mesmo gênero, mostrando alta similaridade.

Nos últimos anos, a classificação dos FMA sofreu grandes mudanças, com a descrição de novas famílias, gêneros e espécies e a recombinação de táxons, demonstrando a elevada complexidade do grupo e levando, inclusive, a diferentes propostas de classificação para o filo Glomeromycota (Oehl *et al.* 2011 Redecker *et al.* 2013).

Diante dos resultados confirma-se a dificuldade na identificação taxonômica dos FMA e a importância

de associar análises morfológicas e moleculares. Stockinger *et al.* (2010), estudando a região do ITS1, 5.8S rRNA e ITS2 em FMA, também relataram dificuldades na detecção de espécies do filo Glomeromycota intimamente relacionadas, o que vem corroborar os dados obtidos. No presente estudo foram identificados três gêneros e quatro espécies (*Funneliformis mosseae*, *Glomus sp.* (similar a *G. custos*), *G. hoi* e *Claroideoglomus claroideum*), que mostraram grande capacidade em tolerar as condições edáficas na área impactada pela mineração de gesso.

Práticas que preservem melhor as áreas afetadas por mineração são altamente recomendadas e trabalhos em campo devem ser realizados para compreender melhor a dinâmica e funcionalidade dessas espécies de FMAs com baixa divergência morfológica. Considerando a importância dos FMA para o equilíbrio das plantas hospedeiras, abre-se a possibilidade de seleção de espécies encontradas na área impactada para aplicação em programas de manejo na recuperação de áreas degradadas similares.

Agradecimentos

Aos revisores anônimos, pelas valiosas modificações sugeridas.

Literatura citada

- Allen, E.B., Helm, D.J., Trappe, J.M., Molina, R. & Rincon, E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62.
- Avio, L., Cristiani, C., Strani, P. & Giovannetti, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 242-253.
- Caproni, A.L., Franco, A.A., Barbara, 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* 38: 937-945.
- Cavalcante, U.M.T., Goto, B.T. & Maia, L.C. 2009. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. *In*: R.M. Moura, M. Menezes & R.L.R. Mariano (eds.). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. UFPE - Imprensa Universitária, Recife, pp. 180-208.
- Cavalcanti A.C. & Lopes O.F. 1994. Condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe e viabilidade de produção sustentável de culturas. EMBRAPA - SPI, Brasília.
- 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: 635-639.

- 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* 46: 235-244.
- Hart, M.M., Reader, R.J. & Klironomos, J.N.** 2001. Life-History Strategies Of Arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia* 93: 1186-1194.
- Hayman, D.S. & Tavares, M.** 1985. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. *New Phytologist* 100: 367-377.
- Jenkins, W.R.** 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.
- Klauber-Filho, O., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Soares, C.R.F.S. & Silva, S.** 2005. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: P. Vidal-Torrado, L.R.F. Alleoni, M. Cooper, A.P. Silva & E.J. Cardoso (eds.). *Tópicos em ciência do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, UFV - Viçosa, pp. 85-144.
- 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 Phytologist* 152: 169-179.
- Maia, L.C. & Trufem, S.F.B.** 1990. Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 89-95.
- Marinho, N.F., Caproni, A.L., Franco, A.A. & Berbara, R.L.L.** 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 Brasílica* 18: 141-149.
- 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* 38: 267-276.
- Novais, C.B., Souza, F.A. & Siqueira, J.O.** 2010. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 886-896.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K. & Silva, G.A.** 2011. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2: 191-199.
- Rao, A.V. & Tarafdar, J.C.** 1998. Significance of microorganisms in afforestation programmes in arid zone. *Annals of Arid Zone* 37: 337-346.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B. & Walker, C.** 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515-31.
- Rillig, M.C.** 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 28: 355-363.
- Saitou, N. & Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schenck, N.C. & Pérez, Y.** 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3 ed. Synergistic Publications, Gainesville.
- Schüßler, A. & Walker, C.** 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Disponível em http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf (acesso em 16-XII-2012).
- Sieverding, E.** 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation. Eschborn, Federal Republic of Germany.
- 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* 15: 47-53.
- Siqueira, J.O., Soares, C.R.F.S., Santos, J.G.D., Schneider, J. & Carneiro, M.A.C.** 2007. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. *Tópicos em Ciência do Solo* 5: 219-306.
- 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: 49-60.
- Souza, F.A. & Silva, E.M.R.** 1996. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: J.O. Siqueira (ed.). *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. UFLA/DCS e DCF, Lavras, pp. 255-290.
- Stockinger, H., Krüger, M. & Schüßler, A.** 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474.
- Stutz, J.C. & Morton, J.B.** 1996. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 74: 1883-1889.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S.** 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 11030-11035.
- Thompson, J.D., Plewniak, F. & Poch, O.** 1999. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Research* 27: 2682-2690.
- 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* 30: 79-87.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic, San Diego, pp. 315-322.