



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Allan Gabriel Yure Vieira Marques

**Análise Comparativa de métodos de extração de DNA para
Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares via qPCR em
diferentes solos da Caatinga**

Petrolina - PE

2019

ALLAN GABRIEL YURE VIEIRA MARQUES

**Análise Comparativa de métodos de extração de DNA para
Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares via qPCR em
diferentes solos da Caatinga**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Mayumi Yano-Melo.

Coorientadora: Dr.^a Roberta Lane de Oliveira Silva.

Petrolina - PE

2019

Marques, Allan Gabriel Yure Vieira.

M357a Análise Comparativa de métodos de extração de DNA para Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares via qPCR em diferentes solos da Caatinga / Allan Gabriel Yure Vieira Marques. – Petrolina - PE, 2019.
64f.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Mayumi Yano-Melo.

Inclui referências.

1. Fungos - Brasil. 2. Caatinga. 3. Bioma. 4. Genética molecular. I. Título. II. Yano-Melo, Adriana Mayumi. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 632.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS -GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

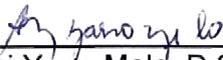
Allan Gabriel Yure Vieira Marques

Análise Comparativa de métodos de extração de DNA para Detecção de Fungos
Micorrízicos Arbusculares via qPCR em diferentes solos da Caatinga

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em
Agronomia – Produção Vegetal, pela
Universidade Federal do Vale do São
Francisco.

Aprovada em: 31 de Outubro de 2019.

Banca Examinadora



Adriana Mayumi Yano-Melo, D.Sc., Orientadora, Univasf



Roberta Lane de Oliveira Silva, D.Sc., Coorientadora, Univasf



João José Simoni Gouveia, D.Sc., Univasf



Nataniel Franklin de Melo, D.Sc., Embrapa Semiárido

A minha mãe Rita e avó Marinete,
aos meus irmãos Priscila e Janaldo,
a minha amada Júlia
e a todos aqueles que
fizeram parte deste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me escutado nas horas que precisei e ter me dado forças para concluir este projeto.

A minha mãe Rita de Cássia e avó Marinete Bezerra, por terem me ensinado a nunca desistir, por todo o apoio e amor que me dão diariamente.

A minha amada companheira, Júlia Luna, por ter ficado ao meu lado nos momentos mais difíceis, por ter compreendido e me auxiliado a realizar mais este sonho.

Aos meus irmãos Priscila e Janaldo, pela amizade e todo o apoio que me deram na graduação.

À Professora e Orientadora Dra. Adriana Mayumi Yano-Melo, pela paciência, disponibilidade e ensinamentos, além da orientação, confiança e apoio na execução do projeto.

À Dra. Roberta Lane, pela co-orientação, execução e auxílio em todas as etapas do trabalho.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco e ao programa de pós-graduação Produção Vegetal, pela contribuição à minha formação ao nível de mestre.

Ao Professor Dr. Nataniel Melo e todos os membros do seu laboratório, por ter cedido o laboratório para análise e me auxiliado nas extrações.

Ao Professor Marcos Sales e a Kátia Araújo Silva, por terem me ensinado e auxiliado nas análises físico-químicas.

Aos meus colegas de classe, em especial Alana Santos, que me auxiliaram no meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Luiz Dantas e Tamires Silva, pelos bons momentos vividos no laboratório e pelo auxílio nas análises e dúvidas que tive ao longo do curso.

A todos os colegas do Laboratório, pela companhia e bons cafezinhos juntos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro com variação temporal e espacial de chuvas, o que o torna um ambiente único e altamente complexo, composto por diferentes fitofisionomias e classes de solos, que resultam em ampla biodiversidade. A maior parte dos solos da Caatinga está exposta a fatores abióticos intensos, tornando as suas propriedades físico-químicas e biológicas altamente dependentes da matéria orgânica do solo e microbiota edáfica. No entanto, apesar da importância desse complexo ecossistema ainda há uma lacuna quanto à utilização de técnicas que determinem com exatidão a composição da comunidade microbiana, especialmente de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), a qual tem sido realizada por caracterização morfológica. Nesse sentido, este trabalho objetivou comparar cinco métodos de extração de DNA (GnS-GII, ISOm, Sy3, MoBio e Selbach) de amostras de solo visando selecionar o método mais eficiente para o estudo de comunidades de FMA em sete classes de solos (Latosolo, Neossolo, Cambissolo, Argissolo, Luvisolo, Planossolo e Vertissolo) representativos da Caatinga. Foram observadas variações significativas no DNA extraído e na pureza observada entre os diferentes protocolos testados, sendo a extração pelo kit da MoBio a mais eficiente no que se refere a concentração e pureza, seguida pelo método de Selbach. Com relação às classes de solos, a melhor purificação foi obtida em Latossolos, enquanto os Argissolos foram os que obtiveram menores valores. Utilizando os métodos MoBio, Selbach e ISOm foi possível alcançar maior eficiência na extração de DNA em Vertissolo. Por outro lado, os métodos GnS-GII e Sy3 não resultaram em diferenças significativas entre as classes de solo. As características físico-químicas que interferiram diretamente na extração de DNA foram: pH, K⁺, Ca+Mg, matéria orgânica, percentual de Areia, Silte e Areia. No entanto, o percentual de Argila e o teor de P influenciaram a purificação dos protocolos GNS-GII e Selbach, respectivamente. As amostras obtidas pelo Kit Mobio e método Selbach possibilitaram amplificações de DNA nos dois pares de primers testados (ITS4/ITS86F e NS31/AML2), o que não foi observado nos outros métodos possivelmente pelos valores baixos de pureza das amostras. Além disso, o Kit Mobio possibilitou a amplificação de DNA em todas as classes de solos avaliadas. Por sua vez, com o método Selbach foi observada amplificação em apenas cinco classes (Cambissolo, Latossolo, Neossolo, Planossolo e Vertissolo) para o primer ITS4/ITS86F e em seis classes (Cambissolo, Latossolo, Luvisolo, Neossolo, Planossolo e Vertissolo) para o primer NS31/AML2. As classes Latossolo e Planossolo destacaram-se entre as demais para amplificação de DNA de fungos em geral em ambos os métodos (Kit Mobio e Selbach) assim como as classes Cambissolo e Vertissolo para o primer específico para FMA. As características físico-químicas (pH, K⁺, Ca+Mg, Na, argila, silte e areia) das classes de solo avaliadas neste estudo afetaram a eficiência da extração e pureza do DNA, assim como a qPCR. Nos protocolos que obtiveram valores médios de pureza abaixo de 1,40 não foi possível obter amplificação de DNA com os dois pares de *primers* testados.

Palavras-chave: FMA, Ácido desoxirribonucleico, Bioma, PCR em tempo real, Genética Molecular.

ABSTRACT

Caatinga is an exclusively Brazilian biome with temporal and spatial variation of rainfall, which makes it a unique and highly complex environment, composed of different phytophysiognomies and soil classes, which result in wide biodiversity. Most of Caatinga's soils have been exposing to intense abiotic factors, making their physicochemical and biological properties highly dependent on soil organic matter and soil microbial. However, despite the importance of this complex ecosystem, there is still a gap in the use of techniques that accurately determine the composition of the microbial community, especially Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), which have performed by morphological characterization. In this sense, this work aimed to compare five DNA extraction methods (GnS-GII, ISOm, Sy3, Mobio and Selbach) from soil samples to select the most efficient method for studying AMF communities in seven soil classes (Latosolo, Neossolo, Cambissolo, Argissolo, Luvisolo, Planossolo e Vertissolo) representative of Caatinga. Significant variations were observed in the extracted DNA and in the observed purity between the different protocols tested, being the extraction by Mobio kit the most efficient regarding the concentration and purity, followed by the Selbach method. Regarding the soil classes, the best purification had obtained in Latossolos, while the Argissolos obtained the lowest values. Using the Mobio, Selbach and ISOm methods it was possible to achieve greater efficiency in DNA extraction in Vertissolo. On the other hand, the GnS-GII and Sy3 methods did not result in significant differences between soil classes. The physicochemical characteristics that directly interfered with DNA extraction were pH, K +, Ca + Mg, organic matter, percentage of sand, silt and clay. However, the percentage of clay and the content of P influenced the purification of the GNS-GII and Selbach protocols, respectively. The samples obtained by the Mobio Kit and Selbach method enabled DNA amplifications in the two pairs of tested primers (ITS4 / ITS86F and NS31 / AML2), which was not observed in the other methods possibly due to the low values of sample purity. In addition, the Mobio Kit enabled the amplification of DNA in all classes of soils evaluated. In turn, with the Selbach method, amplification was observed in only five classes (Cambisol, Latosol, Neossol, Planossol and Vertissolo) for the primer ITS4 / ITS86F and in six classes (Cambissolo, Latossolo, Luvisolo, Neossolo, Planossolo and Vertissolo) for the NS31 / AML2 primer. The Latosol and Planossolo classes stood out among the others for amplification of fungi DNA in general in both methods (Kit Mobio and Selbach) as well as the Cambissolo and Vertissolo classes for the specific primer for FMA. The physical-chemical characteristics (pH, K +, Ca + Mg, Na, clay, silt and sand) of the soil classes evaluated in this study affected the efficiency of DNA extraction and purity, as well as the qPCR. In the protocols that obtained average values of purity below 1.40 it was not possible to obtain amplification of DNA with the two pairs of tested primers.

Key-words: AMF, Deoxyribonucleic acid, Biome, Real Time PCR, Molecular genetics.

Lista de figuras

Pág.

Figura 1 – Domínios organizados de acordo com o tipo de rRNA presente nas subunidades ribossomais dos organismos.....	7
Figura 2 – Processo de colonização e estabelecimento da simbiose entre FMA e planta.....	8
Figura 3 – A) Modelo químico da estrutura da molécula de DNA; B) Unidades e subunidades ribossomais de procariotos e eucariotos e seus respectivos fragmentos de rRNA.....	13
Figura 4 – Esquema GEPHI apresentando os agrupamentos dos kits de extração e as abundâncias relativas de microorganismos no nível da família no DNA amostras obtidas com um determinado kit. A abundância é mostrada como cor intensa e a maior agregação de kits sugere estruturas microbianas semelhantes.....	20
Figura 5 – Pontos de coleta das amostras de solos: A (Latosolo, Luvisolo e Cambissolo); B (Neossolo, Argissolo e Planossolo); C (Vertissolo).....	21
Figura 6 – Fluxograma dos protocolos de extração manual de DNA.....	26
Figura 7 – Aspecto geral das amostras de DNA obtidas nos protocolos GNS-II e ISOM sem purificação. Legenda: 1 – Luvisolo; 2 – Cambissolo; 3 – Vertissolo; 4 – Latossolo; 5 – Planossolo; 6 – Neossolo; 7 – Argissolo.....	34
Figura 8 – Aspecto geral das amostras de DNA obtidas nos protocolos GNS-II, ISOM e SY3 após a etapa de purificação. Legenda: 1 – Luvisolo; 2 – Cambissolo; 3 – Vertissolo; 4 – Latossolo; 5 – Planossolo; 6 – Neossolo; 7 – Argissolo.....	35
Figura 9 – Detecção de DNA em gel de agarose: a) método Sy3; b) método Selbach; c) método ISOM; e d) método GnS-GII.....	36
Figura 10 – Aspecto geral das amostras de DNA obtidas no protocolo Selbach após a etapa de purificação. Legenda: 1 – Luvisolo; 2 – Cambissolo; 3 – Vertissolo; 4 – Latossolo; 5 – Planossolo; 6 – Neossolo; 7 – Argissolo.....	39
Figura 11 – Detecção de amostras de DNA de sete classes de solos da Caatinga por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o primer ITS4/ITS86F e dois	

métodos de extração (Kit Mobio e Método Selbach).....	41
Figura 12 – Detecção de amostras de DNA de sete classes de solos da Caatinga por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o primer NS31/AML2 e dois métodos de extração (Kit Mobio e Método Selbach).....	42

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 – Estimativa de densidades populacionais e biomassa dos principais representantes dos grupos dos organismos no ambiente edáfico de acordo com a classificação de tamanho proposta por Madigan et al., (2016)	5
Tabela 2 – Diversidade de espécies de FMA na Caatinga em diferentes classes de solo.....	9
Tabela 3 – Comparação entre metodologias de extração diretamente do solo.....	15
Tabela 4 – Caracterização química de diferentes classes de solos com vegetação nativa da Caatinga.....	31
Tabela 5 – Características Físicas das Classes de solo com vegetação nativa da Caatinga no sertão pernambucano.....	32
Tabela 6 – Concentração de DNA ($\mu\text{g.g}^{-1}$ solo) obtida em diferentes protocolos de extração em função da classe de solo.....	33
Tabela 7 – Quantificação da pureza do DNA ($A_{260/280}$ μm) em função do método de extração e tipo de solo com vegetação nativa da Caatinga.....	33
Tabela 8 – Correlação dos protocolos com as características químicas do solo.....	37
Tabela 9 – Comparação de custos entre os protocolos testados.....	38

Lista de abreviaturas e siglas

Al	Alumínio
Ca	Cálcio
CIA	Clorofórmio: álcool isoamílico
Cq	Ciclo de quantificação
CTAB	Cetil-trimetil brometo de amônio
CTC	Capacidade de troca de cátions
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminobenzóico
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
ISO	Organização Internacional de Normalização
ISOm	Organização Internacional de Normalização Modificado
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	Potássio
M.O.	Matéria Orgânica
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
P	Fósforo
PARNA	Parque Nacional do Catimbau
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-	
SSCP	Polimorfismo de conformação por cadeia simples de PCR
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpolipirrolidona
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico
rDNA	Ribossomal DNA
SDS	Dodecil sulfato de sódio
THG	Transferência Horizontal de Genes

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1.1 Caatinga.....	3
2.1.2 Solo e a comunidade microbiana	4
2.1.3 Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares no solo.....	6
2.1.4 Distribuição de FMA na Caatinga.....	9
2.2.1 Extração de DNA do Solo.....	12
2.2.2 Comparação de Protocolos de extração de DNA do solo.....	15
2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Extração de DNA.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Amostras de Solo.....	21
3.2 Análises Físicas.....	22
3.2.1 Granulometria.....	22
3.3 Análise Química.....	23
3.3.1 pH.....	23
3.3.2 Carbono orgânico.....	23
3.3.3 Sódio e Potássio.....	24
3.3.4 Fósforo solúvel.....	24
3.3.5 Alumínio solúvel.....	25
3.3.6 Cálcio e Magnésio.....	25
3.4 Extração de DNA.....	26
3.5 Purificação.....	30
3.6 Avaliação da qualidade e quantificação das amostras de DNA.....	30
3.7 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	31
3.8 Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Análises das características físico-químicas dos solos testados.....	32
4.2 Comparação da eficiência das técnicas de extração de DNA dos solos testados	33
4.3 Características físico-químicas x extração de DNA.....	36
4.4 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE	64

1. INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, abrangendo maior parte na Região Nordeste e parte do norte do Estado de Minas Gerais, com área total de 844.453 mil km², correspondente a 11 % do território nacional, no qual predomina o clima semiárido (SILVA et al., 2004; QUEIROZ, 2009). De acordo com Marengo et al. (2011), a precipitação média acumulada é de 600 mm/ano, com ocorrência de anos extremamente secos e outros chuvosos. Essa variabilidade interanual de chuvas faz com que a Caatinga seja um ambiente dotado de um complexo mosaico vegetacional, com ampla biodiversidade de fauna, flora e de micro-organismos em diferentes classes de solos, sendo seus solos caracterizados pela grande variabilidade entre profundidade, permeabilidade e diferentes topografias (PRADO, 2003; ANDRADE et al., 2009; SANTOS, 2016).

Os solos do semiárido caracterizam-se ainda por serem susceptíveis à erosão/desertificação e/ou baixa disponibilidade de absorção de água (RIBEIRO et al., 2009). Essas propriedades distintas alteram a constituição da comunidade fúngica do solo que é afetada diretamente por diferentes características físicas e químicas, incluindo pH, temperatura, carbono disponível e nitrogênio, sendo esse um dos motivos para que a microbiota edáfica seja considerada como indicadora de impactos ambientais (FLIEBACH et al., 2007; ABARENKOV et al., 2010; STERKENBURG et al., 2015).

A diversidade de micro-organismos em um ambiente desempenha papel fundamental nos processos biogeoquímicos (KENNEDY, 1999). A composição e a atividade desses micro-organismos podem indicar quão bem um ecossistema está funcionando e/ou a capacidade de recuperação causada por distúrbios abióticos. Por isso, os solos são ambientes complexos e considerados um dos principais reservatórios da diversidade biológica do planeta, sendo estimado que em um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos e mais de 10.000 genomas (TORSVIK et al., 1998; BRIDGE & SPOONER, 2001; ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001; ROBE et al., 2003; MUELLER & SCHMIT, 2007; MARON et al., 2011). No entanto, apesar da importância desse complexo ecossistema ainda há uma lacuna quanto à utilização de técnicas que determinem com exatidão a composição da comunidade de fungos, em especial de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que

desempenham importante papel na composição das comunidades vegetais, pois podem funcionar como biofertilizantes, biocontroladores e biorreguladores (SIQUEIRA E KLAUBERG-FILHO, 2000). Entretanto, para o entendimento da funcionalidade dos FMA, técnicas mais precisas de caracterização dos táxons são necessárias, visto que comumente a identificação das espécies é realizada pela caracterização morfológica dos esporos (MARON et al., 2011; RAJENDHARAN & GUNASEKARAN, 2008; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003).

Devido a essa limitação, há pouco mais de três décadas foram introduzidas novas técnicas baseadas em análises moleculares, que proporcionaram maior conhecimento sobre micro-organismos não cultiváveis em meio de cultura (PAN et al., 2010; DELMONT et al., 2011; MARON et al., 2011). Dessa forma, foram desenvolvidos vários protocolos manuais e kits comerciais de extração de DNA de solo que favoreceram o conhecimento mais amplo sobre as comunidades microbianas e identificação de novas espécies, podendo o DNA ser extraído diretamente ou indiretamente do solo, de forma que a lise pode ocorrer na presença de partículas do solo ou pela separação do solo antes da lise, respectivamente (ROBE, 2003; GABOR et al., 2003). Young et al. (2014) relataram que a extração direta tem rendimentos mais altos e um menor potencial de contaminação devido a diminuição nas etapas de preparação que utilizam princípios químicos (por exemplo, NaCl, SDS), térmicos (por exemplo, proteinase K, lisozima) e mecânicos para rompimento celular por meio de “*bead-beating*” (MORE et al., 1994; KOWALCHUK et al., 1998; PICARD et al., 2000), ou combinações, seguidos da purificação do extrato que pode ser realizada por métodos diversos (ROBE, 2003; GABOR et al., 2003).

De acordo com Frotergard et al. (1999) e Kserk e Wellington (1999) os métodos de extração direta de DNA podem sofrer variação quanto à sua eficiência a depender de fatores como: tipo de solo, lise celular e sorção de DNA nas partículas do solo, com adição de pH, matéria orgânica, conteúdo de argila e silte, o que tem sido rotineiramente relatado na literatura (ZHOU et al., 1996; ROOSE-AMSALEG et al., 2001; FORTIN et al., 2004; LAKAY et al., 2007). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos de extração de DNA de amostras de solo visando selecionar o método mais eficiente para o estudo de comunidades de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em diferentes classes de solos representativos da Caatinga.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Caatinga e Solos do Semiárido

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro caracterizado por apresentar forte insolação, temperaturas altas e regime de chuvas escasso, apresentando dois períodos distintos: uma longa estiagem que dura cerca de sete a nove meses; e um período curto chuvoso com duração de três a cinco meses, que refletem sobre as formações vegetais e dos solos, pois a água é o principal agente de intemperismo (SILVA et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; LIMA, 2011).

A variabilidade espacial e temporal da chuva e a baixa retenção da água em solos da Caatinga sugerem uma correlação entre os tipos de vegetação encontradas de acordo com a profundidade, permeabilidade do solo e topografia (FERRAZ, 2013; PRADO, 2003). Assim, comumente pode se encontrar em solos da Caatinga características como: suscetibilidade à erosão/desertificação; baixa retenção de água; e textura franco-siltosa nos horizontes O e A. Além disso, baixos teores de carbono orgânico; presença de transição abrupta, com aumento textural próxima à superfície e baixa condutividade hídrica; elevada saturação por sódio, alto grau de dispersão da fração argila, alta densidade do solo e pequena profundidade relativa (RIBEIRO et al., 2009).

Apesar de compartilharem algumas características em comum, são encontrados cerca de 15 tipos de solos distintos na região do semiárido (JACOMINE, 2002). Porém, Salcedo e Sampaio (2008) apontaram que cinco classes de solos (Latosolos, Argissolos, Neossolos, Luvisolos e Planossolos) cobrem cerca de 80 % das áreas sob Caatinga, embora estejam espacialmente fracionados. Desta forma, os solos que se destacam em termos de expressão geográfica são os Latossolos, Luvisolos, Planossolos, Argissolos e Neossolo. Em baixas proporções, estão os Nitossolos, Chernossolos, Cambissolo, Vertissolo e Plintossolos (ARAUJO FILHO, 2011). Nos ambientes onde predominam a Caatinga hipoxerófila ocorrem com frequência os solos Planossolos, Neossolos Regolíticos, Neossolos Litólicos, Luvisolos e alguns Argissolos e Cambissolos. Porém, em ambiente de Caatinga de Várzea predominam

solos profundos, com alta saturação por bases, das classes dos Neossolos flúvicos e Cambissolos flúvicos (Embrapa, 2012).

A maior parte dos solos da Caatinga está exposta a forte insolação e elevado déficit hídrico, tornando as propriedades físicas, químicas e biológicas altamente dependentes da matéria orgânica do solo, pois a sua estrutura é mantida pela agregação das partículas minerais e orgânicas, mas também fúngicas, em especial os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), que contribuem com o crescimento das hifas e secreção de substâncias, como a glomalina, para o processo de estabilização e formação dos agregados do solo. Sendo esse um dos motivos para que o carbono orgânico e os FMA sejam indicativos de qualidade do solo (ARAUJO et al., 2008; NOBRE, 2014; CORADO NETO et al., 2015). Além disso, mudanças no ambiente e manejo do solo causam alterações no número de propágulos (PAGANO et al., 2011; MELLO et al., 2012), fato que indiretamente pode afetar a agregação e estabilidade do solo.

Andrade et al. (2006) denominaram a dinâmica dos ecossistemas do semiárido como "pulsos de reserva", devido a sazonalidade e variabilidade, fato que contribui para a manutenção da diversidade edáfica nos ambientes da Caatinga, que está diretamente relacionada a precipitação pluviométrica, reservas de água no solo e crescimento da vegetação. Assim, os organismos tem um sistema de adaptação, que permitem sua sobrevivência frente à escassez hídrica, de alimento e elevadas temperaturas do solo (OLIVEIRA e SOUTO, 2011).

2.1.2. Solo e a comunidade microbiana

O solo é um ecossistema indispensável para a manutenção da vida na Terra. As comunidades microbianas presentes nele são responsáveis por regular diversas funções ecológicas de extrema importância, as quais são conhecidas como Funções de Suporte a Vida (FSV). Tais funções incluem: a decomposição da Matéria Orgânica (M.O.), a produção do húmus, a ciclagem de nutrientes, melhoria na agregação do solo, decomposição de xenobióticos, controle biológico, além de serem fonte para engenharia genética (SCHLOTTER et al., 2018). Por outro lado, estas comunidades podem ser influenciadas pela umidade do ar, conteúdo de água do solo e precipitação pluviométrica de forma direta ou indireta, pois estes organismos são constituídos por

cerca de 70 a 90 % de água, necessitando desses elementos para manter suas atividades (DANTAS et al., 2009).

As comunidades microbianas do solo podem ser agrupadas de acordo com os seus tamanhos. A macrofauna é a fração correspondente aos organismos com dimensões maiores que 10 mm, a exemplo das minhocas, cupins e formigas. A mesofauna corresponde a organismos entre 0,2 e 10 mm de tamanho, como os ácaros e colêmbolas, por exemplo. A microfauna consiste em organismos menores que 0,2 mm, como os nematoides e protozoários. Acrescentam-se ainda os micro-organismos caracterizados por não serem capazes de formar tecido verdadeiro (MADIGAN et al., 2016). A estimativa das densidades populacionais e biomassa dos principais representantes dos grupos de organismos classificados por tamanho podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativa de densidades populacionais e biomassa dos principais representantes dos grupos de organismos presentes no ambiente edáfico de acordo com a classificação de tamanho proposta por Madigan et al., (2016).

Grupo	Biomassa (g)	Densidade (nº)
Micro-organismos		
Bactérias	50	1E+14
Fungos	100	1E+11
Algas	1	1E+10
Microfauna (<0,2mm)		
Protozoários	9	1E+10
Nematóides	10	1E+07
Mesofauna (0,2-10mm)		
Ácaros	1	1E+05
Colêmbolas	0,6	1E+04
Enquitríqueos		1E+04
Macrofauna (>10mm)		
Minhocas	50	1E+02
Cupins	4	1E+03
Formigas	0,5	1E+03
Coleópteros	2,5	1E+02
Arachnida	0,5	1E+01
Myriapoda	1,5	1E+01

Considerando a dimensão destes organismos, os solos abrigam uma grande diversidade intra ou interespecífica. Tal diversidade é um importante fator, pois sua complexidade implica diretamente na estabilidade ecológica. A complexidade biológica é resultante da coexistência de interações e, portanto, garante relações diversas. Acrescenta-se ainda, que as limitações bióticas e abióticas contrabalançam a multiplicação do crescimento populacional, promovendo o autocontrole da densidade populacional e gerando equilíbrio (SEUFERT, 2019).

A diversidade pode ser considerada tanto em níveis fenotípicos quanto genotípicos. Em termos fenotípicos são avaliados os descritores morfológicos, enquanto nos genotípicos são avaliadas as diferenças nos materiais genéticos dos organismos. Estima-se que de 0,5 a 1 % dos micro-organismos presentes no solo sejam capazes de crescer *in vitro* através de técnicas de cultivo em meio de cultura. Uma vez que o conhecimento da diversidade morfológica depende em sua maioria de isolamento e cultivo do micro-organismo, estas técnicas possuem limitações que vão desde a dificuldade de desalojar as células até o estabelecimento de condições ótimas de cultivo (LAMBAIS et al., 2005). Tais técnicas restringem o acesso pleno à diversidade biológica das comunidades presentes no solo. Estima-se que em apenas 1 g de solo existam mais de 10^{13} genes, sendo 10^6 distintos entre si, o que evidencia a diversidade genética e redundância funcional no ambiente edáfico, bem como a carência de estudos que consigam acessar profundamente essa diversidade biológica (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006).

2.1.3. Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares no solo

Fungos são micro-organismos pertencentes ao domínio *Eukarya* e com participação significativa em termos de densidade e número de células no solo, perdendo apenas para o domínio *Bacteria* (Figura 1). Estes eucariotos são os principais decompositores da matéria orgânica do solo e desempenham um papel de suma importância, a formação do húmus. Além disso, são os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes, participando ativamente da fertilidade do solo.

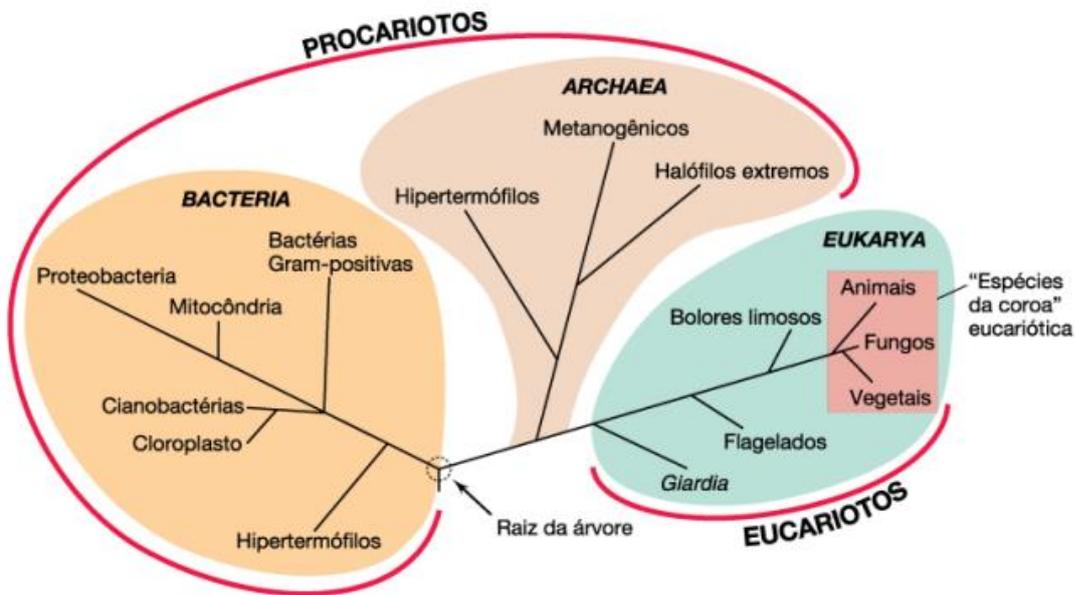


Figura 1. Domínios organizados de acordo com o tipo de rRNA presente nas subunidades ribossomais dos organismos. Fonte: MADIGAN et al., (2016).

Algumas espécies fúngicas podem estabelecer relação de simbiose mutualística com as raízes de plantas, interação conhecida como associação micorrízica. Os Fungos Micorrízicos (FM) representam cerca de 10 % das espécies fúngicas identificadas (BRADY, 2013). A etimologia da palavra micorriza quer dizer “fungos de raiz”, isso porque essa associação cria uma extensão da raiz por meio das hifas fúngicas. Os FM podem ser do tipo: Endomicorrizas (arbusculares, ericoides e orquidóides), Ectomicorrizas e Ectoendomicorrizas (arbutoides e monotropoides), destes, as endomicorrizas arbusculares são as mais estudadas (LEWIS, 2016).

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) pertencem à divisão Glomeromycota e são capazes de realizar associação com mais 90 % das plantas terrestres (KISTNER & PARNISKE, 2002). Os FMAs associam-se simbioticamente às raízes das plantas (Figura 2), que fornecem aos fungos compostos de carbono e lipídeo, em contrapartida, os FMAs beneficiam as plantas, proporcionando maior absorção de nutrientes e água, além de promover retenção de umidade, agregação e estabilidade do solo (SOUZA et al., 2008; SMITH & SMITH, 2012; JIANG et al., 2017). Estas características são especialmente importantes em solos com altos teores de areia, como a classe Neossolo. Nesses solos, as hifas fúngicas exercem efeito físico de

união das partículas e, ainda, secretam polissacarídeos que atuam ativamente na agregação do solo ou estimulam bactérias produtoras de agentes cimentantes (SIQUEIRA et al., 1994), fato que auxilia na diminuição da suscetibilidade dos solos à erosão, porém, podem ser afetados pelos manejos intensivos e inadequados do solo levando a redução de algumas espécies de FMA (SIQUEIRA et al., 1989).

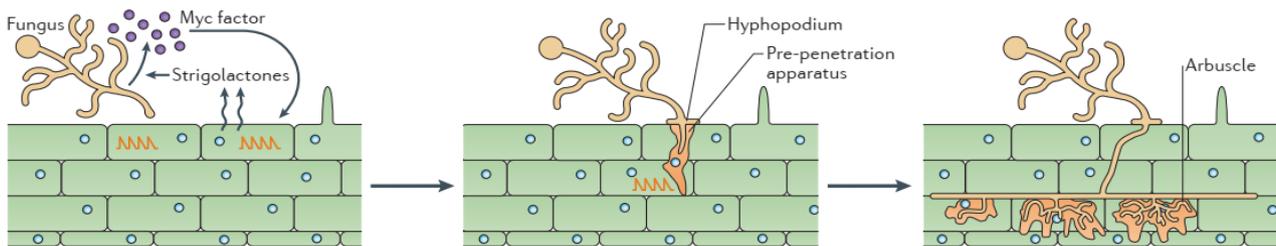


Figura 2. Processo de colonização e estabelecimento da simbiose entre FMA e planta. Fonte: OLDROYD, (2013).

No bioma Caatinga sugere-se que os FMAs exercem papel importante no estabelecimento e manutenção da vegetação, constituindo um possível mecanismo de adaptação de plantas e solos com restrição de nutrientes (MELLO et al., 2012; SOUSA et al., 2013). Embora os FMA tenham ampla distribuição na Caatinga e o papel que estes fungos podem desempenhar seja importante, ainda há uma lacuna quanto à utilização de técnicas que determinem com exatidão a composição da comunidade de FMA, a qual tem sido rotineiramente realizada a partir da caracterização morfológica (MARON et al., 2011; RAJENDHARAN & GUNASEKARAN, 2008; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003). Atualmente, as espécies de FMA descritas são baseadas na análise de isolados que apresentam alta similaridade. Porém, em vários casos a análise de características morfológicas é ineficiente para a caracterização em nível de espécie (NOVAIS et al. 2010), considerando que a identificação dos táxons é baseada nas características estruturais dos esporos.

Devido a essa limitação, há pouco mais de três décadas, foram introduzidas novas técnicas baseadas em análises moleculares, que proporcionaram maior conhecimento sobre micro-organismos não cultiváveis em meio de cultura (PAN et al., 2010; DELMONT et al., 2011; MARON et al., 2011). Estudos moleculares envolvendo o sequenciamento do rDNA (DNA ribossomal) em pesquisas envolvendo FMAs vêm facilitando a identificação e têm contribuindo para a expansão do conhecimento sobre

diversidade e diferenças entre isolados de uma mesma espécie (AVIO et al. 2009). Devido à importância ecológica dos FMAs, é imprescindível ter uma técnica padrão que distinga e identifique espécies que tenham aplicabilidade na agricultura. Portanto, a utilização de técnicas moleculares pode ser útil para esclarecer a identidade e variabilidade de FMAs no bioma Caatinga.

2.1.4. Distribuição de FMA na Caatinga

A divisão Glomeromycota é constituída por cerca de 305 espécies de FMA reconhecidas (GOTO & JOBIM, 2019), representando baixa diversidade para um grupo fúngico que tem registros fósseis de 400 milhões de anos atrás (DOZTLER et al., 2006; 2009; KRINGS et al., 2007). Estes fungos são amplamente distribuídos nos ecossistemas e considerados essenciais para o sucesso evolutivo das plantas terrestres (KARANDASHOV & BUCHER, 2005; BUSCOT, 2015).

Na Caatinga, os FMAs colonizaram cerca de 87 % das plantas, com percentuais, em geral, inferiores a 50 % conforme relatado por MAIA et al. (2010). Segundo Marinho (2018) já foram registradas 144 espécies na Caatinga, o que representa 32,7 % das espécies descritas no mundo e 69,4 % das espécies descritas no Brasil. Embora a ocorrência de FMA seja relativamente documentada neste bioma, poucos trabalhos indicam a classe de solo onde os fungos são encontrados, conforme indicado na Tabela 2.

Yano-Melo et al. (1997) avaliaram quatro diferentes áreas de produção de banana irrigada na região do Vale do São Francisco com o intuito de registrar FMAs associados a cultura. Neste estudo, foram avaliadas duas classes de solo distintas, sendo o Vertissolo a classe que apresentou menor número de espécies de FMA, considerando que em Latossolo foram encontradas 14 espécies com uma média de seis espécies por área.

Na região de Xingó, AL, que tem predominância de solos da classe Planossolo, 24 táxons de FMA foram registrados, com maior representatividade de Acaulosporaceae e Glomaceae (atualmente com representantes em Glomeraceae e Claroideoglomeraceae) (Souza et al., 2003). Alberquerque (2008) verificou a ocorrência de 29 espécies de FMAs em três áreas da Caatinga, demonstrando diferenças na estrutura e na comunidade micorrízica entre as áreas estudadas, as quais foram

determinadas por fatores do solo como pH, textura, alumínio e M.O. Neste trabalho, maior diversidade de FMA (25 táxons) foi observada em Espodossolo, seguida das classes Latossolo e Neossolo que apresentaram 19 táxons no total.

Tabela 2. Diversidade de espécies de FMA na Caatinga em diferentes classes de solo.

Área	Nº Espécies de FMA	Classe de Solo	Região	Referência
Cultivo de banana em área irrigada	5	Vertissolo	Juazeiro - BA	Yano-Melo et al. (1997)
Vegetação nativa	14	Latossolo	Petrolina - PE	Souza et al. (2003)
	24	Planossolo	Xingó - AL	
Vegetação nativa	25	Espodossolo	Caruaru - PE	Albuquerque (2008)
	19	Neossolo	Serra talhada - PE	
Agrossistemas do semiárido	19	Latossolo	Araripina - PE	Sousa (2009)
	16	Neossolo	Patos - PB	
Caatinga não atropizada	16	Cambissolo	Triunfo - PE	Mello (2010)
Mineração Gesseira	36	Latossolo	Araripina - PE	Mergulhão et al. (2010)
Vegetação nativa Floresta úmida	43	Argissolo	Caruaru - PE	Ferreira (2010)
Zona transicional e Caatinga	51	Argissolo	Triunfo - PE	Silva (2013)
Caatinga Strictu Senso, de Areia, Carrasco, Afloramento Rochoso e Caatingas Antropizadas	80	Neossolo	Catimbau - PE	Marinho (2014)
Pomar orgânico irrigado e Vegetação nativa	23	Argissolo	Trairi - CE	Dantas (2015)
Cultivo de caupi e Vegetação nativa	60	Latossolo	Petrolina - PE	Pontes et al. (2017)
Caatinga costeira	30	Neossolo	CLBI - RN	Lima (2018)
Cultivo de Fabaceae e Poaceae	16	Neossolo	Areia - PB	Sosa (2019)

Sousa (2009) e Sosa (2019) avaliaram a diversidade e ocorrência dos FMAs no semiárido Paraibano e apesar de avaliarem áreas distintas, mas na mesma classe de

solo (Neossolo), encontraram quantidade de espécies semelhantes nas áreas de Caatinga estudadas. Em 2010, três trabalhos foram desenvolvidos avaliando a riqueza e diversidade de FMAs em área de Caatinga no estado de Pernambuco, sendo dois deles realizados na Caatinga nativa (MELLO et al.; FERREIRA; 2010) e o terceiro analisando o impacto produzido em áreas de mineração (MERGULHÃO et al., 2010), e em todos os estudos o gênero *Glomus* foi identificado como o mais abundante.

Buscando entender a atividade (estabilidade dos ecossistemas e beneficiamento das plantas e solo) e diversidade de FMA em gradiente ambiental na Caatinga (edáfico e vegetacional), Silva (2013) identificou 51 espécies ocorrentes em solo da classe Argissolo, sendo demonstrada forte correlação entre o tipo de solo e vegetação, influenciando a composição das comunidades. Pontes et al. (2017) conduziram um estudo em classe de solo Argissolo em agrossistema (cultivo de feijão caupi) e vegetação da Caatinga e registraram a presença de 60 espécies de FMA.

Em área de Unidade de Conservação como o Parque Nacional do Catimbau - PE (PARNA Catimbau), Marinho (2014) buscou determinar a diversidade / distribuição da comunidade de FMA, sendo a região caracterizada por apresentar solo do tipo Neossolo Quartzarênico, que se caracteriza por apresentar pouca retenção de nutrientes e água, resistência ao intemperismo e baixa capacidade de agregação de partículas (SOUSA, 2012), possibilitando registrar 80 táxons distribuídos em 16 gêneros. Em dunas costeiras que apresentavam vegetação da Caatinga, foram identificados 30 táxons de FMA em Neossolo (LIMA, 2018).

Na Tabela 2 observa-se que nas classes de solo Vertissolo, Cambissolo, Planossolo e Espodossolo apenas um trabalho foi registrado, nos quais foram identificados em média 5, 16, 24 e 25 espécies, respectivamente. Na classe Latossolo o número médio de espécies de FMA identificado foi de 23, porém, o número de espécies e a comunidade pode variar de acordo com as características do solo, como exemplo o pH, conforme observado por Maia e Trufem (1990) que verificaram a predominância de *Glomus* e *Acaulospora* em ampla faixa de pH (Maia & Trufem, 1990). Para as classes Neossolo e Argissolo este número foi superior, registrando-se 32 e 44,25 táxons de FMA. Estes dados sugerem que potencialmente as classes de solo podem influenciar na diversidade e distribuição de FMA, no entanto, nem todos os trabalhos apresentam identificação da classificação dos solos, impossibilitando

aprofundar o conhecimento sobre a relação da distribuição dos FMA nas classes de solo representativos da Caatinga.

2.2.1. Extração de DNA do solo

Os estudos acerca da diversidade microbiana em solos podem ser agrupados em métodos dependentes e independentes de cultivo. Os métodos dependentes de cultivo consistem na utilização de um meio de cultura rico em nutrientes para isolamento de micro-organismos passíveis de cultivo. Embora tenha menor custo econômico, estes métodos fornecem informações superficiais acerca das comunidades microbianas, pois a avaliação da diversidade utilizada subestima as populações devido a seletividade e adaptabilidade de diferentes micro-organismos em um mesmo meio. Em virtude disso, as metodologias independentes de cultivo vêm sendo desenvolvidas cada vez mais. Dentre essas, análises que consistem na caracterização genotípica de regiões conservadas, como o rRNA e as regiões ITS, têm se intensificado (LAMBALIS et al., 2005).

O RNA é uma molécula com características e funções distintas do DNA. RNAs são constituídos de uma pentose tipo ribose, diferentemente do DNA que possui desoxirribose, e uma base uracila no lugar da timina. Além disso, RNAs apresentam apenas a formação de uma fita simples. Essas moléculas são responsáveis pelo processo de transcrição do DNA. Entretanto, um tipo de RNA presente em ribossomos é responsável pelo processo de tradução – codificação do RNA em proteína – conhecido como RNA ribossomal (TIEDJE et al., 1999; KIRK et al., 2004; HIRSCH et al. 2010). O modelo da estrutura molecular das moléculas de DNA e RNA consta na Figura 3 desta seção.

Os ribossomos são estruturas dotadas de duas subunidades, sendo uma delas menor. Procariotos apresentam as subunidades 50S e 30S e eucariotos apresentam as subunidades 60S e 40S. O interior dessas subunidades resguarda um material genético altamente conservado, por não serem afetados por Transferência Horizontal de Genes (THG), e presente em todos os organismos vivos. Procariotos apresentam um fragmento de RNA em sua subunidade 30S conhecido como 16S rRNA, enquanto eucariotos apresentam o 18S rRNA na subunidade 40S (KIRK et al., 2004).

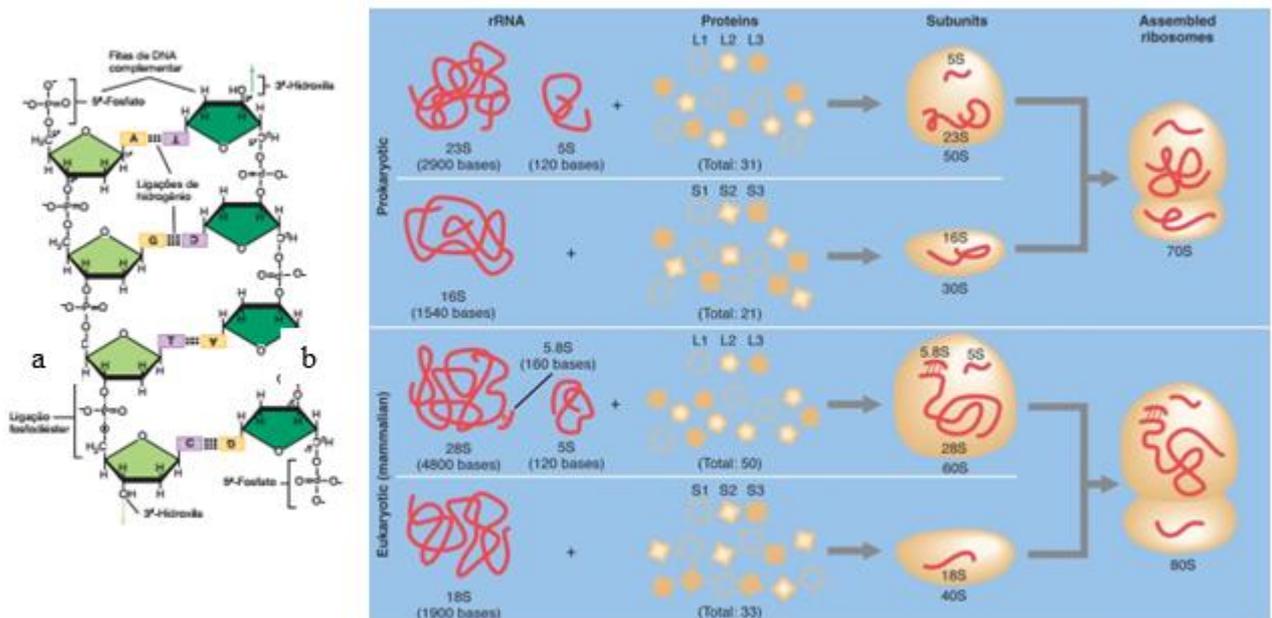


Figura 3. A) Modelo químico da estrutura da molécula de DNA; B) Unidades e subunidades ribossomais de procaríotos e eucariotos e seus respectivos fragmentos de rRNA.

Técnicas baseadas no material genético dos micro-organismos do solo são cada vez mais consideradas como peças-chave para desvendar a “caixa preta” dos solos. O DNA e/ou RNA de micro-organismos pode ser extraído diretamente da amostra de solo, sendo assim chamado de DNA metagenômico. A partir do DNA/RNA extraído do solo é possível realizar análises como: Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sequenciamento de nova geração, análises de microarranjos, entre outras. Para tanto, é essencial que o processo de extração do material genético seja eficiente de modo que possibilite acessar informações acerca das comunidades microbianas de forma íntegra (TIEDJE; ASUMING-BREMPONG; NÜSSLEIN, 1999).

Os métodos de extração de DNA do solo podem utilizar princípios químicos, térmicos e mecânicos para rompimento celular por meio de batimento de esferas (MORE et al., 1994; KOWALCHUK et al., 1998; PICARD et al., 2000), lise usando detergentes (ZHOU et al., 1996) ou combinações. Porém, quando ocorre a extração e purificação diretamente do solo, o DNA liberado dos organismos pode ser adsorvido aos colóides do solo, ocorrendo uma subestimação na quantidade de DNA extraído (PAGET et al., 1992; ROMANOWSKI et al. 1993; LORENTZ & WACKERNAGEL, 1994;

WIDMER et al., 1996); de forma que os métodos devem ser avaliados em termos de quantidade e pureza do DNA ou RNA isolado (FROSTGARD et al., 1999, MILLER et al., 1999). De acordo com Plassart et al. (2012), o tipo de solo também afeta o rendimento do DNA extraído. Estes autores observaram diferenças de rendimento em dois métodos de extração (GnS-GII e ISOm), sendo a maior quantidade de DNA extraído de solos aráveis e calcários, enquanto a menor quantidade foi detectada em solos ácidos e solos arenosos com alta concentração de matéria orgânica e relação C:N. Outros estudos acrescentam ainda que o rendimento de DNA é dependente do tipo de solo, pH, matéria orgânica, conteúdo de argila e silte, visto que esses fatores podem influenciar também na taxa de crescimento microbiano (ZHOU et al., 1996; ROOSE-AMSALEG et al., 2001; FORTIN et al., 2004; LAKAY et al., 2007). Terrat et al. (2012), extraíram maior quantidade de DNA do solo quando estes eram provenientes de solos alcalinos de textura fina com alto teor de carbono orgânico, enquanto a menor quantidade extraída foi detectada em solos arenosos ácidos com alta relação C:N e em solos silte-argiloso alcalinos. Em solos mais argilosos, Martin-Laurent et al. (2001) obtiveram maiores rendimentos de extração e diferenças entre os valores extraídos por dois métodos de extração (MS Laboratório e kit da MoBio), no entanto, em solos arenosos, o rendimento de extração não foi afetado pelo método utilizado, sugerindo que o método e as propriedades do solo interferem na estimativa de DNA por grama de solo.

Por outro lado, o rendimento de DNA não pode ser considerado como fator único de indicação de eficiência na extração uma vez que a extração de DNA ocorre principalmente por meio da lise das células e dos agregados (ZHOU et al., 1996; STACH et al., 2001) e, portanto, diferenças na estrutura da célula microbiana e microhabitat poderá afetar o isolamento do DNA, como também as análises de diversidade (PLASSART et al., 2012). Dessa forma, uma grande quantidade de DNA isolado não garante necessariamente maior riqueza de espécies (STACH et al., 2001).

Variações significativas no DNA extraído através dos protocolos GnS-GII, Sy3 e MoBio foram observadas por Terrat et al. (2012), demonstrando que a utilização de métodos mais rigorosos de lise celulares como o Sy3, que inclui lise mecânica, química, térmica e enzimática, não garantiram grande quantidade de DNA extraído, possivelmente pela inadequada alteração na matriz do solo ou integridade do DNA, sendo o GNS-GII o protocolo que conseguiu maiores extrações.

2.2.2. Comparação de protocolos de extração de DNA do solo

Vários protocolos foram desenvolvidos ao longo das últimas três décadas, porém a eficiência da extração pode variar em função dos tipos de solo. Estudos comparativos avaliando a eficiência dos métodos de extração e purificação do DNA do solo revelam que os métodos são afetados quanto à sua eficiência a depender do tipo de solo, lise celular e sorção de DNA nas partículas do solo (FROSTERGARD et al., 1999; KRSEK & WELLINGTON, 1999).

Cullen e Hirsch (1998) descreveram um procedimento simples e rápido para a extração direta de DNA de solos através da técnica “*bead-beating*”, utilizando a solução tampão SDS e purificação com PVP (polivinilpolipirrolidona) e obtiveram resultados satisfatórios de extração e purificação em solos da Classe Luvisolo (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre metodologias de extração de DNA do solo.

País/cobertura do solo	Classe de solo	Método de extração	Concentração de DNA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ¹⁾	Pureza (Relação de absorvância A260/280)	Referência
Reino Unido	Luvisolo	Hot-SDS Lysis	2,29 - 7,42	1,6	Cullen e Hirsch (1998)
		Bead Beating	7,05 - 15,4	1,7	
		Kit Bio101	1)11,2; (2)35,5; (3)80,3; (4)13,7		
Nova Zelândia	NI	Berthelet (1996) - 1min	(1)70,0; (2)128,6; (3)174,3; (4)90,7	NI	Lloyd-Jones e Hunter (2001)***
		Berthelet (1996) - 5 min	(1)89,9; (2)218,8; (3)299,7; (4)103,0		
		Bruce (1992) (PVP)	(1)60,0; (2)97,6; (3)131,6; (4)96,0		
		Bruce (1992) (QIAGEN)	1)8,3; (2)19,3; (3)31,1; (4)ND		
França	(1) Cambissolo	Kit Mobio	(1)0,19; (2)0,7; (3)0,47	NI	Martin-Laurent et al. (2001)
	(2) Espodossolo	Kit Bio101	(1)0,92; (2)0,79; (3)1,01		
	(3) Cambissolo	MS Laboratory	(1)2,01; (2)0,97; (3)2,52		
Reino Unido	NI	BathE (2001)	5,64	1,26	Stach et al.

		M. Miller (1999)	54,3	1,18	(2001)
		M. Griffiths (2000)	7,48	1,42	
		M. Zhou (1996)	25,9	1,18	
		Kit Ultraclean	3,4	1,31	
		Smalla et al. (1993)	(o) 52,6; (c)94,0	(o) 1,2; (c)1,1	
		Viestel (1995)	(o) 76,0; (c)105,6	(o) 1,2; (c)1,1	
		Saano et al. (1995)	(o) 25,0; (c)67,6	(o) 1,3; (c)1,3	
		Cullen e Hirsch (1998)	(o) 26,4; (c)18,7	(o) 1,2; (c)1,3	
Brasil	Latossolo	Selbach (1998)	(o) 23,4; (c)48,2	(o) 1,4; (c)1,2	Rosa (2006)*
		Tsai (1999)	(o) 50,8; (c)64,7	(o) 1,1; (c)1,0	
		Direito et al.(2001)	(o) 3,4; (c)6,2	(o) 1,4; (c)1,2	
		Wetcher et al. (2003)	(o) 20,8; (c)26,8	(o) 1,2; (c)1,2	
		Método Proposto	(o) 43,4; (c)44,0	(o) 1,1; (c)1,1	
		Kit Mobio	(o) 55,8; (c)44,9	(o) 1,0; (c)1,0	
		Protocolo- IA	1,25	1,72	
		Protocolo- IB	1	1,35	
		Krsek e Wellington	ND	ND	
				ISO	
França	NI	GNS-GII	19,03	NI	Plassart et al. (2012)
		ISOm	26,26		
França	NI	GNS-GII	8,21		
		MOBIO	0,85	NI	Terrat et al. (2012)
		Sy3	1,42		
Brasil	NI	Selbachm - Direito et al. (2001)	480 - 245**	1,5 - 1,6	Freitas et al. (2018)

*Quantificado sem a purificação; **quantificado no espectrofotômetro; *** = testado quatro diferentes solos ; ND = Sem determinação; NI = NÃO INFORMADO; (o) = manejo orgânico, c) = manejo convencional

Lloyd-Jones e Hunter (2001) testaram a eficiência de três métodos de extração direta de DNA (Kit Mobio101, Berthelet (1996) e Bruce (1992)) em quatro diferentes solos da Nova Zelândia, classificados pela USDA *soil taxonomy* como Typic Endoaqualf com cultivo plantas anuais, Typic Hapludand com pasto, Typic Hapludand floresta de *Beech* e Typic Hapludalf com plantação de pinheiro, e obtiveram concentrações das amostras de DNA variando entre 11,2 e 299,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo. Os autores sugeriram que este resultado pode ter sido influenciado por procedimentos de extração, pois o método de *bead-beating* foi utilizado de forma bastante rigorosa e favoreceu a perda de DNA em solos com alta presença de argilas alofanas. Por outro

lado, o método de Berthelet possibilitou obtenção de maior quantidade de DNA, seguido pelo método de Bruce com purificação em Polivinilpolipirrolidona (PVP), ao contrário do kit FastDNA Bio101 que proporcionou menores quantificações nos quatro solos avaliados. Além disso, foi observado que fatores edáficos como carbono orgânico do solo (mean $r = 0,97$, $P = 0,03$) e carbono da biomassa ($r = 0,96$, $p = 0,05$) tiveram correlações positivas com a extração. Os autores sugeriram que solos argilosos podem requerer estratégias mais rigorosas de purificação visando à remoção de ácidos húmicos, visto que os mesmos atuam como inibidores na extração de DNA, refletindo no rendimento obtido.

Martin-Laurent et al. (2001) utilizaram três solos, sendo dois *Eutric calcaric cambisol* (de duas regiões distintas) e o *Podzol* para avaliar a extração do protocolo MS Laboratory comparada a dois kits comerciais (Mobio e FastDNA Bio101) e constataram que o método de extração pode afetar a estimativa de abundância e composição das comunidades microbianas do solo, bem como as propriedades inerentes ao solo podem afetar o rendimento da extração. Além disso, os autores observaram que o protocolo MS Laboratory apresentou melhor rendimento na extração de DNA em relação aos kits avaliados (Tabela 3).

Stach et al. (2001) compararam cinco diferentes métodos de extração (Ultraclean[®] kit MoBio; método de Bathe; método modificado de Miller et al., (1999); método modificado de Griffiths et al., (2000); e o método modificado de Zhou et al., (1996)) e purificação direta de DNA em solo argiloso por quatro diferentes métodos (agarose em gel, cromatografia em coluna, mini-coluna da Wizard[®] DNA e por meio do método de Mendum (1999)), no qual obtiveram valores de concentração (2,91 a 4,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e pureza (A260/280 entre 1,18 – 1,42) utilizando o Ultraclean[®] Kit Mobio. Em Latossolo, Rosa (2006) comparou dez protocolos de extração e também obteve baixo rendimento nas extrações realizadas.

Direito (2001) e Rosa (2006) modificaram o protocolo de Selbach (1998), desenvolvido para extração de solos de clima temperado, adicionando PVP (4 %) ao tampão de extração Dodecil sulfato de sódio (SDS) e aumentando a concentração de lisozima para 20 mg/mL, respectivamente, e apesar das modificações realizadas os valores de pureza (A260/280) das amostras de solo classificado como Latossolo variaram entre 1,2 – 1,4. Recentemente, Freitas et al. (2018) também modificaram o protocolo de Selbach aumentando a concentração do tampão SDS para 10 % e

substituindo o Cloreto de Cálcio (CaCl_2) por Clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 24:1) e obtiveram valores de pureza (A_{260}/A_{280}) próximos a 1,6 extraíndo amostras de solos coletadas em Unaí – MG em dois diferentes ambientes, mata ciliar e área de plantio de feijão.

Maciel et al. (2009) observaram que a adição de 4,5 mL de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1) na etapa de remoção de proteínas permitiu obter valores de pureza (A_{260}/A_{280}) de 1,72 no Protocol-IA em comparação ao Protocol-IB que utiliza Isotiocianato de guanidina no tampão de extração. No entanto, as amostras apresentaram concentrações muito baixas variando de 1,25 a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo, sendo sugerido pelos autores que tal fato pode estar relacionado aos solos estarem contaminados com petróleo o que possivelmente diminuiu a microbiota presente no tipo de solo avaliado.

Com o intuito de padronizar protocolos de extração do DNA do solo, Philippot et al. (2010) propuseram à Organização Internacional de Normalização (ISO) um método de extração direta do DNA para amostras do solo baseado no protocolo proposto por Martin-Laurent et al (2001). Esse método consiste na extração de DNA por meio de duas lises o *bead beating* com uso de esferas de vidros com diâmetros de 106 μm e 2 mm (lise mecânica) e o aquecimento em banho-maria (lise térmica).

O protocolo GNS-GII consiste principalmente na intensificação da etapa de lise mecânica através da adição de esferas de sílica, cerâmica e vidro ao tampão de extração e do uso do disruptor FastPrep. Em análises comparativas de protocolos de extração por métodos de bancada, Plassart et al. (2012) demonstraram que o protocolo GNS-GII apresentou melhor eficiência na extração em relação ao método ISO e foi equivalente ao ISOM quando utilizado para estudos que visavam análises de comunidades bacterianas e fúngicas. Por outro lado, o protocolo Sy3 possui etapas de lise mecânica e química, diferindo dos demais por possuir uma etapa de lise enzimática com proteinase K para purificação de materiais exógenos, além de etapas que utilizam ciclos alternados de congelamento das amostras em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria (lise térmica) (MARON et al., 2007; TERRAT et al., 2012), as quais possivelmente favorecem a liberação do DNA presente na membrana plasmática dos fungos, que é envolvida por uma parede celular rígida.

2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Extração de DNA do solo

Em 1983, Kary Mullis revolucionou a biologia molecular com o desenvolvimento de uma técnica capaz de amplificar de forma exponencial sequências específicas de DNA/RNA a partir de amostras complexas. A técnica consiste em ciclos sucessivos de aquecimento (desnaturação) e resfriamento (renaturação) aplicados ao DNA/RNA, além da utilização de reagentes que proporcionam condições adequadas de operação enzimática: DNA alvo, iniciadores (*primers*), nucleotídeos, enzima *Taq* Polimerase e $MgCl_2$ (cofator de atuação da *Taq* DNA polimerase) (DORADO et al., 2019).

A extração de DNA, purificação e amplificação são as três principais etapas visando à preparação de amostras para sequenciamento (POLLOCK et al. 2018). As impurezas por ácidos húmicos e proteínas são consideradas como os principais inibidores da amplificação por PCR (SCHNEEGURT et al. 2003; SCHRADER et al. 2012) em amostras de solo. Nesse sentido, Arbeli e Fuentes (2007) adicionaram uma etapa de purificação ao DNA extraído de amostras de solo pelo Kit Mobio e observaram que essa modificação melhorou a amplificação das amostras na PCR.

Zielinska et al. (2016) testaram oito kits comerciais comumente utilizados em extrações de amostras de solo com intuito de comparar a eficiência, qualidade e diversidade do material genético extraído e em todos os protocolos utilizados foi observada a amplificação do DNA e ausência de inibidores na PCR. Porém, muitos estudos (FEINSTEIN et al. (2009); TERRAT et al. (2012); VISHNIVETSKAYA et al. (2014); WUST et al. (2016); ZIELINSKA et al., 2016) demonstram que o uso de métodos distintos de extração de DNA pode resultar em padrões de banda muito diferentes, conforme observado na figura 4. .

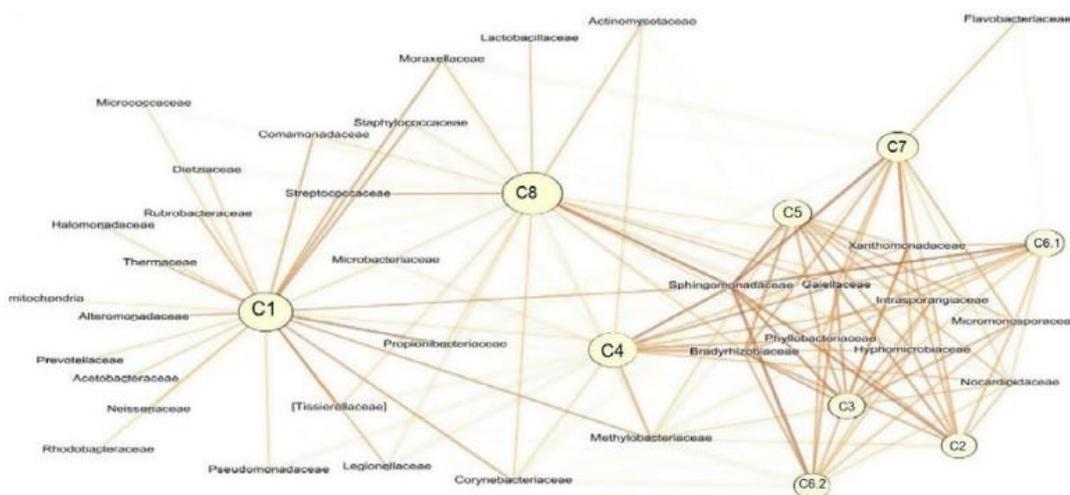


Figura 4. Esquema GEPHI apresentando o agrupamento dos kits de extração e as abundâncias relativas de microorganismos no nível da família no DNA de amostras obtidas com um determinado kit. A abundância é mostrada como cor intensa e a maior agregação de kits sugere estruturas microbianas semelhantes. Fonte: ZIENLINSKA et al., (2016).

Dessa forma, a seleção do método de extração é uma etapa de grande importância, pois pode influenciar nos resultados e na sua interpretação (ZIENLINSKA et al., 2016). Além disso, pequenas diferenças na parede celular e nas estruturas da membrana celular dos microorganismos podem afetar a eficiência do protocolo de extração (CARRIGG et al., 2007; KRSEK & WELLINGTON, 1999). Islam et al. (2012), observaram que diferentes protocolos de extração podem obter quantidade e qualidade variadas de DNA. Stach et al. (2001) realizaram PCR-SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) para avaliar a influência dos métodos de extração e purificação de DNA na diversidade de sequências e observaram que obter um maior rendimento na extração não implica em maior diversidade de sequências. Em geral, os resultados da análise molecular de comunidades microbianas não dependem apenas da extração de DNA, como também de fatores relacionados à PCR, como a seleção de “*primers*” específicos e da otimização de reagentes e condições da reação, principalmente no que se refere à concentração de DNA utilizada, temperatura de anelamento dos *primers* e qualidade da enzima Taq Polimerase (TSAI & OLSON, 1991; ZHOU et al., 1996; MILLER et al., 1999).

Sequências espaçadoras transcritas internas (ITS) têm sido amplamente utilizadas para taxonomia molecular (REDECKER, 2000; RENKER et al., 2006) e identificação de comunidades fúngicas. No entanto a escolha da região alvo e o par de *primers* podem

influenciar na análise dessas comunidades (KOHOUT et al., 2014). O uso de *primers* ITS para a identificação de FMA tem demonstrado uma ampla variação entre as espécies (SANDERS et al., 1995 LLOYD-MACGILP et al., 1996). Simon et al. (1992) e Helgason et al. (1998) desenharam *primers* específicos para FMA, porém não conseguiram obter amplificação para todas as espécies do grupo (CLAPP et al., 1995; HELGASON et al., 1999). Geel et al. (2014) avaliaram a *performance* de seis pares de *primers* específicos para FMA e observaram que a melhor combinação de *primers* (NS31 – AML2) permitiu a amplificação de para praticamente todas as espécies do grupo. No entanto, ainda existe uma grande lacuna de informações moleculares acerca da estrutura real e caracterização dessa comunidade microbiana, especialmente em solos da Caatinga,

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de solos

A coleta das amostras de solo foi realizada em maio de 2019 na região do Vale do São Francisco (Figura 5). Foram coletadas as sete principais classes de solo ocorrentes na região (Latosolo, Neossolo, Cambissolo, Argissolo, Luvisolo, Planossolo e Vertissolo), de acordo com a classificação de Santos (2016), que representa solos da região do semiárido em áreas de Caatinga nativa. Sendo coletado nas dependências do Instituto Federal de Pernambuco (unidade Sertão) os solos Latossolo (-9.336344, -40.697367), Luvisolo (-9.335781, -40.693629) e Cambissolo (-9.335097, -40.693917); na unidade da Universidade do Vale do São Francisco foram coletado as classes Argissolo (Argissolo), Neossolo (-9.321063, -40,541952) e Planossolo (-9.323225, -40.545467); e na Fazenda Ebrax Exportadora Ltda., que fica localizada em Juazeiro – BA, foi coletada a classe de solo Vertissolo (9.374793, -40.331437). Para cada tipo de solo foram coletadas três amostras compostas, formadas por três amostras simples, com uma profundidade de até 20 cm. As amostras foram peneiradas em peneira de < 2 mm, sendo retiradas alíquotas de 50 g que foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C até a extração de DNA. Para as análises químicas, os solos foram destorroados, secos a sombra e passados em peneiras de 5 mm. Os parâmetros físico-químicos mensurados foram: textura, pH, carbono orgânico total, sódio, potássio, fósforo, alumínio, cálcio e magnésio, de acordo com o manual de métodos de análise de solos (DONAGEMA et al., 2011).



Figura 5. Pontos de coleta das amostras de solos: A: Latossolo, Luvissole e Cambissolo; B: Neossolo, Argissolo e Planossolo; C: Vertissolo.

3.2 Análises Físicas

3.2.1 Granulometria

Para dispersão das amostras foram pesados 20 g de solo (TFSA) em um Erlenmeyer e adicionado 100 mL de água deionizada. Em seguida, foram adicionados 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) e o volume foi completado para 150 mL. As amostras foram agitadas por 16 horas a 50 rpm.

Após as 16 horas no agitador, as amostras foram peneiradas em peneira de malha de 0,053 mm, o material retido foi lavado com água deionizada e transferido para uma proveta, não deixando ultrapassar o volume final de 1 L. Quando necessário, o volume da proveta foi completado com água deionizada até 1 L. A areia retida na peneira foi transferida para uma lata seca e limpa, previamente tarada e identificada. O excesso da água foi eliminado e as amostras foram secas em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após a retirada da estufa, as amostras foram transferidas para dessecador e pesadas em balança semianalítica para verificar o peso da areia total.

Para obter os valores de argila e silte, foi medida a temperatura da sedimentação e as amostras foram agitadas manualmente por 1 minuto. Em seguida, foi pipetado 25 mL da suspensão de silte + argila em um recipiente previamente pesado e tarado, o qual foi colocado em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foi aguardado o tempo de sedimentação da fração silte, conforme a equação de Stokes, após a agitação da primeira amostra. Após a sedimentação, foi inserida uma pipeta a 5 cm de profundidade e pipetado 25 mL da suspensão de argila. A alíquota foi transferida para um béquer seco, limpo e previamente tarado, o qual foi levado para secagem em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas. As amostras

foram transferidas para dessecador e pesadas em balança analítica. Nesta etapa, foi realizada a prova em branco para calcular o valor do dispersante.

Os cálculos foram realizados seguindo as seguintes equações: % de areia grossa = $(PDA - PAF) \times 5$; % de silte = $100 - (\% \text{ de A} + \% \text{ de argila})$; % de argila = $((PA + \text{dispersante}) - PD) \times 100$ onde: PA = peso da argila; PD = peso do dispersante; PDA = peso das areias; PAF = peso da areia fina; A = areia.

3.3 Análises Químicas

3.3.1 pH em água

A medição do pH ocorreu por meio de eletrodo combinado imerso em suspensão solo: líquido (água). Foi transferido 10 g de solo para um copo plástico de 50 mL. Adicionou-se 25 mL de água, as amostras foram agitadas com bastão de vidro por 1 minuto e deixadas em descanso por uma hora. Antes de efetuar a leitura, as amostras foram agitadas brevemente para homogeneização e os eletrodos foram mergulhados na suspensão para a leitura do pH.

3.3.2 Carbono Orgânico

A análise do carbono orgânico foi realizada através da oxidação da matéria orgânica com dicromato de potássio em meio sulfúrico e o excesso de dicromato de potássio foi titulado com solução padrão de sulfato ferroso amoniacal (sal de Mohr). Aproximadamente 10 g de solo foram pesadas, trituradas em cadinho e foi retirada uma alíquota de 0,5 g do solo triturado, o qual foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL. Foi adicionado 5 ml da solução de dicromato de potássio (0,0667 M) e 10 mL de ácido sulfúrico, esperou a solução esfriar e foi adicionado 80 mL de água e 1 mL de ácido fosfórico. Foram adicionadas 3 gotas da solução indicadora difenilamina. As amostras foram tituladas com solução de sulfato ferroso amoniacal $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até a alteração da coloração (de azul para o verde). O número de mililitros gastos foi anotado e em seguida foi calculado o valor da matéria orgânica pela fórmula: $M.O. = ((V_b - V_m) \times f \times 0,003 \times 1,33 \times 1,724 \times 1.000) / V_{\text{solo}}$; onde $f = (40/\text{volume do sulfato ferroso gasto na prova em branco})$; V_b = volume gasto de sulfato ferroso na prova do branco; V_m = volume titulado na amostra; V_{solo} = volume do solo medido em cm^3 ; 1,33 = fator de correção para oxidação; 1,724 = fator proposto por Van Bemmelen para converter o teor de carbono

orgânico em teor de matéria orgânica; 1.000 = fator de conversão de cm^3 para dm^3 de solo.

3.3.3 Sódio e Potássio

Para determinação dos teores de potássio e sódio foi realizada a extração com solução diluída de ácido clorídrico e posterior determinação com espectrofotometria de chama. Foram pesados 10 g de solo em um erlenmeyer de 200 mL e foi adicionado 100 mL da solução de ácido clorídrico ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). O erlenmeyer foi vedado com plástico filme e levado para mesa agitadora para agitar várias vezes ao longo do dia. Depois da última agitação, as amostras ficaram em repouso *overnight*. O sobrenadante foi filtrado e avaliado para determinação dos teores de sódio e potássio em fotômetro de chama, utilizando amostras com ou sem diluição. Os teores foram calculados de acordo com as fórmulas: $\text{Na (cmolc/kg)} = L \times \text{diluição} \times f_{\text{Na}}$; $\text{K (cmolc/kg)} = L \times \text{diluição} \times f_{\text{K}}$.

3.3.4 Fósforo Solúvel

A análise de fósforo solúvel foi realizada pela leitura da formação de complexo fósforo-molibdico obtida após redução do molibdato com ácido ascórbico e determinado por EAM. Foram pesados 5 g de solo em erlenmeyer de 125 mL adicionados 50 mL de solução extratora ($\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,0125 \text{ mol L}^{-1}$). Os erlenmeyers foram agitados durante 5 minutos e as amostras foram deixadas para decantar *overnight*. Após a decantação, foi pipetado 25 mL do extrato em um recipiente plástico. Foram retirados 5 mL desse extrato e transferidos para um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída e aproximadamente 30 mg de ácido ascórbico em pó, como redutor. As amostras foram agitadas manualmente de 1 a 2 minutos e incubadas em temperatura ambiente por uma hora até o desenvolvimento da cor azul para posteriormente fazer a leitura da densidade ótica no fotocolorímetro, usando filtro vermelho (comprimento de onda de 660 nm). Os teores de fósforo foram determinados por meio da equação: $\text{P (g/kg)} = L \times F_p \times 10$, onde L significa o valor da leitura da amostra no fotocolorímetro, F_p o coeficiente angular da curva que se obtém pela determinação da leitura dos padrões e o valor 10 significa a diluição que a amostra sofreu.

3.3.5 Alumínio trocável

A determinação do alumínio trocável foi realizada através da extração com solução KCl 1 mol L⁻¹ e determinação volumétrica com solução diluída de NaOH. Foram pesados 7,5 g de solo em um erlenmeyer de 250 mL e foi adicionado 150 mL de uma solução de KCl 1 mol L⁻¹. O erlenmeyer foi vedado com plástico filme e levado para mesa agitadora para agitar várias vezes ao longo do dia. Depois da última agitação, as amostras foram deixadas em repouso *overnight*. Foi transferido 50 mL do sobrenadante para um erlenmeyer de 200 mL, adicionadas 3 gotas do indicador azul de bromotimol e as amostras foram tituladas com solução de NaOH 0,025 1 mol L⁻¹ até a coloração verde-azulada persistente. Os teores foram calculados de acordo com a fórmula: Al trocável (cmolc/kg) = mL NaOH.

3.3.6 Cálcio e Magnésio

A determinação do Cálcio e Magnésio foi realizada por meio da extração com solução KCl 1 mol L⁻¹ e determinação complexiométrica em presença dos indicadores negro de eriochromo e murexida. Foram pesou 7,5 g de solo em um erlenmeyer de 250 mL e adicionados 150 ml de solução de KCl 1 mol L⁻¹. Os erlenmeyers foram vedados com plástico filme e levados para mesa agitadora para agitação por várias vezes ao longo do dia. Depois da última agitação, as amostras foram deixadas em repouso *overnight*. Foram pipetados 50 mL do sobrenadante para um erlenmeyer de 200 mL e adicionados 6,5 mL do coquetel tampão e 4 gotas do indicador *eriochrome black*. As amostras foram tituladas imediatamente com a solução de EDTA 0,0125 mol L⁻¹ até a alteração da coloração vermelho-arroxeadada para azul puro ou esverdeada (com esta titulação são determinados conjuntamente (Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺)). O volume de EDTA utilizado foi anotado para determinação da quantidade de Cálcio e Magnésio presentes nas amostras foi calculada conforme a fórmula: Ca + Mg (cmolc/kg) = mL EDTA.

3.4. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia (Univasf) e de Biotecnologia (Embrapa Semiárido) utilizando aproximadamente 0,5 gramas de solo e cinco métodos distintos: 1) Kit MOBIO (Power Soil Isolation Kit®); 2) GnS-GII; 3) ISOm 4) Sy3; e 5) SELm, conforme pode ser observado na Figura 6. O método da MOBIO, GnS-GII, ISOm e SELm são baseados em lises mecânicas (*bead-beating*) e químicas. Por sua

vez, o Sy3 baseia-se em uma combinação de lises mecânicas, químicas (SDS), térmicas (ciclo de congelamento e descongelamento) e enzimáticas (proteínase K) de células.

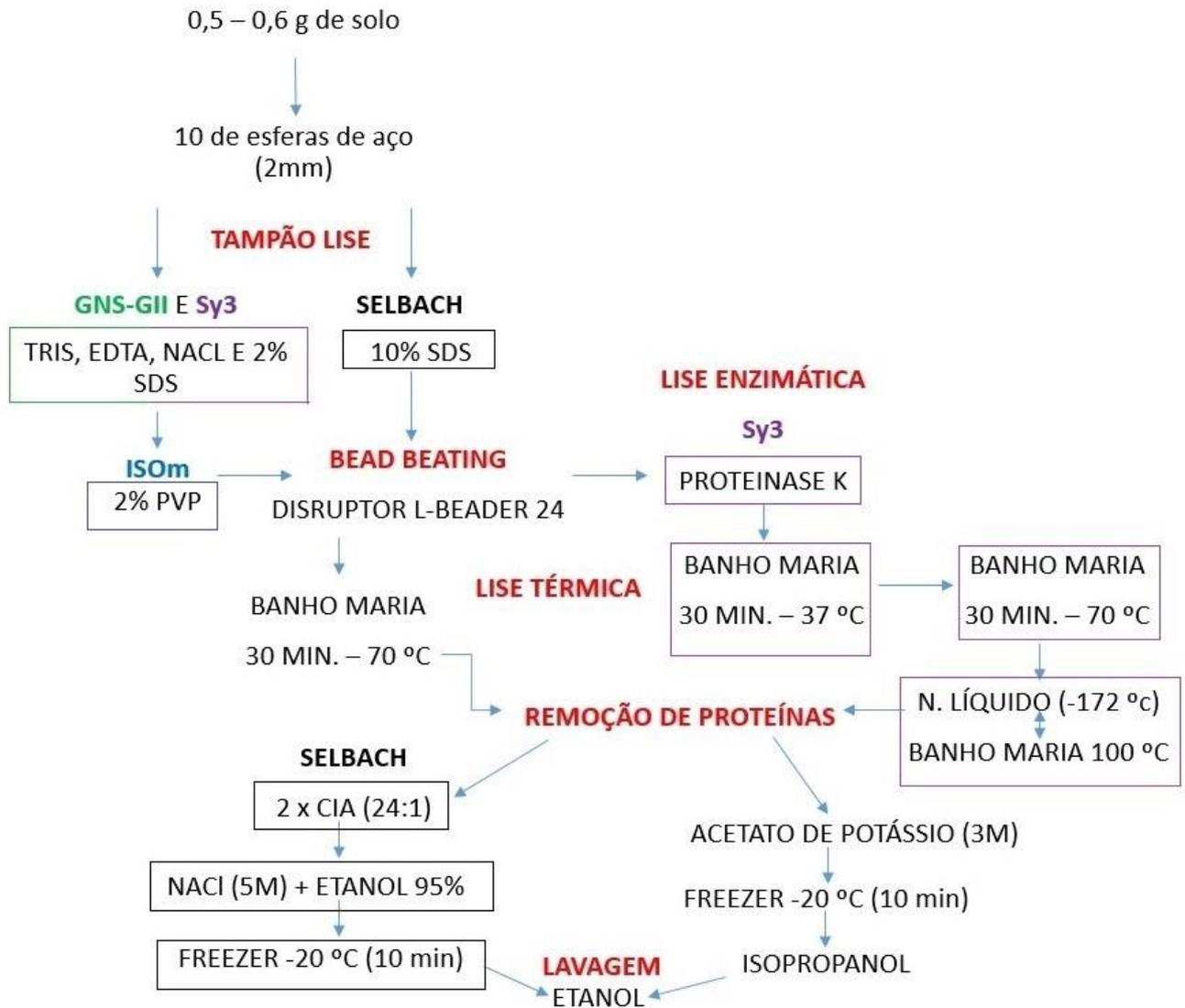


Figura 6. Fluxograma de execução dos protocolos manuais de extração de DNA utilizados.

1) Kit MOBIO – A extração com o Kit da MOBIO foi realizada conforme as recomendações do fabricante, com as seguintes modificações: (1) Adição de uma etapa de lise térmica e aumento no tempo de lise mecânica e agitação das amostras em vórtex, favorecendo a lise celular e liberação do DNA; (2) Adição de mais uma etapa de lavagem das amostras em solução de etanol visando retirar contaminantes; (3) Redução do volume da solução de eluição para 60 µl, resgate do eluato e adição à membrana da coluna,

auxiliando na remoção de resíduos de DNA ainda aderidos à membrana e aumentando a concentração das amostras.

2) GnS-GII - Este protocolo foi desenvolvido pela GenoSol (http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol) e neste trabalho foram realizadas pequenas modificações no protocolo original, conforme descrição posterior. As amostras de solo foram pesadas em tubos de 2 mL, foram adicionadas dez esferas de aço de 2 mm de diâmetro e 1 mL de uma solução tampão contendo Tris 100 mM (pH 8,0), EDTA 100 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM e dodecil sulfato de sódio 2% (p/v). As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vórtex e inseridas em um Disruptor L-Beater 24 (Loccus Biotecnologia®) para promover a lise mecânica utilizando quatro ciclos de agitação por 20 segundos com velocidade de 5 m/s, com intervalos de descanso de 20 segundos entre cada ciclo.. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos a 70 °C e centrifugadas a 7.000 xg por 5 minutos a 20 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos de 2 mL, sendo adicionado acetato de potássio 3 M (pH 5,5) ao equivalente a 1/10 do volume de sobrenadante retirado. As amostras foram incubadas por 10 minutos em freezer (-20 °C) e centrifugadas a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL, foi adicionado um volume de isopropanol gelado e realizada nova centrifugação a 14.000 xg por 5 minutos a 4°C. Por fim, os sobrenadantes foram descartando-se os “*pellets*” foram lavados com etanol 70 % e os DNAs foram ressuspendidos em 50 microlitros de água ultrapura.

3) ISOm - O protocolo ISO foi descrito por Martin-Laurent et al. (2001) e a etapa de lise foi modificada por Plassart et al. (2012) e neste trabalho foram realizadas pequenas modificações no protocolo original, conforme descrição posterior. As amostras de solo foram pesadas em tubos de 2 mL, foram adicionadas dez esferas de aço de 2 mm de diâmetro e 1 mL de uma solução tampão contendo Tris 100 mM (pH 8,0), 100 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM NaCl, 2 % (p/v) polivinilpirrolidona (40 g/mol) e 2 % (p/v) de dodecil sulfato de sódio. As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vórtex e inseridas em um Disruptor L-Beater 24 (Loccus Biotecnologia®) para promover a lise mecânica utilizando quatro ciclos de agitação por 20 segundos com velocidade de 5 m/s, com intervalos de descanso de 20 segundos entre cada ciclo. Posteriormente, as amostras

foram incubadas em banho-maria por 30 minutos a 70 °C e centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 20 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos de 2 mL, sendo adicionado acetato de potássio 3 M (pH 5,5) equivalente a 1/10 do volume de sobrenadante retirado. As amostras foram incubadas por 10 minutos em freezer (-20 °C) e centrifugadas a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL, foi adicionado um volume de isopropanol gelado e realizada nova centrifugação a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Por fim, os sobrenadantes foram descartados, os “*pellets*” foram lavados com etanol 70 % e os DNAs foram ressuspensos em 50 microlitros de água ultrapura.

4) Sy3 – O protocolo Sy3 foi otimizado por Maron et al. (2005) e neste trabalho foram realizadas pequenas modificações no protocolo original, conforme descrição posterior. As amostras de solo foram pesadas em tubos de 2 mL, foram adicionadas dez esferas de aço de 2 mm de diâmetro e 1 mL de uma solução tampão contendo Tris 100 mM (pH 8,0), EDTA 100 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM e dodecil sulfato de sódio 2% (p/v). As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vórtex e inseridas em um Disruptor L-Beater 24 (Loccus Biotecnologia®) para promover a lise mecânica utilizando quatro ciclos de agitação por 20 segundos com velocidade de 5 m/s, com intervalos de descanso de 20 segundos entre cada ciclo. Para etapa de lise enzimática, foram adicionados 20 microlitros de proteinase K (20 mg.ml⁻¹, SIGMA) por amostra. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos, e levadas ao banho-maria por 30 minutos a 37 °C, e em seguida, por 30 minutos a 70 °C, com homogeneização em vórtex a cada 15 minutos. Na etapa de lise térmica, as amostras foram incubadas três vezes por 30 segundos em nitrogênio líquido (-172 °C) e em água fervida (100 °C) alternadamente, sendo posteriormente centrifugadas a 7.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos de 2 mL, sendo adicionado acetato de potássio 3 M (pH 5,5) equivalente a 1/10 do volume de sobrenadante retirado. As amostras foram incubadas por 10 minutos em freezer (-20 °C) e centrifugadas a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL, foi adicionado um volume de isopropanol gelado e realizada nova centrifugação a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Por fim, os sobrenadantes foram descartados, os “*pellets*” foram lavados com etanol 70 % e os DNAs foram ressuspensos em 50 microlitros de água ultrapura.

5) SELBACHm (SELM) - O procedimento foi descrito por Selbach (1998), modificado por Rosa (2006) e Freitas et al. (2018) neste trabalho foram realizadas várias modificações no protocolo original, conforme descrição posterior. As amostras de solo foram pesadas em tubos de 2 mL, foram adicionadas dez esferas de aço de 2 mm de diâmetro e 1 mL de uma solução tampão contendo apenas 10 % de dodecil sulfato de sódio (p/v). As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vórtex e inseridas em um Disruptor L-Beater 24 (Loccus Biotecnologia®) para promover a lise mecânica utilizando quatro ciclos de agitação por 20 segundos com velocidade de 5 m/s, com intervalos de descanso de 20 segundos entre cada ciclo. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos a 70 °C e centrifugadas a 7.000 xg por 5 minutos a 20 °C. Os sobrenadantes foram coletados, transferidos para novos tubos de 2 mL, foi adicionado um volume de CIA (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Esta etapa foi realizada por duas vezes. Os sobrenadantes foram novamente coletados, transferidos para novos tubos de 2 mL e foi adicionado NaCl (5M) equivalente a 1/10 do volume de sobrenadante retirado e dois volumes de etanol 95 %. As amostras foram incubadas por 30 minutos em freezer (-20 °C) e centrifugadas a 10.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Por fim, os sobrenadantes foram descartados, os "*pellets*" foram lavados com etanol 70 % e os DNAs foram ressuspensos em 50 microlitros de água ultrapura.

3.5. Purificação

As amostras extraídas pelos métodos manuais foram submetidas a uma etapa de purificação utilizando a coluna do PCR Purification Kit (CELLCO, DPK-1065), conforme etapas propostas pelo fabricante: 1) Preparação da amostra padrão; 2) Ativação da coluna; 3) Carregamento da coluna; 4) Lavagem da coluna; 5) Eluição; visando à retirada de contaminantes como ácidos húmicos e restos celulares (proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos) que podem prejudicar a determinação da concentração, pureza e amplificação do DNA genômico através da PCR.

3.6. Avaliação da qualidade e quantificação das amostras de DNA

Após a etapa de purificação, as amostras foram avaliadas quanto a sua integridade por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com Brometo de etídio em corrida realizada a 80 V, 100 mA por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit® (Life Technologies) para determinação da pureza e concentrações, respectivamente. Por fim, os DNAs foram armazenados em ultrafreezer -80 °C.

3.7. PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em equipamento LineGene 9660 modelo FQD-96A (Bioer®), utilizando triplicatas técnicas e sistema de detecção SYBR Green, seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. As curvas de *melting* foram analisadas em 65 – 95 °C por 20 minutos após os 40 ciclos. Dois pares de *primers* foram selecionados na literatura visando amplificação para fungos (ITS4/ITS86F; White et al. (1990) e Rezácová et al. (2016)) e para FMA (NS31/AML2; Simon et al. (1992), Lee et al. (2008) e Van Geel et al. (2014)). As reações foram realizadas contendo 5 µl do GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega), 1 µl de um *bulk* de DNA genômico (10 ng/µl) composto por triplicatas biológicas coletadas em cada solo, 1 µl de cada par de *primer* (5 µM) e 3 µl de água ultrapura, em um volume final de 10 µl.

3.8. Análises estatísticas

As variáveis analisadas (características físico-químicas, quantidade e pureza do DNA) foram submetidas à análise de variância, e quando significativas, foram comparadas por teste de médias a 5 % de probabilidade. A análise de permutação multivariada (PERMANOVA) foi realizada no software Statistica visando verificar se houve efeito dos parâmetros físico-químicos do solo sobre o rendimento (quantidade e pureza) do DNA.

4. RESULTADOS

4.1. Análises das características físico-químicas dos solos testados

Os resultados das análises químicas e granulométricas das classes de solos testadas são apresentados nas Tabelas 4 e 5. Foram observadas algumas diferenças entre as classes de solos, especialmente quanto ao pH, potássio (K^+), matéria orgânica (M.O.), fósforo (P) e cálcio e magnésio (Ca+Mg). Porém, não houve diferença significativa com relação ao sódio (Na^+) e ao alumínio (Al^{+3}).

Tabela 4. Caracterização química de diferentes classes de solos com vegetação nativa da Caatinga.

	pH	Na^+	K^+	Al^{+3}	Ca+Mg	P	M.O.
		cmol _c dm ⁻³				(mg.dm ⁻³)	(g/kg)
Neossolos	5,44 c	11,0 a	3,7 c	0,10 a	2,88 d	7,30 c	1,39 b
Planossolos	5,46 c	8,7 a	9,0 bc	0,22 a	3,68 cd	10,07 c	2,08 ab
Latossolos	5,52 d	8,7 a	11,7 bc	0,10 a	6,98 ab	9,77 c	2,73 ab
Argissolos	5,88 b	8,0 a	3,7 c	0,08 a	6,84 bc	60,40 a	3,47 ab
Cambissolos	5,93 b	15,0 a	20,7 b	0,05 a	10,66 a	8,57 c	3,25 ab
Luvissolos	6,00 b	10,3 a	21,0 b	0,05 a	9,57 ab	21,43 bc	3,81 ab
Vertissolos	7,02 a	13,7 a	53,0 a	0,05 a	2,89 d	50,90 a	4,14 a

** médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A classe Vertissolo apresentou pH mais alto, enquanto que os menores valores foram verificados em Planossolo e Neossolo. Da mesma forma, os maiores teores de K^+ foram observados em Vertissolo, que diferiu significativamente das demais classes de solo. Vale destacar que os menores valores foram encontrados em Argissolo e Neossolo, que não diferiram estatisticamente dos Planossolos e Latossolos. O Vertissolo também apresentou maior teor de M.O., diferindo estatisticamente do Neossolo, porém sem diferir das demais classes.

Os maiores valores de P foram encontrados nas classes Argissolo e Vertissolo, sendo o menor valor encontrado na classe Neossolo, que não diferiu estatisticamente das demais. Apesar da grande diferença entre as classes Vertissolo e Neossolo nas características químicas e físicas (Tabela 4 e Tabela 5), as mesmas não diferiram estatisticamente na concentração de Cálcio e Magnésio do solo.

Tabela 5. Características físicas das classes de solo com vegetação nativa da Caatinga no sertão pernambucano.

Classes de Solo	Areia(%)	Silte(%)	Argila(%)	Textura
Neossolos	91,87 a	1,13 c	7,37 c	Areia
Argissolos	88,97 ab	1,93 c	9,10 c	Areia Franca
Planossolos	75,39 bc	13,94 ab	10,67 c	Franco Arenoso
Cambissolos	69,61 c	13,86 ab	16,53 bc	Franco Arenoso
Luvissolos	68,95 c	13,92 ab	17,13 bc	Franco Arenoso
Latossolos	66,97 c	7,94 bc	25,10 ab	Franco Argilo Arenoso
Vertissolos	50,62 d	19,81 a	29,57 a	Franco Argilo Arenoso

*** médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.*

As características texturais descritas na Tabela 5 demonstraram que as classes Neossolo, Argissolo e Planossolo tiveram maiores percentuais de areia (>75 %), enquanto o Vertissolo e o Latossolo foram os solos que apresentaram maior teor de argila, sendo classificados como Franco Argilo Arenoso, de acordo com o triângulo da textura do solo (FAO, 2006).

4.2. Comparação da eficiência das técnicas de extração de DNA dos solos testados

As classes Argissolo, Planossolo e Neossolo não apresentaram diferença estatística em relação à concentração de DNA quando comparado os protocolos de extração, indicando a possibilidade de utilizar qualquer um dos métodos testados.

Nas classes Cambissolo, Vertissolo, Latossolo e Luvissolo, o método MoBio permitiu extrair maior concentração de DNA, principalmente em Cambissolo e Vertissolo, nos quais o rendimento obtido foi 100 % superior aos demais métodos testados (Tabela 6). Para a classe Latossolo, o método que proporcionou menor concentração de DNA foi o ISOm, embora tenha diferido estatisticamente apenas do protocolo da MoBIO (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração de DNA (ng/ μ L) obtida em diferentes protocolos de extração em função da classe de solo.

Classes de solo	MoBiO	ISOm	Selbach	GNS-GII	Sy3
Vertissolos	84,53 aA	33,47 aB	35,19 aB	22,25 aB	15,58 aB
Latosolos	30,00 bcdA	6,09 bB	9,91 bAB	14,89 aAB	19,76 aAB
Cambissolos	43,27 bA	7,37 bB	20,83 abB	7,97 aB	8,27 aB
Neossolos	11,73 dA	2,57 bA	6,09 bA	4,85 aA	10,85 aA
Luvissolos	37,87 bcA	6,01 bB	17,30 abAB	2,36 aB	4,33 aB
Argissolos	15,77 cdA	1,67 bA	8,00 bA	1,65 aA	1,43 aA
Planossolos	11,73 dA	3,49 bA	5,13 bA	1,20 aA	3,19 aA

***Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.*

Não houve diferença significativa na concentração de DNA extraído entre as classes de solo utilizando os protocolos GNS-GII e Sy3. Com o uso do protocolo ISOm foi observado que o Vertissolo foi a classe com maior concentração de DNA, diferindo estatisticamente das demais classes, que não diferiram entre si. O uso do kit da MoBiO possibilitou a obtenção de maior concentração de DNA em todas as classes de solo, destacando que o maior valor foi obtido na classe Vertissolo, que extraiu quase duas vezes mais que a concentração verificada em Cambissolo. As menores concentrações foram obtidas nas classes Neossolo e Planossolo. O método de Selbach possibilitou a extração com maior concentração de DNA em Vertissolo, sendo os menores valores observados nas classes Argissolo, Latossolo, Neossolo e Planossolo.

Tabela 7. Pureza do DNA ($A_{260/280}$) em função do método de extração e tipo de solo com vegetação nativa da Caatinga.

Classes de solo	MoBiO	ISOm	Selbach	GNS-GII	Sy3	Média
Neossolos	1,89 a	1,42 a	1,55 bc	1,36 ab	1,45 ab	1,536 b
Planossolos	1,87 a	1,35 a	1,66 ab	1,34 b	1,34 bc	1,512 bc
Latosolos	1,88 a	1,47 a	1,73 a	1,57 a	1,51 a	1,631 a
Luvissolos	1,88 a	1,39 a	1,62 ab	1,33 b	1,35 bc	1,513 b
Argissolos	1,85 a	1,32 a	1,34 d	1,30 b	1,29 c	1,418 c
Cambissolos	1,87 a	1,40 a	1,66 ab	1,38 ab	1,36 abc	1,533 b
Vertissolos	1,87 a	1,39 a	1,48 cd	1,43 ab	1,38 abc	1,510 bc
Valor médio	1,87 A	1,39 C	1,57 B	1,38 C	1,38 C	

***Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.*

No que se refere à pureza, o método da MoBio apresentou valores adequados ($A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0) para todas as classes de solo avaliadas (Tabela 7). Para os demais protocolos, apenas o Selbach possibilitou a obtenção de amostras mais próximas à pureza recomendada, especificamente nas classes Latossolo, Luvissolo e Planossolo,

enquanto os demais métodos (ISOm, GNS-II e Sy3) não foram eficientes na exclusão de contaminantes e apresentaram valores de pureza insatisfatórios (Tabela 7).

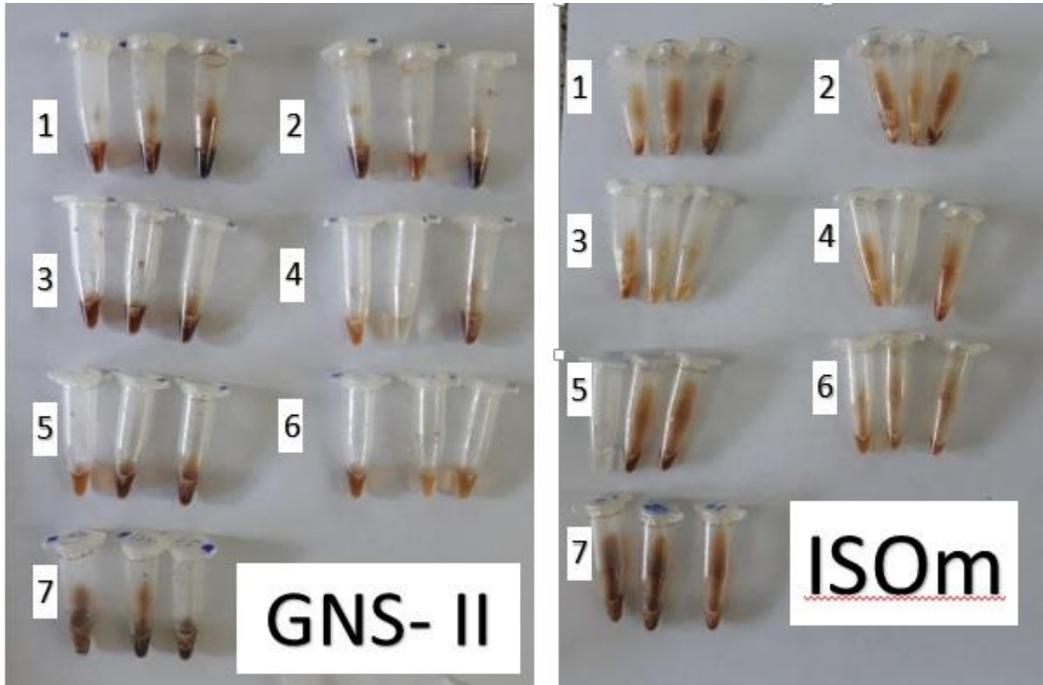


Figura 7. Aspecto geral das amostras de DNA obtidas nos protocolos GNS-II e ISOm sem purificação. Legenda: 1 – Luvissole; 2 – Cambissole; 3 – Vertissole; 4 – Latossole; 5 – Planossole; 6 – Neossole; 7 – Argissole.

Na classe Latossolo foi possível obter amostras mais próximas da pureza recomendada nos cinco protocolos testados, enquanto que na classe Argissolo foram verificados os menores valores (Tabela 8), o que pode ser observado na Figura 7 e 8 que demonstram que, mesmo após a etapa de purificação, alguns solos continuaram a exibir DNA com coloração escura, indicativa da presença de contaminantes.

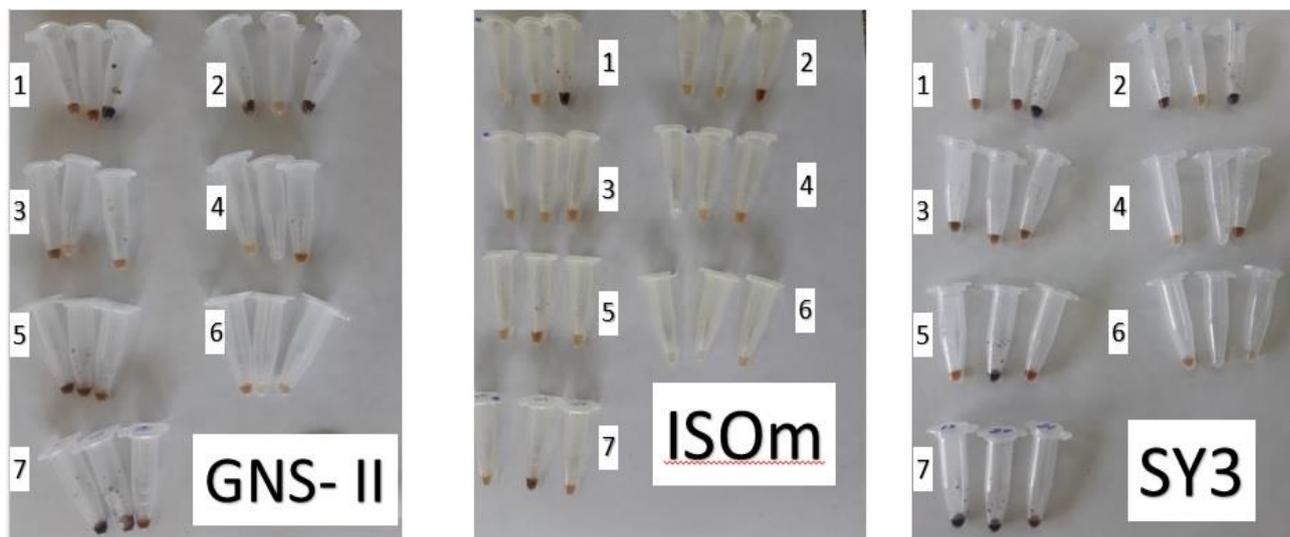


Figura 8. Aspecto geral das amostras de DNA obtidas nos protocolos GNS-II, ISOm e SY3 após a etapa de purificação. Legenda: 1 – Luvissole; 2 – Cambissolo; 3 – Vertissolo; 4 – Latossolo; 5 – Planossolo; 6 – Neossolo; 7 – Argissolo.

Entretanto, na visualização do DNA em gel de agarose com brometo de etídio (EtBr), os métodos manuais Selbach e ISOm obtiveram bandas bem definidas, enquanto que Sy3 e GnS-GII ocorreu um arraste de DNA, o que possivelmente pode ser uma interferência por RNA (Figura 9).

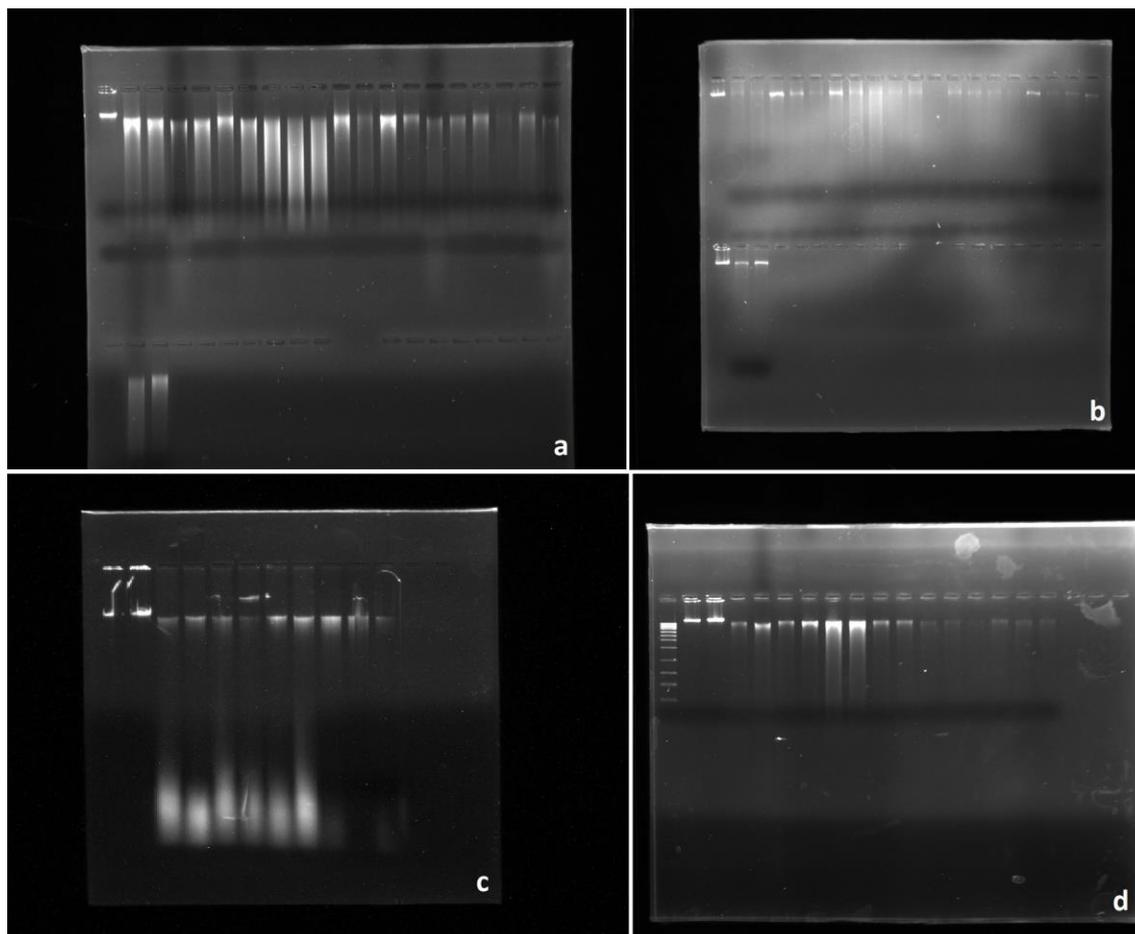


Figura 9. Detecção de DNA em gel de agarose: a) método Sy3; b) método Selbach; c) método GnS-GII; e d) método ISOm.

4.3. Características físico-químicas x extração DNA

Foram observadas correlações positivas entre os protocolos testados e as propriedades químicas e físicas do solo. As correlações positivas mais evidenciadas foram verificadas no pH ($p < 0,05$, $r = 0,611173$), K^+ ($p < 0,05$, $r = 0,610280$), Ca e Mg ($p < 0,05$, $r = 0,416506$), M.O. ($p < 0,05$, $r = 0,273058$), Silte ($p < 0,05$, $r = 0,444250$) e Argila ($p < 0,005$, $r = 0,741979$), além de correlação negativa com a percentual de areia ($p < 0,005$, $r = -0,615262$), conforme valores médios das correlações significativas de todos os métodos (Tabela 8).

O pH do solo influenciou a extração de DNA, visto que, solos mais básicos possibilitaram obter maiores concentrações de DNA, destacando-se o Vertissolo que apresentou concentrações mais altas em todos os protocolos testados. Apenas o protocolo Sy3 não apresentou correlação significativa com o pH (Tabela 8).

De forma geral, os solos mais ácidos foram menos eficientes na extração, com exceção da classe Latossolo que apesar de apresentar valor de pH mais baixo isso não ocorreu (Tabela 8). Os protocolos GNS-GII e Sy3 não diferiram estatisticamente no que se refere à concentração de DNA obtida nas diferentes classes de solo (Tabela 8). Similarmente, a concentração de K⁺ correlacionou-se significativamente com as concentrações de DNA, com exceção de SY3 (Tabela 8). Observa-se que os maiores teores de K⁺ encontrados em Vertissolos, Cambissolos e Luvisolos relacionam-se com um maior rendimento na extração, tanto no Kit da Mobio quanto no método Selbach (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação entre os protocolos testados e as características físico-químicas dos solos amostrados.

Protocolo	pH	K+	Ca+Mg	M.O.	Na	Areia	Argila	Silte
MOBIO	0,8708	0,8851	0,5906	0,5769	NS	-0,7985	0,7497	0,6408
ISOm	0,8170	0,8387	0,5565	NS	NS	-0,7568	0,7239	0,5941
GNS-GII	0,4949	0,4594	NS	NS	0,5216	-0,5959	0,7523	NS
SY3	NS	NS	NS	NS	NS	-0,4329	0,6463	NS
SELBACH	0,6697	0,5901	0,4367	0,4533	NS	-0,4921	NS	0,4742

*correlação a significância de $p < 0,05$. NS = Não significativo.

A concentração de Ca e Mg teve correlação positiva com a extração realizada com o Kit da Mobio e com os protocolos ISOm e Selbach, sendo a média dos protocolos significativas ($r = 0,5279$), o que demonstra que a saturação por base influencia de alguma forma a extração de DNA. Por sua vez, apesar de ter diferido significativamente entre as classes de solo, o fósforo não apresentou correlação significativa com a extração de DNA. No entanto, a quantidade de fósforo influenciou diretamente na purificação do método do Selbach, apresentando correlação linear negativa ($r = -0,743046$, $p < 0,05$). Os solos que apresentaram maior teor de P interferiram na etapa de purificação, como verificado nas classes Vertissolo e Argissolo (Tabela 8). Por sua vez, a concentração de K⁺ teve correlação significativa com a eficiência na extração do Kit da Mobio e com os protocolos ISOm, GNS-GII e Selbach, com maior teor de K⁺ observado nas classes Vertissolo, Cambissolo e Luvisolo (Tabela 4).

O Vertissolo foi a classe com maior concentração de matéria orgânica e de DNA isolado nos protocolos MoBio, ISOm e Selbach, porém, apresentou correlação positiva apenas com o Kit da MoBio e com o protocolo de Selbach (Tabela 8). Os teores de Na

encontrados nas classes de solo não diferiram significativamente (Tabela 4) mas houve correlação positiva com a extração do protocolo GNS-GII (Tabela 9).

Com relação às propriedades físicas foram observadas diferenças estatísticas entre as classes de solo estudadas, fato esperado devido a grande variabilidade das classes. Os percentuais de areia tiveram correlação negativa com a extração de DNA em todos os protocolos testados, sendo a menor correlação verificada com o protocolo Sy3. Em contraste, o percentual de Argila teve correlação positiva com todos os protocolos testados, exceto Selbach. Por sua vez, o percentual de Silte correlacionou-se com as extrações realizadas pelo Kit MoBio, ISOm e Selbach.

Tabela 9. Comparação entre protocolos de extração de DNA de solo e estimativa de tempo de processamento, investimento para a aquisição de reagentes e em etapas de purificação.

Protocolos	Tempo	Custo de Extração (R\$)	Purificação (R\$)	Total (R\$)
Mobio	1 h e 30 min	31,00	-	31,00
ISOm	4 h	2,52	5,00	7,52
GNS-GII	4 h	2,30	5,00	7,30
Selbach	3 h	4,07	5,00	9,07
Sy3	4h e 30 min	5,46	5,00	10,46

Comparando os protocolos de extração de DNA de solo com a relação aos custos, o kit da Mobio foi o mais oneroso. No entanto, é o protocolo com menos tempo de execução na extração e purificação, pois não é necessário o preparo de reagentes. Além disso, esse protocolo já inclui etapas de purificação durante sua execução. Entre os métodos de bancada, o Selbach foi o protocolo com o menor tempo de execução, uma vez que necessita apenas do preparo da solução tampão (SDS 10 %), além de possibilitar a obtenção de sobrenadantes e pellets mais incolores (Figura 10), o que corroborou com os valores de pureza apresentado na Tabela 7. Todavia, entre os protocolos de bancada, o Sy3 foi o que teve o custo mais alto e o maior tempo de execução devido a ter mais etapas de lise (Figura 6).



Figura 10. Aspecto geral das amostras de DNA obtidas no protocolo Selbach após a etapa de purificação. Legenda: 1 – Luvissole; 2 – Cambissolo; 3 – Vertissolo; 4 – Latossolo; 5 – Planossolo; 6 – Neossolo; 7 – Argissolo.

Em relação a todas as etapas detalhadas da extração, uma ordem de exequibilidade (incluindo custo, rapidez, rendimento e pureza) pode ser deduzida da seguinte forma: MOBIO > Selbach > ISOM = GnS-GII > Sy3.

4.4. PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As reações de qPCR realizadas com as amostras obtidas com o Kit MoBiO possibilitaram a amplificação do DNA do solo para os dois pares de *primers* (ITS4/ITS86F e NS31/AML2) testados e em todas as classes de solos avaliadas, com Cqs variando entre 8,31 e 15,49 para ITS4/ITS86F e de 15,77 a 21,77 para NS31/AML2 (Figuras 11 e 12). Por sua vez, com o método Selbach foi observada amplificação do DNA do solo em cinco classes (Cambissolo, Latossolo, Neossolo, Planossolo e Vertissolo) para o *primer* ITS4/ITS86F e em seis classes (Cambissolo, Latossolo, Luvissole, Neossolo, Planossolo e Vertissolo) para o *primer* NS31/AML2 (Figuras 11 e 12). Os Cqs obtidos nas amostras de solo com o *primer* ITS4/ITS86F variaram de 14,03 a 38,01 e de 20,20 a 35,51 para NS31/AML2.

As classes Latossolo e Planossolo se destacaram entre as demais no que se refere ao padrão de amplificação observado com o *primer* ITS4/ITS86F (Figura 11), sendo similar ao obtido com o Kit MoBiO, corroborando ao verificado na pureza (Tabela 8) e sugerindo que este método pode ser igualmente indicado para extrações de DNA oriundas desses tipos de solo. Adicionalmente, as classes Cambissolo e Vertissolo também demonstraram padrão similar ao MoBiO quando utilizado o *primer* NS31/AML2 (Figura 12), o que pode estar relacionado ao bom rendimento do método nas extrações, embora apresente pureza abaixo do padrão recomendado (Tabelas 7 e 8). Em contraste, as amostras de DNA da classe Argissolo não foram detectadas nos dois pares de *primers* testados com o método Selbach (Figura 12), refletindo possivelmente os valores baixos obtidos quanto ao rendimento e pureza das amostras (Tabelas 7 e 8).

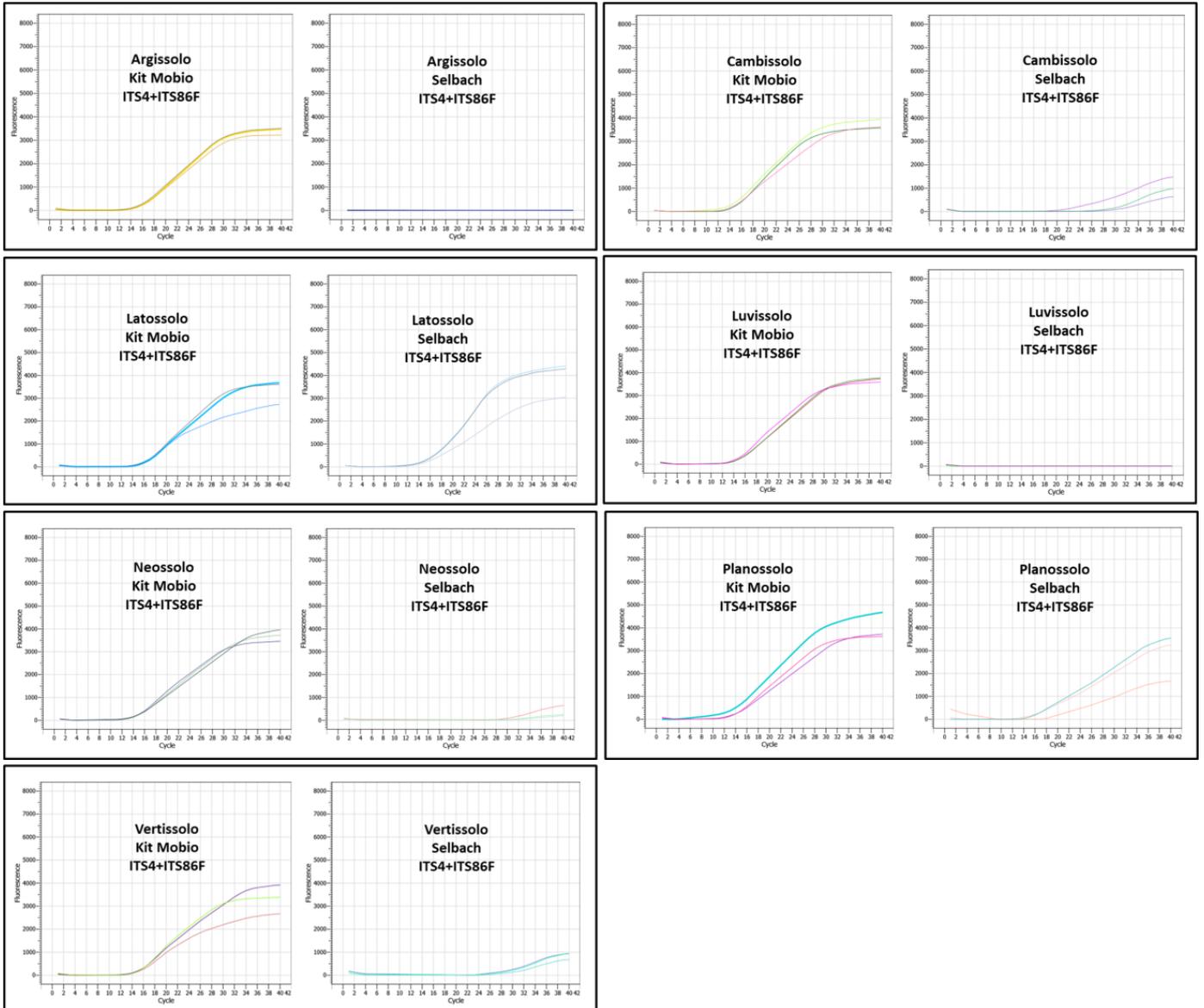


Figura 11. Detecção de amostras de DNA de sete classes de solos da Caatinga por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o *primer* ITS4/ITS86F e dois métodos de extração (Kit Mobio e Método Selbach).

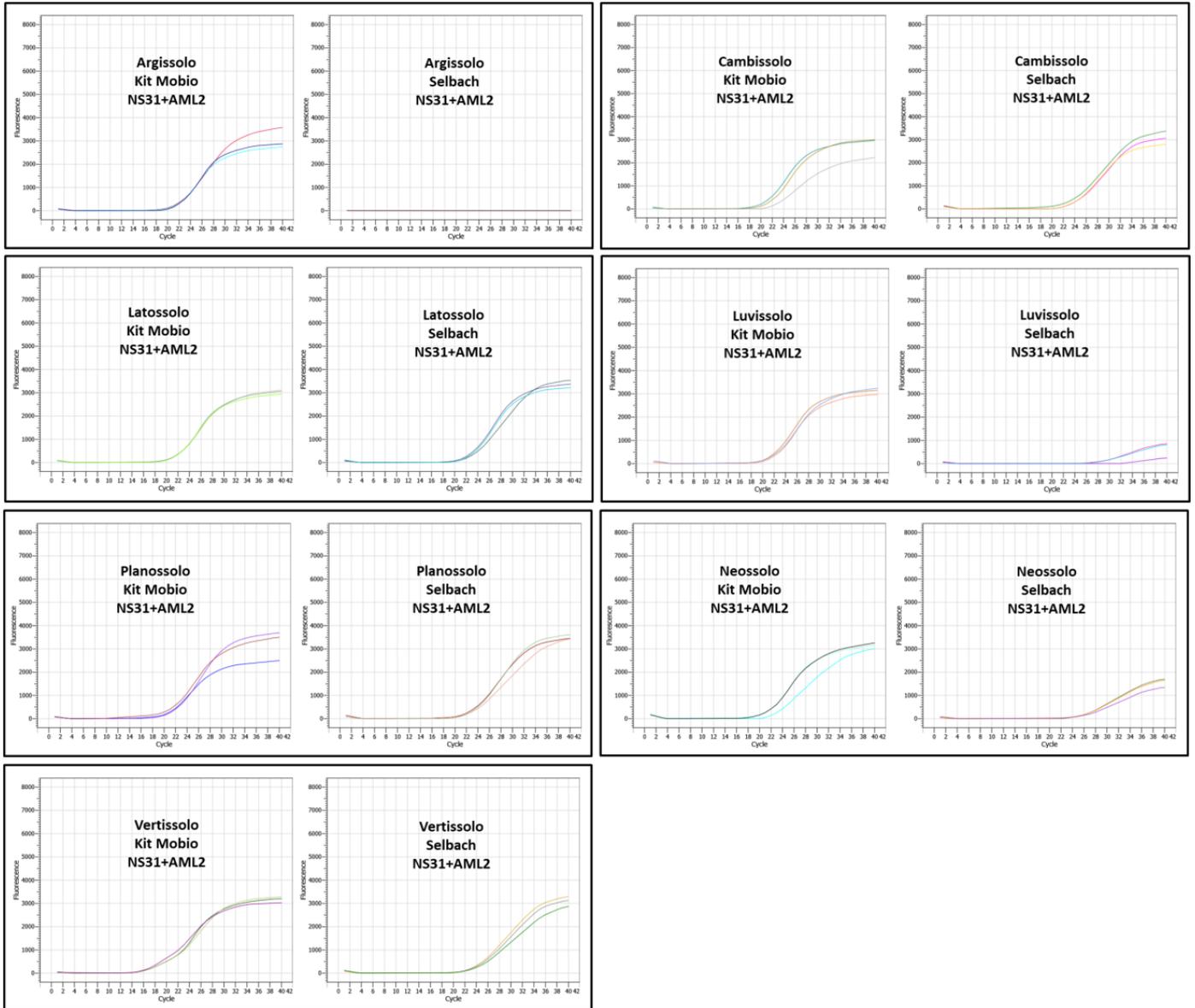


Figura 12. Detecção de amostras de DNA de sete classes de solos da Caatinga por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o *primer* NS31/AML2 e dois métodos de extração (Kit Mobio e Método Selbach).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho comparou cinco diferentes métodos de extração direta de DNA do solo em sete classes de solos representativos da Caatinga, sendo observadas variações significativas nas extrações realizadas no que se refere aos protocolos e classes de solo analisadas. A maioria dos estudos conduzidos até o momento avalia, em geral, apenas um tipo de solo, de modo que os métodos de extração não podem ser facilmente comparados em diferentes estudos (YOUNG et al., 2014).

A extração realizada com o kit da MoBio foi mais eficiente que os demais nas classes Cambissolo, Latossolo, Luvisolo e Vertissolo; enquanto que nas classes Argissolo, Neossolo e Planossolo não houve diferença estatística entre os métodos testados. Este resultado difere dos verificados por Terrat et al. (2012), que obtiveram melhores quantificações de DNA nos protocolos GnS-GII, Sy3 e MoBio (Tabela 03), respectivamente.

Martin-Laurent (2011) comparou o kit da MoBio com a extração pelo método MS laboratório obtendo concentrações de DNA significativamente maiores no método MS laboratório em relação ao MoBio em Cambissolos calcáricos eutrícos. No entanto, as extrações com solos arenosos não diferiram quanto ao método de extração utilizado, corroborando aos resultados obtidos neste trabalho onde foi observado que os solos (Neossolo, Argissolo e Planossolo) com maior percentual de areia não apresentaram diferenças significativas entre os protocolos testados. Esses resultados reforçam o que foi apontado por Marstorp et al. (2000), Martin-Laurent (2011) e Dequiedt et al. (2011) que sugeriram que a quantidade de DNA isolada por grama de solo está relacionada com o método de extração utilizado e de propriedades dos solos como: textura, carbono orgânico e pH. Além disso, as características dos solos podem influenciar também a taxa de crescimento microbiano ou a formação de agregados dos hospedeiros dos microrganismos (ZHOU et al., 1996; ROOSE-AMSALEG et al., 2001; STACH et al., 2001; FORTIN et al., 2004; LAKAY et al., 2007).

Foram verificadas correlações positivas entre os protocolos testados e as propriedades químicas e físicas do solo como pH, K⁺, Ca e Mg, M.O., silte e argila e correlação negativa com a percentual de areia (Tabela 8). Jonas e Hunter (2001), avaliando dois protocolos de bancada e um kit de extração, observaram que o rendimento

de DNA foi influenciado pelo tipo de solo, e correlacionado positivamente com Carbono orgânico do solo (mean $r = 0,97$, $P = 0,03$) e carbono da biomassa ($r = 0,96$, $p = 0,05$).

Plassart et al. (2012), avaliaram os protocolos GNS-GII, ISOm e ISO em diferentes tipos de solo, obtendo maiores concentrações de DNA em solos alcalinos que em solos ácidos, mesmo quando os solos apresentavam alta concentração de matéria orgânica. Estas diferenças foram claramente observadas nos protocolos GnS-GII e ISOm, cujo rendimento de DNA foi muito inferior em solos ácidos. Apesar de não haver diferença significativa nas extrações de DNA realizadas com os protocolos GNS-GII e ISOm neste estudo, observou-se que em solos mais ácidos, o rendimento da extração foi afetado, ao passo que em solos com pH neutro, como na classe Vertissolo, foram obtidas as maiores concentrações de DNA. Entretanto, o rendimento de DNA não é o único fator indicativo de eficiência na extração, pois concentrações altas não significam necessariamente que as amostras estão aptas para outras aplicações, como reações de PCR ou sequenciamento, por exemplo, sendo fundamental a análise de integridade e pureza (ZHOU et al., 1996; STACH et al., 2001).

A etapa de avaliação da pureza das amostras demonstrou que apesar do Vertissolo exibir as maiores concentrações de DNA na maioria dos métodos de extração testados, essa classe de solo apresentou valores de pureza abaixo do padrão recomendado, exceto na extração realizada com o kit da MoBiO (Tabela 7). Tal fato pode ser explicado pelas características químicas da classe Vertissolo, que tem a presença de argilas expansivas do grupo esmectita com alta CTC e colóides com cargas elétricas capazes de adsorver as moléculas de DNA, o que favorece sua adesão às partículas do solo e/ou na M.O. durante a etapa de lise celular e purificação e resulta em menor eficiência na extração de DNA (VOLOSSIOUK et al. 1995; FROSTEGARD et al., 1999; FORTIN et al., 2004).

Zhou et al (1996) e Stach et al. (2001) afirmaram que a extração de DNA do solo ocorre principalmente por meio da lise celular dos agregados, e, portanto, diferenças na estrutura da célula microbiana e micro-habitat poderão afetar a extração de DNA, assim como as análises de diversidade, pois, a atividade da biomassa microbiana do solo está diretamente relacionada à quantidade e qualidade do carbono e outros nutrientes disponíveis através de resíduos de plantas, insumos orgânicos e exsudatos da raiz (MARTYNIUK & WAGNER, 1978; ADAMS & LAUGHLIN, 1981; POWLSON et al., 1987; FRASER et al., 1988) e constituição física do solo (DORAN, 1987).

Alguns métodos foram desenvolvidos para serem mais rigorosos nas etapas de lise com intuito de aumentar a concentração de DNA independente da comunidade microbiana. Porém, este trabalho obteve resultados semelhantes ao de Terrat et al. (2012) que apesar de utilizarem o protocolo de extração Sy3, considerado mais rigoroso com relação a lise, pois inclui etapas mecânicas, químicas, térmicas e enzimáticas, não obtiveram maiores concentrações de DNA. Isso possivelmente foi verificado devido a alteração na integridade do DNA uma vez que pode ter ocorrido a quebra de fragmentos menores que são adsorvidos facilmente por partículas do solo, ocasionada provavelmente pela etapa de *bead beating* que resulta em uma fragmentação mais severa do DNA (CRESSWELL et al., 1991; CEBOLLA et al., 1995; KUSKE et al., 1998; MORE et al., 1994; OLIVIER & LORIA, 1998).

Uma das fases críticas da extração de DNA direta do solo é a separação do DNA das substâncias húmicas, macromoléculas ácidas, sendo observado neste trabalho que o Kit da Mobio e o método de Selbach foram os que permitiram os melhores valores de purificação, o que pode estar relacionado a etapas de lise mais eficientes e/ou menor fragmentação do DNA. O protocolo Selbach utiliza como tampão de lise a solução de SDS a 10 % enquanto que os protocolos GNS-GII e Sy3 utilizam um tampão de lise composto por Tris, EDTA, NaCl, e SDS 2 %, além de PVP 2 %, especificamente para o ISOm. Rosa (2006) afirmou que o tampão inicial é uma das etapas mais importantes da extração e pode melhorar consideravelmente o rendimento das amostras de DNA. Krsek e Wellington (2001) relataram que a lise utilizando apenas o SDS em conjunto com o “*bead beating*” garantiu maior rendimento nas extrações de DNA realizadas em seu estudo.

As etapas de remoção de proteínas e precipitação do DNA também são fundamentais para garantir a eficiência das extrações, e em geral, são utilizados solventes orgânicos (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) para separar o ácido nucléico alvo de lipídeos, proteínas e polissacarídeos retidos na fase orgânica e a adição de álcool (isopropanol ou etanol) e sal (NaCl, Acetato de sódio ou Acetato de potássio) visando a precipitação do DNA, respectivamente. Os protocolos GNS-GII e ISOm não incluem a etapa de adição de solvente orgânico para remoção de proteínas enquanto que o Sy3 inclui adicionalmente uma etapa de lise enzimática (adição de proteinase K). Por sua vez, o método de Selbach utiliza clorofórmio-álcool isoamílico e NaCl, sendo observado neste trabalho que essas etapas do protocolo Selbach favoreceram consideravelmente as extrações das amostras de solo quanto a pureza.

No que se refere às reações de qPCR, apenas as amostras de solo extraídas pelo Kit MoBiO e método Selbach amplificaram nos dois pares de *primers* testados, o que provavelmente está relacionado aos valores de pureza obtidos para essas amostras (Tabela 7) e sugere que esses protocolos foram eficientes na remoção de substâncias húmicas e outros contaminantes/inibidores que interferem na PCR. Zhou et al. (2001) relataram que extrações de DNA de solo sempre resultam em coextração de ácidos húmicos, que são possíveis inibidores da Taq DNA polimerase (SMALLA et al. 1993, TSAI e OLSON, 1992).

Apesar das tentativas de padronização dos protocolos de extração de DNA do solo e do desenvolvimento de kits comerciais específicos ainda há uma lacuna a ser explorada devido à ineficiência dos métodos em determinados tipos de solo. A utilização de kits possui vantagens quanto ao risco de contaminação, pois as soluções já estão prontas para uso, além de menor tempo de execução do protocolo e principalmente, por possibilitar amostras mais puras devido ao uso de colunas. No entanto, a maior limitação dos kits comerciais está relacionada aos custos altos, especialmente no que se refere a amostras de difícil extração, a exemplo de amostras de solo (Tabela 9). Com isso, este trabalho ressalta a importância do desenvolvimento de metodologias alternativas de baixo custo e que visem atender às peculiaridades dos diferentes tipos de solo de forma a possibilitar maior eficiência e qualidade na extração de amostras de DNA direcionadas para estudos moleculares de comunidades microbianas. Nesse caso, o método Selbach constitui um possível protocolo de extração com baixo custo para as amostras de solos da Caatinga, visto que foi possível amplificar o DNA de quase todas as classes de solo por PCR em tempo real.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- 1) Este trabalho é pioneiro em comparar protocolos de extração de DNA de solo (kits comerciais e métodos manuais) em diferentes classes de solos da Caatinga;
- 2) A extração de DNA dos solos representativos da Caatinga foi influenciada pelo tipo de solo e suas características físico-químicas tendo como correlação positiva o pH, K+, Ca+Mg, Na, Argila e Silte; e correlação negativa com o percentual de Areia;
- 3) Nos protocolos que obtiveram valores de pureza (A260/280) abaixo de 1,40 não foi possível amplificar o DNA das amostras de nenhum tipo de solo analisado utilizando os dois pares de *primers* selecionados, o que possivelmente ocorreu devido a presença de contaminantes como ácidos húmicos e proteínas que interferem na PCR;
- 4) O kit comercial da Mobio foi o que obteve melhores quantificações e valores de purificação, sendo o mais recomendado para amostras de solos da Caatinga onde não se tenha conhecimento sobre os tipos ou suas características físico-químicas;
- 5) O método Selbach pode ser sugerido como uma opção de protocolo de extração nas classes de solo Latossolo, Planossolo, Vertissolo e Cambissolo, por se destacar entre os demais protocolos manuais exibindo concentrações e valores de purificação semelhantes ao Kit Mobio e por ser um método alternativo de baixo custo e de bom rendimento;
- 6) Sugere-se ainda que o protocolo Selbach seja otimizado com intuito de melhorar a purificação das amostras nas outras classes de solo e a detecção do DNA extraído na PCR.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV K, HENRIK NILSSON R, LARSSON KH, ALEXANDER IJ et al. 2010 – The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. **New Phytologist** 186, 281–285.
- ADAMS, T.; LAUGHLIN, R. J. The effects of agronomy on the carbon and nitrogen contained in the soil biomass. **Journal of Agricultural Science**, v.97, p.319-327, 1981.
- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W., 2009. **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. Microbial Ecology**. Auburn, v. 58, n. 4, p. 921–929.
- ALBUQUERQUE P. P. **Diversidade de Glomeromycetes e atividade microbiana em solos sob vegetação nativa do Semi-árido de Pernambuco**, Tese - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 113 p., 2008.
- ANDRADE, A.P.; SOUZA, E.S.; SILVA, D.S. et al. Produção animal no bioma caatinga: paradigmas dos pulsos-reserva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.138-155, 2006.
- ANDRADE, M. V. M. de. et al. Levantamento histórico e estrutura fitossociológica do estrato herbáceo e subarbustivo em área de Caatinga no Cariri Paraibano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 229-237, jan/mar 2009.
- ANDRADE, A. P. de et al. **Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca**. Tecnologia e Ciência Agropecuária, João Pessoa, v. 4, n. 4, p. 1-14, dez. 2010.
- ARAUJO FILHO, J. C. **Relação Solo e Paisagem no bioma caatinga**. In: **Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada**, 14., 2011.
- ARAUJO, K. D. et al. **Reservas de carbono e nitrogênio mineral na encosta do Açude Namorados no Semiárido Paraibano**. Revista Caatinga, Mossoró, v. 21, n. 4, p. 122-128, out/dez. 2008.
- ARBELI, Z.; Fuentes, C.L. 2007. **Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples**. FEMS Microbiol Lett 272, 269–275.

ARSLAN, M.; IMRAN, A.; KHAN, Q. M.; AFZAL, M. **Plant–bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants.** *Environmental Science and Pollution Research*, Heidelberg, v. 24, n. 5, p. 4322–4336, 2017.

AVIO, L.; CRISTIANI, C.; STRANI, P. E.; GIOVANNETTI, M. (2009). **Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*.** *Canadian Journal of Microbiology* 55: 242-253.

BERTHELET, M.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. **Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns.** *FEMS Microbiology Letters* 138 (1996) 17-22.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Relatório final.** Grupo de trabalho interministerial para redelimitação do semiárido nordestino e do polígono das secas. Brasília. 2005. 117p.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. **Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity.** *Microbial Cell Factories*, London, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

BRADY, N. C. **Organismos e Ecologia do Solo.** In: BRADY, N. C.; WEIL, R. R. (Ed.). *Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos*. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. Porto Alegre, p. 376–379.

BRIDGE P.; SPOONER B.; Soil fungi: diversity and detection. **Plant Soil**, 2001. 232: 147–154.

BUSCOT, F. Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 55-61, 2015.

CARRIGG, C., RICE, O.; KAVANAGH, S.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. (2007). DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77, 955–964.

CEBOLLA, A.; VAZQUEZ, M. E.; PALOMARES, A. J. **Expression vectors for the use of eukaryotic luciferase with different colors of luminescence.** *Applied Environmental Microbiology*, v.61, p.660-668, 1995.

CLAPP, J. P.; YOUNG, J. P. W.; MERRYWEATHER, J. W.; FITTER, A. H. (1995). Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytol** 130: 259–265.

CLAPP, J. P.; HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; YOUNG, J. P. W. (2002). **Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities**. Mycorrhizal Ecology (van der Heijden MGA & Sanders IR, eds), pp. 201–224. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin

CORADO NETO, F. C. et al. Variabilidade espacial dos agregados e carbono orgânico total em Neossolo Litólico Eutrófico no município de Gilbués, PI. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 58, n. 1, p. 75-83, jan./mar. 2015.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. **Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR**. Soil Biol. Biochem., 30: 983-993, 1998.

DANIEL, R. (2005). The metagenomics of soil. **Nature Reviews**, 3, 470–478

DANTAS, R. T. et al. Macro e mesofauna visando a sustentabilidade agropecuária em São João do Cariri - PB. In: CONGRESSO DE AGROMETEOROLOGIA, 16., 2009. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBAGRO, 2009. p. 1-5.

DANTAS, B. L.; WEBER, O. B.; MACIEL NETO, J. P.; ROSSETTI, A. G.; PAGANO, M. C. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em pomar orgânico no semiárido cearense**. Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.8, p.1480-1486, ago, 2015.

DELMONT T.O.; ROBE P.; CLARK I.; SIMONET P.; VOGEL T.M.; (2011) Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. **J Microbiol Methods** 86: 397–400.

DEQUIEDT, S.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; JOLIVET, C.; THIOULOUSE, J.; TOUTAIN, B., et al. (2011). **Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management**. Glob Ecol Biogeogr 20: 641–652.

DIREITO, I. C. N.; SANTOS, S. T.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. Otimização da técnica de extração de DNA de amostras de solo e da amplificação parcial dos genes nifH para avaliação de populações de bactérias diazotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28, 2001, Londrina. **Resumos**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001, p.72.

DONAGEMMA, G. K. et al.; **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro : Embrapa Solos, 2011. 230 p. - (Documentos / Embrapa Solos, ISSN 1517-2627 ; 132).

DORADO, G.; BESNARD, G.; UNVER, T.; HERNÁNDEZ, P. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**. Reference Module in Biomedical Sciences, 2019.

DORAN, J. W. Microbial biomass and mineralizable nitrogen distributions in no-tillage and plowed soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.5, p.68-75, 1987.

DOTZLER, N. et al. **Germination shields in Scutellospora (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert**. Mycological Progress, v. 5, p. 178-184, 2006.

EMBRAPA. **Zoneamento agroecológico de Alagoas: levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do Estado de Alagoas**. 1. ed. Recife: EMBRAPA, 2012. 238 p.

F.A.O. – **Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2006. World Reference Base for soil resources**. World Soil Resources Reports, Rome, 133p.

FEINSTEIN, L.M.; SUL, W.J.; BLACKWOOD, C.B. 2009. **Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil**. Appl Environ Microb 75, 5428–5433.

FERRAZ, D. S. **Dinâmica de serrapilheira, balanço e estoque de carbono em área de Caatinga**. 2013. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2013.

FERREIRA, A.C.A. **Ecologia e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga**. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, p. 94, 2010.

FLIEBACH, A.; OBERHOLZER, H.R; GUNST, L.; MADER, P. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam. v. 118, p. 273-284, 2007.

FORTIN N, BEAUMIER D, LEE K, GREER CW (2004). **Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments**. J Microbiol Methods 56: 181–191.

FRASER, D. G.; DORAN, J. W.; SAHS, W. W.; LESOING, G. W. Soil microbial populations and activities under conventional and organic management. **Journal of Environmental Quality**, v.17, p.585-590, 1988.

FFREITAS, T. S.; ASSIS, M. A. S.; SOUSA, M. L. L.; GONÇALVES, F. J. **Soil DNA extraction: Detection of possible bioremediate bacteria in contaminated soils.** COINTER - PDVAGRO 2018. P. 10.

FROSTGARD, A.; COURTOIS, S.; RAMISSE, V.; CLERC, S.; BERNILLON, D.; LEGALL, F.; JEANNIN, P.; NESME, X.; SIMONET, P. 1999. **Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil.** Appl. Environ. Microbiol. 65, 5409-5420.

GABOR, E. M.; VRIES, E.J.; JANSSEN, D.B. **Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods.** FEMS Microbiol. Ecol. 44 (2) (2003) 153–163.

GEEL, M. V.; BUSSCHAERT, P.; HONNAY, O.; LIEVENS, B. (2014). Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. **Journal of Microbiological Methods**, 106 p. 93–100.

GOTO, B. T.; JOBIM, K. Laboratório de Biologia de Micorrizas. Disponível em: < <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas> >. Acesso em: 15/10/2019.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. (2000) A rapid method for the co-extraction of DNA and RNA from natural environments for the analysis of rDNA and rRNA based microbial community composition. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 5488^5491.

GUPTA, V. V. S. R.; GERMIDA, J. J. **Soil aggregation: Influence on microbial biomass and implications for biological processes.** Soil Biology and Biochemistry, v. 80, p. A3–A9, 2015.

HALDAR, S.; SENGUPTA, S. **Microbial Ecology at Rhizosphere: Bioengineering and Future Prospective.** Singapore: Springer Singapore, 2016.

HENRY, S.; BRU, D.; STRES, B.; HALLET, S.; PHILIPPOT, L. 2006. **Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils.** Appl Environ Microb 72, 5181–5189.

HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER A. H.; YOUNG J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? **Nature** 394: 431

HELGASON, T.; FITTER A. H.; YOUNG J. P. W (1999) **Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides nonscripta* (bluebell) in a seminatural woodland.** *Mol Ecol* 8: 659–666.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. **Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology.** *Soil Biology and Biochemistry*, Kidlington, v. 42, n. 6, p. 878–887, jun. 2010.

ISLAM, M. R.; SULTANA, T.; MELVIN JOE, M.; CHO, J. C.; SA, T. **Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, Netherlands, v. 19, n. 3, p. 337–342, 2012.

JACOMINE, P. K. T. **Solos sob Caatinga: caracterização e uso agrícola.** In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F. & FONTES, M. P. F. *O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado.* Viçosa, MG: SBCS, 1996. p. 95-133.

JACOMINE, P. K. T. **Caracterização do estágio atual dos solos sob Caatinga.** In: ARAUJO, Q.R. de (org). *500 anos de uso do solo no Brasil.* Ilhéus: editus, 2002. p. 365-397.

JIANG, Y. et al. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. **Science**, v. 356, p. 1172-1175.

KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trends Plant Science**, v. 10, p. 22-29, 2005.

KENNEDY, A.C., 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74, 65–76.

KISTNER, C., & PARNISKE, M. (2002). **Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis.** *Trends in Plant Science*, 7(11), 511–518.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. a; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. **Methods of studying soil microbial diversity.** *Journal of microbiological methods*, Netherlands, v. 58, n. 2, p. 169–88, 2004.

KOHOUT, P., SUDOVÁ, R., JANOUŠKOVÁ, M., ČTVRTLÍKOVÁ, M., HEJDA, M., PÁNKOVÁ, H., SLAVÍKOVÁ, R., ŠTAJEROVÁ, K., VOSÁTKA, M., SÝKOROVÁ, Z., 2014. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: is there a universal solution? **Soil Biol. Biochem.** 68.

KOWALCHUK, G.A.; BODELIER, P.A.; HELIG, G.H.J.; STEPHEN, J.R.; LAANNBROEK, H.J. 1998. **Community analysis of ammonium oxidising bacteria in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation.** FEMS Microbiol. Ecol. 27, 339-350.

KRINGS, M. et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, p. 648-657, 2007.

KRSEK, M.; & WELLINGTON E. M. H. 1999. **Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil.** J. Microbiol. Methods 39:1–16

KUSKE, C. R.; BANTON, K. L.; ADORADA, D. L.; STARK, P. C.; HILL, K. K.; JACKSON, P. J. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.7, p.2463-2472, 1998.

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

LAKAY F.M.; BOTHA A.; PRIOR B.A. (2007). **Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils.** J Appl Microbiol 102: 265–273.

LEE, J.; LEE, S.; YOUNG, J. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiol. Ecol.** 65, 339–349.

LEWIS, J. D. **Mycorrhizal Fungi, Evolution and Diversification of.** In: Encyclopedia of Evolutionary Biology. Amsterdam: Elsevier, 2016. Amsterdam, p. 94–99.

LIMA, B. G. de et al. **Caracterização florística de duas áreas de caatinga na região Centro-Sul do Cearense.** 2011. 106 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Departamento de Ciências Vegetais, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2011.

LIMA, R. A. A. **Fungos micorrízicos arbusculares em áreas costeiras no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** Tese - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - RN, Natal, p. 120, 2018.

LLOYD-JONES, G.; HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. **Soil Biology & Biochemistry**, 33, (2001). p. 2053-2059.

LLOYD-MACGILP, S. A.; CHAMBERS, S. M.; DODD, J. C.; FITTER A. H.; WALKER, C.; YOUNG J. P. W. (1996). Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. **New Phytol** 133: 103–111.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. **Embrapa Caprinos e Ovinos Documentos (INFOTECA-E)**, Sobral, 2014.

LORENTZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. 1994. **Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment**. *Microbiol. Rev.* 58:563–602

MACIEL, B.M.; SANTOS, A.C.F.; DIAS, J.C.T.; VIDAL, R.O.; DIAS, R.J.C.; GROSS, E.; CASCARDO, J.C.M.; REZENDE, R.P. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. **Genetics and Molecular Research** 8 (1): p. 375-388 (2009).

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. s; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre, 2016.

MAIA, L. C. et al. Fungos micorrízicos arbusculares no Bioma Caatinga. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 Anos de Pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, p. 311-339, 2010.

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

MARENGO, J. A. et al. Variabilidade e mudanças climáticas no semiárido brasileiro. In: MEDEIROS, S. S. et al. **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**. 1. ed. Campina Grande : INSA, 2011, p.383-416.

MARINHO, F. et al. *Bulbospora minima*, a new species in the Gigasporales from semi-arid Northeast Brazil. **Sydowia**, v. 66, n. 2, p. 313-323, 2014.

MARINHO F.; SILVA, I.R.; OEHL, F.; MAIA, L.C. (2018) Checklist of arbuscular mycorrhizal fungi in tropical forests. – **Sydowia** 70: 107–127.

MARON, P. A.; MOUGEL, C.; SIBLOT, S.; ABBAS, H.; LEMANCEAU, P.; RANJARD, L. **Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment**. *Microbial Ecology*, Auburn, v. 53, n. 3, p. 426–434, 2007.

MARON P.A., MOUGEL C, RANJARD L.; **Soil microbial diversity**: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. 2011. *C R Biol* 334: 403–411.

MARTYNIUK, S.; WAGNER, G. H. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. **Soil Sci.**, 125: 343-350. 1978.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. **DNA Extraction from Soils : Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods**. *Applied and environmental microbiology*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2354–2359, 2001.

MARSTORP, H.; GUAN, X.; GONG, P., 2000. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. **Soil Biology and Biochemistry** 32, 879–882.

MELLO, C.M.A. **Fungos micorrízicos arbusculares do Núcleo de Desertificação de Cabrobró – PE**. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, p. 66, 2010.

MELLO, C.M.A.; SILVA, I.R.; PONTES, J.S.; GOTO, B.T.; SILVA, G.A.; MAIA, L.C. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil**. *Acta Botanica Brasilica*, v.26, n.4, p.938-943, 2012.

MERGULHÃO, A.C.E.S., BURITY, H.A., GOTO, B.T., MAIA, L.C. **Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a gypsum mining impacted semiarid área**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, p. 1052–1061, 2010.

MILLER, D.N.; BRYANT, J.E.; MADSEN, E.L.; GHIORSE, W.C. 1999. **Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples**. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724

MORE, M.I.; HERRICK, J.B.; SILVA, M.C.; GHIORSE, W.C.; MADSEN, E.L.1994. **Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment**. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572-1580

MUELLER G.; SCHMIT J., (2007). **Fungal biodiversity**: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv* 16: 1–5.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. d. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM rev. bras. med**, Rio de Janeiro, v. 67, n. supl. 10, 2010.

NIELSEN, M. N.; WINDING, A.; **Microorganisms as indicators of soil health**. Denmark: National Environmental Research Institute, 2002. 82 p. (Technical Report, 388).

NOBRE, C. P. et al. Agregação, Glomalina e Carbono Orgânico na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Revista Caatinga**, vol. 28, núm. 1, jan-mar, 2015, pp. 138-147. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, Brasil.

NOVAIS, C. B., SOUZA, F. A. E 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.

NUTZ, S; DÖLL, K; KARLOVSKY, P. **Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum***. *Anal Bioanal Chem*, 2011; 401:717–26.

OLDROYD, G. E. D. **Speak, friend and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants**. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013.

OLIVEIRA, E. M.; SOUTO, J. S. Mesofauna edáfica como indicadora de áreas degradadas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 1, n. 6, p. 1-9, jan/fev. 2011.

OLIVIER, C.; LORIA, R. 1998. Detection of *Helminthosporium solani* from soil and plant tissue with species-specific PCR primers. **FEMS Microbiol. Lett.** 168, 235–241.

PAGANO, M.C.; UTIDA, M.K.; GOMES, E.A.; MARRIEL, I.E.; CABELLO, M.N.; SCOTTI, M.R. **Plant-type dependent changes in arbuscular mycorrhizal communities as soil quality indicator in semiarid Brazil**. *Ecological Indicators*, v.11, n.2, p.643-650, 2011b.

PAGET, E.; JOCTEUR, L. M.; SIMONET, P. 1992. **Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer.** FEMS Microbiol. Lett. 97:31–40.

PAN Y.; BODROSSY L.; FRENZEL P.; HESTNES A. G.; KRAUSE S. et al.; (2010) Impacts of Inter- and Intralaboratory Variations on the Reproducibility of Microbial Community Analyses. **Appl Environ Microbiol** 76: 7451–7458.

PETRIC, I.; PHILIPPOT, L.; ABBATE, C.; BISPO, A.; CHESNOT, T.; HALLIN, S.; LAVAL, K.; LEBEAU, T. et al. 2011. Interlaboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples”. **J Microbiol Methods** 84, 454–460.

PHILIPPOT, L.; ABBATE, C.; BISPO, A.; CHESNOT, T.; HALLIN, S. **Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction.** Journal of Soils and Sediments, Switzerland, v. 10, n. 7, p. 1344–1345, 2010.

PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. 2000. **Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from maize rhizosphere at different stages of plant growth.** Appl. Environ. Microbiol. 66, 948–955.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. **Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review.** **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.

PLASSART, P.; TERRAT, S.; THOMSON, B.; GRIFFITHS, R.; DEQUIEDT, S.; LELIEVRE, M.; REGNIER, T.; NOWAK, V.; BAILEY, M.; LEMANCEAU, P.; BISPO, A.; CHABBI, A.; MARON, P.-A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. **Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure.** PLoS ONE, London, v. 7, n. 9, p. e44279, 2012.

POLLOCK, J.; GLENDINNING, L.; WISEDCHANWET, T.; WATSON, M. 2018. **The madness of microbiome: attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies.** Appl Environ Microb 84, e02627-17.

PONTES, J. S.; OEHL, F.; MARINHO, F.; COYNE, D.; SILVA, D. K. A.; YANO-MELO, A. M.; MAIA, L. C. 2017. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil's Caatinga and experimental agroecosystems. **Biotropica** 0(0): 1- 15 p.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indicator of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, p.159-164, 1987.

PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 1. ed. Recife: EDUSPE, 2003. p. 3-74.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 914p

RAJENDHARAN J.; GUNASEKARAN P.; (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnol Adv** 26: 576–590.

REDECKER, D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza** 10: 73–80.

RENKER, C.; WEISSHUHN, K.; KELLNER, H.; BUSCOT, F. (2006). Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. **Mycorrhiza** 16: 525–531.

RIBEIRO, M. R.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; GALINDO, I. C. L. Os solos e o processo de desertificação no Semi-árido brasileiro. In: RIBEIRO, M. R. et al. **Tópicos em ciência do solo**. 7. Ed. Viçosa: SBCS, 2009. P. 413-459.

ROBE P.; NALIN R.; CAPELLANO C.; VOGEL T.M.; SIMONET P.; **Extraction of DNA from soil**. 2003. *Eur J Soil Biol* 39: 183–190.

ROMANOWSKI, G.; LORENTZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. 1993. **Use of polymerase chain reaction and electroporation of Escherichia coli to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils**. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3438–3446.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. 2001. **The species concept for prokaryotes**. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67.

ROOSE-AMSALEG C.L.; GARNIER-SILLAM E.; HARRY M. (2001). **Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples**. *Agric, Ecosyst Environ, Appl Soil Ecol* 18: 47–60.

ROSA, M. M. **Avaliação de diferentes metodologias para extração de DNA de solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. Dissertação - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, p. 100, 2006.

SÁENZ, J. S.; ROLDAN, F.; JUNCA, H.; ARBELI, Z. 2019. Effect of the extraction and purification of soil DNA and pooling of PCR amplification products on the description of bacterial and archaeal communities. **Journal of Applied Microbiology** ISSN 1364-5072.

SANDERS, I. R.; ALT, M.; GROPE, 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: 419–427.

SAANO, A. TAS, E.; PIPPOLA, S.; LINDSTROM, K.; VAN ELSAS, J. D. Extraction and analysis of microbial DNA from soil, in: TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. (Eds.), **Nucleic Acids in the Environment**. Springer, Berlin, Germany, pp. 49-67, 1995.

SALCEDO, I. H.; SAMPAIO, E. V. S. B. **Matéria Orgânica do Solo no Bioma Caatinga**. In: SANTOS, G. de A.; CAMARGO, F. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 419-441.

SANTOS, M. C. et al., 2010. **Solo do Semiárido: Riqueza & Oportunidade. Cardenos do Semiárido**. Conselho Regional de Engenharia e Agronomia - PE, 2016. p.60.

SCHNEEGURT, M.A.; DORE, S.Y.; KULPA, C.F. Jr; 2003. **Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology**. *Curr Issues Mol Biol* 5, 1–8.

SCHOLOSS P.D.; HANDELSMAN J.; (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr Opin Biotechnol** 14: 303–310

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. **Toward a Census of Bacteria in Soil**. *Plos Computacional Biology*, San Francisco, v. 2, n. 7, p. 786–793, 2006.

SCHLOTTER, M.; NANNIPIERI, P.; SØRENSEN, S. J.; ELSAS, J. D. Van. **Microbial indicators for soil quality. Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 54, n. 1, p. 1–10, 2018.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. 2012. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. **J Appl Microbiol** 113, 1014–1026.

SELBACH, P. A. **Optimization of a DNA extraction procedure for phylogenetic probe analysis of soil microbial communities**. 1998. University of Wisconsin. Madison, 1998.

SEUFERT, V. **Comparing Yields: Organic Versus Conventional Agriculture**. Encyclopedia of Food Security and Sustainability, Netherlands, v. 3, p. 196–208, 2019.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. (1992). **Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots**. Appl Environ Microbiol 58: 291–295.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (org). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília (DF): MMA/UFPE/Conservation International – Biodiversitas – Embrapa Semi-árido, 2004. 382p.

SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B.; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T.; PEREIRA, L. A.; SÁ, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. **Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos**. 2010. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: Embrapa Semiárido, cap. 1, p. 18-48, 2010.

SILVA, I.R. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares ao longo de um gradiente vegetacional na caatinga**. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife. p. 103, 2013.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. 1989. **Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 24 (12): 1499-1506.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R. S. 1994. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Embrapa-SPI. 142 p.

SIQUEIRA, J.O.; KLAUBERG-FILHO, O. 2000. **Micorrizas Arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva**. In: Novaes, R.F., Alvarez, V. H., Schaefer, V. C.E.G.R.(eds.) Tópicos avançados em ciências do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa. pp. 235-264.

SMALLA, K.; CRESSWELL, N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; WOLTERS, A.; VAN ELSAS, J. D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, n.1, p.78-85, 1993.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. **Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth**. Mycologia, v.104, p.1–13, 2012.

SOSA, K. S. F. **Índices de qualidade biológica do solo em área sob manejo de adubos verdes**. Mestrado – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Areia, p. 76, 2019.

SOUSA, C. S. **Diversidade e atividade de fungos micorrizicos arbusculares em agrossistemas do semi-árido Paraibano**. Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, p. 136, 2009.

SOUSA, C. S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; OEHL, F.; MAIA, L. C.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F. S. 2012. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi after organic fertilization in maize, cowpea and cotton intercropping systems. **Acta. Sci. Agron.** 34: 149–156.

SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; OEHL, F.; MAIA, L.C.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. 2012. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi after organic fertilization in maize, cowpea and cotton intercropping systems. **Acta Scientiarum Agronomy** 149- 156.

SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; LIMA, F.S.; OEHL, F.; MAIA, L.C. **Arbuscular mycorrhizal fungi within agroforestry and traditional land use systems in semi-arid Northeast Brazil**. *Acta Scientiarum – Agronomy*, v.35, n.3, p.307-314, 2013

SOUZA, F.A.; SILVA, I.C.L.; BERBARA, R.L.L. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava**. In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brusssard, L. (Eds.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2008.

STACH J. E. M.; BATHE S.; CLAPP J. P.; BURNS R. G. (2001). **PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods**. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 139–151.

STEFFAN, R. J., GOKSÙYR, J., BEJ A. K. and ATLAS R. M. (1988) **Recovery of DNA from soils and sediments**. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2908-2915

STEIBEL, J. P. et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, San Diego, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.

STERKENBURG E, BAHR A, BRANDSTROM DURLING M, CLEMMENSEN KE, LINDAHL BD. 2015 – Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. **New Phytologist**. 207, 1145– 58.

TERRAT, S.; CHRISTEN, R.; DEQUIEDT, S.; LELIÈVRE, M.; NOWAK, V.; REGNIER, T.; BACHAR, D.; PLASSART, P.; WINCKER, P.; JOLIVET, C.; BISPO, A.; LEMANCEAU, P.; MARON, P. A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. **Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure**. *Microbial Biotechnology*, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 135–141, 2012.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K. **Opening the black box of soil microbial diversity**. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 109–122, 1999.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**. vol.64, p. 53-52.

TSAI, Y. L.; OLSON H. 1991. **Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment**. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1070–1074.

VIESTEL, M. A. D. **Método rápido de extração de DNA em solos tropicais, Rio de Janeiro**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995, 90p. (Dissertação de Mestrado).

VOLOSSIOUK T.; ROBB, E.J. NAZAR, R.N. (1995). **Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms**. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3972-3976.

WECHTER, P.; WILLIAMSON, J.; ROBERTSON, A.; KLUEPFEL, D. A rapid, costeffective procedure for the extraction of microbial DNA from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.85-91, 2003.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; WATRUD, L. S. 1996. **Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms**. *Mol. Ecol.* 5: 603–613.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

WUST, P.K., NACKE, H., KAISER, K., MARHAN, S., SIKORSKI, J.,e KANDELER, E., DANIEL, R. & OVERMANN, J. (2016) **Estimates of soil bacterial ribosome content and diversity are significantly affected by the nucleic acid extraction method employed**. *Appl Environ Microb* 82, 2595–2607.

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, v. 11, p. 115-121, 1997.

YOUNG, J.M. et al., **Limitations and recommendations for successful DNA extraction from forensic soil samples:** A review, Sci. Justice (2014).

YUAN, J. S. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC bioinformatics**, London, v. 7, n. 85, 2006.

ZIELINSKA, S.; RADKOWSKI, P.; BLENDOWSKA, A.; LUDWIG-GALEZOWSKA, A.; LOS, J. M.; LOS, M. 2016. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. **MicrobiologyOpen**. 2017;00:e00453.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. 1996. **DNA recovery from soil of diverse composition.** Appl. Environ. Microbiol. 62, 316-322.

APÊNDICES

- Análise fatorial no Rstudio Variável Pureza

Legenda:

FATOR 1: Protocolo

FATOR 2: Tipo de Solo

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Protocolo	4	3.8118	0.95295	130.729	0.000000
Tipo de Solo	6	0.3506	0.05843	8.015	0.000001
Protocolo*Tipo de Solo	24	0.2578	0.01074	1.474	0.107183
Residuo	70	0.5103	0.00729		
Total	104	4.9305			

CV = 5.61 %

- Análise Fatorial no Rstudio Variável quantidade de DNA na Extração

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Protocolo	4	10152	2537.	97 30.1764	0.00000000
Tipo de Solo	6	11797	1966.24	23.3786	0.00000000
Protocolo*Tipo de Solo	24	6167	256.95	3.0552	0.00014895
Residuo	70	5887	84.10		
Total	104	34003			

CV = 61.84 %

Interação significativa: desdobrando a interação

Desdobrando Protocolo dentro de cada nível de Tipo de Solo

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Tipo de Solo	6	11797.4267	1966.23779	23.3786	0
Protocolo:Tipo de Solo AR	4	472.6831	118.17078	1.4051	0.2413
Protocolo:Tipo de Solo CA	4	2861.0283	715.25707	8.5044	0
Protocolo:Tipo de Solo LA	4	1039.7925	259.94813	3.0908	0.0211
Protocolo:Tipo de Solo LU	4	2617.6840	654.42101	7.7811	0
Protocolo:Tipo de Solo NE	4	186.1072	46.52679	0.5532	0.6973
Protocolo:Tipo de Solo PL	4	309.1452	77.28629	0.9189	0.4579
Protocolo:Tipo de Solo VE	4	8832.2814	2208.07036	26.254	0
Residuo	70	5887.2989	84.10427		
Total	104	34003.4473	326.95622		

Desdobrando Tipo de Solo dentro de cada nível de Protocolo

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr.Fc
Protocolo	4	10151.8689	2537.96722	30.1764	0
Tipo de Solo:Protocolo G	6	1136.2208	189.37014	2.2516	0.0481
Tipo de Solo:Protocolo I	6	2229.9411	371.65686	4.419	8e-04
Tipo de Solo:Protocolo M	6	11676.8765	1946.14608	23.1397	0
Tipo de Solo:Protocolo S	6	828.0092	138.00153	1.6408	0.1489
Tipo de Solo:Protocolo SE	6	2093.2319	348.87199	4.1481	0.0013
Residuo	70	5887.2989	84.10427		
Total	104	34003.4473	326.95622		

Quadro da análise de variância pH

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	5.3820	0.89700	69.87	1.2512e-09
Residuo	14	0.1797	0.01284		

Total 20 5.5617

CV = 1.92 %

Quadro da análise de variância Na

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	129.14	21.524	1.4304	0.27118
Residuo	14	210.67	15.048		
Total	20	339.81			

CV = 36.04 %

Quadro da análise de variância K⁺

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	5314.6	885.76	34.383	1.3443e-07
Residuo	14	360.7	25.76		
Total	20	5675.2			

CV = 28.96 %

Quadro da análise de variância Al³⁺

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	0.067381	0.0112302	2.0963	0.1191
Residuo	14	0.075000	0.0053571		
Total	20	0.142381			

CV = 74.98 %

Quadro da análise de variância M.O.

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	17.169	2.86142	3.0076	0.041979
Residuo	14	13.319	0.95138		
Total	20	30.488			

CV = 32.69 %

Quadro da análise de variância P

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	8906.8	1484.47	7.7472	0.00081587
Residuo	14	2682.6	191.61		
Total	20	11589.4			

CV = 57.53 %

Quadro da análise de variância Areia

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	3544.4	590.74	21.272	2.7702e-06
Residuo	14	388.8	27.77		
Total	20	3933.2			
