

## Protocolo para extração de DNA de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas visando o monitoramento ambiental

O monitoramento da saúde dos solos onde se cultiva cana-de-açúcar é de suma importância para a sustentabilidade deste agrossistema. Uma alternativa para este processo é o acompanhamento da população de fungos micorrízicos arbusculares associados à cultura. Mas, para isto, necessita-se de eficientes protocolos para extração total do DNA das raízes micorrizadas. Assim, objetivou-se avaliar dois protocolos para extração do DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas. A pesquisa foi realizada no município de Castelo Branco-PR, em uma área cultivada com cana-de-açúcar, a área foi subdividida em duas megaparcels de 2,0 ha cada e foram coletadas amostras de raízes das plantas de cana-de-açúcar em 15 pontos distintos por megaparcels. Dois protocolos foram testados, o I baseado na trituração das raízes com pérolas de vidro e emprego de clorofane e o II com maceração das raízes com nitrogênio líquido e emprego do detergente SDS a 25%. Em ambos se utilizou 50 mg de raízes para extração do DNA e para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose a 1% e revelação em transiluminador LED. O protocolo I proporcionou a obtenção de DNA em boa concentração e pureza e o protocolo II mostrou-se pouco eficiente para extração de DNA de raízes de cana, pois verificou-se muitos contaminantes em todas as amostras extraídas, contaminantes estes que podem interferir no emprego do DNA extraído para outras aplicações.

**Palavras-chave:** Sustentabilidade Agrícola; Saccharum officinarum; Fungos Micorrízicos Arbusculares.

## Protocol for mycorrhizing sugar cane roots DNA extraction for environmental monitoring

Monitoring the health of the soils where sugarcane is grown is of paramount importance for the sustainability of this agrosystem. An alternative to this process is the monitoring of the population of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the culture. However, for this, protocols are needed for the total reception of DNA from the mycorrhizal roots. Thus, the objective was to evaluate two protocols for obtaining total DNA from mycorrhizal roots. A survey carried out in the municipality of Castelo Branco-PR, in an area cultivated with sugarcane, an area was subdivided into two megaplots of 2.0 ha each and samples of root cane roots were collected in 15 distinct points per megaplot. Two were tested, the I based on the use of the theories with the use of roots and use of roots and the chlorine with maceration of the roots with liquid detergent and 25% SDS detergent. In both, 50 mg of roots are used for DNA quality and to select the quality of the extracted DNA, an electrophoretic run was carried out in 1% agarose and revelation in an LED transilluminator. Protocol I evaluated the amount of DNA in a good amount and the protocol of manipulated DNA in a good amount, since the DNA in all attempts at contamination can interfere with DNA contamination extracted DNA for other applications.

**Keywords:** Agricultural Sustainability; Saccharum officinarum; Arbuscular Mycorrhizal Fungi.

Topic: **Microbiologia Agrícola e Ambiental**

Received: **10/10/2022**

Approved: **20/10/2022**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

**Sabrina Pariz**

Universidade Cesumar, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1773983062439048>

[sabrinapariz000@gmail.com](mailto:sabrinapariz000@gmail.com)

**Francieli Gasparotto** 

Universidade Cesumar, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2673470812353146>

<http://orcid.org/0000-0002-4038-7364>

[francieli.gasparotto@unicesumar.edu.br](mailto:francieli.gasparotto@unicesumar.edu.br)

**Fabiana lurk de Souza**

Universidade Cesumar, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1562365112806776>

[fabianayurk7@gmail.com](mailto:fabianayurk7@gmail.com)

**Márcia Aparecida Andreazzi** 

Universidade Cesumar, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/0356767742666814>

<http://orcid.org/0000-0002-4663-3837>

[marcia.andreazzi@unicesumar.edu.br](mailto:marcia.andreazzi@unicesumar.edu.br)



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2022.010.0006

### Referencing this:

PARIZ, S.; GASPAROTTO, F.; SOUZA, F. I.; ANDREAZZI, M. A.. Protocolo para extração de DNA de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas visando o monitoramento ambiental. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.13, n.10, p.48-55, 2022. DOI:

<http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2022.010.0006>

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar apresenta relevante importância na economia brasileira, o país não é só o maior produtor mundial da cultura, como também é o maior produtor mundial de açúcar e etanol de cana (CONAB, 2021). Ainda segundo a Companhia estima-se que na safra 2022/2023 a cultura ocupe mais de 8 milhões de hectares no Brasil e sejam produzidas aproximadamente 572,9 milhões de toneladas (CONAB, 2022).

Para atender a elevada demanda por esta gramínea, tanto em quantidade quanto em qualidade, torna-se necessário o planejamento correto das atividades envolvidas em todo seu ciclo produtivo, desde o manejo do solo que antecede o plantio até a colheita (ARCOVERDE et al., 2019). Destaca-se que o cultivo intensivo desta cultura, sem critérios técnicos, pode acarretar alterações na qualidade do solo e da água nas regiões de cultivo, levando a insustentabilidade do agroecossistema.

Neste sentido, o monitoramento das áreas de cultivo é de suma importância, porém, os solos geralmente reagem lentamente as mudanças em seu uso e manejo, dessa forma, torna-se mais difícil detectar mudanças em sua qualidade antes de danos mais severos (BÜNEMANN et al., 2018). Uma alternativa para monitorar estas alterações se dá por meio do acompanhamento da variação da população microbiana, e entre os organismos que podem ser avaliados destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares, que apresentam eficiente simbiose com as plantas de cana-de-açúcar e ainda com grande diversidade de outras espécies (PARNISKE, 2008; AMBROSANO et al., 2010; DATTA et al., 2012; SCHIAVO et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Quando associados as raízes de espécies vegetais este grupo de fungos proporciona diversos benefícios, contribuindo com a nutrição das plantas, diminuindo o consumo de fertilizantes, promovendo maximização do equilíbrio ecológico, maior crescimento, aumento de produção, preservação ambiental, maior tolerância a estresses abióticos, melhor potencial hídrico e respostas positivas a déficit hídrico (FERROL et al., 2019; DURAZZINI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018; BERRUTI et al., 2016; ZOU et al., 2015).

Uma forma de monitorar a população de fungos micorrízicos arbusculares associados as raízes da cana-de-açúcar se dá por meio da aplicação de técnicas moleculares (BONITO et al., 1995; MARON et al., 2011), porém para isto, é necessário a extração do DNA tanto das raízes quanto dos fungos ali presentes, em boa qualidade e quantidade. E a qualidade do DNA isolado, pode ser influenciada pelo tipo de tecido e pela maneira como a amostra foi conservada e manipulada (SILVA et al., 2015). Portanto, personalizar protocolos para melhorar o isolamento do DNA total de raízes de cana micorrizadas é crucial. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar dois protocolos para extração do DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas, visando posteriores estudos de diversidade genética.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Área de estudo e amostras de raízes

O estudo foi desenvolvido em uma das áreas de pesquisa do Projeto Monitoramento edáfico e hidrossedimentológico em duas unidades de produção agrícola no Noroeste do Paraná, conduzido pela

Universidade Cesumar - UNICESUMAR. O projeto faz parte do “Programa da Rede Paranaense de Apoio a Agropesquisa e Formação Aplicada” da Fundação Araucária/Seti/Senar/PR.

A área de estudo se localiza na mesorregião Noroeste do Paraná, na cidade de Presidente Castelo Branco, sob as coordenadas 23°11'29.4''S e 52°05'59.0''W, e solo classificado como Argissolo Vermelho distrófico. Neste local a cultura da cana-de-açúcar vem sendo explorada a cerca de 10 anos por um grupo sucroalcooleiro, o atual cultivo foi implantado de forma mecanizada a 3 anos com a variedade RB867515, e a colheita vem sendo realizada de forma mecanizada sem queima.

A referida área foi dividida em duas megaparcelas, de 2,0 ha cada. Em cada megaparcela foi realizada uma amostragem das raízes de cana, por meio da coleta de 15 pontos distintos por megaparcela, distribuídos em grid e georreferenciados. Estas foram embaladas em sacos plásticos e transportadas até o Laboratório de Análises Agronômicas (Agrolab) onde foi realizada a seleção das amostras de raízes micorrizadas.

Foram selecionadas 50 mg de raízes colonizadas em microscópio ótico, sendo a colonização evidenciada pela presença de arbúsculos ou vesículas coradas em azul de tripano. Na seleção amostrou-se diferentes tipos de micélio interno (fino e grosso) e a presença de vesículas. Posteriormente as raízes selecionadas foram encaminhadas para análise molecular no Laboratório de Biotecnologia Molecular, Celular e Genética (BIOCELGEN).

### **Extração de DNA total e avaliação da qualidade**

Foram testadas duas metodologias para extração do DNA total (raízes + fungos micorrízicos), a metodologia proposta por Raeder et al. (1985) com adaptações, baseada na trituração com perólas de vidro e emprego de clorofane (fenol:clorofórmio:isopropanol; 24:24:1), para purificação do DNA (Protocolo 1), onde 50 mg de raízes foram depositadas em microtubos de 1,5 mL, em seguida, foram adicionadas 3 pérolas de vidro e 500 µL de tampão de lise (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS). Em seguida e os microtubos foram agitados rigorosamente em vórtex por 5 min para promover lise celular. Então, os microtubos receberam 5 µL de RNase A (10 mg/mL) e então foram incubados em banho maria a 65°C durante 30 minutos (Figura 1).

Posteriormente, adicionou-se 500 µL de clorofane (fenol:clorofórmio:isopropanol; 24:24:1), homogeneizado levemente, e levado a centrifuga a 10.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo onde foi adicionado o mesmo volume transferido de clorofane. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo. Então adicionou-se o mesmo volume de isopropanol em temperatura ambiente e o material foi homogeinizado por leve inversão.

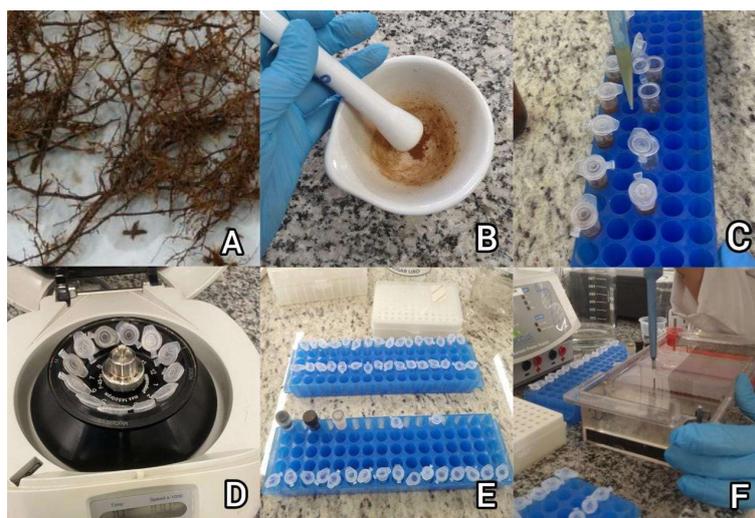
As amostras foram então incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, ocorrendo assim a fixação do DNA no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de álcool 70%, procedeu-se a mistura do DNA e do álcool por leve inversão e os microtubos contendo a mistura foram levados para centrifuga a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e os microtubos foram invertidos para secagem completa do

DNA. Posteriormente adicionou-se 50 µL de solução TE e então o DNA foi armazenado sob refrigeração a -20°C.



**Figura 1:** (A) Raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.); (B) Raízes selecionadas e adição de pérolas de vidro; (C) Adição da solução tampão de lise; (D) Trituração em Vórtex; (E) amostras centrifugadas; (F) Quantificação do DNA em gel de agarose 1%; (G) corrida eletroforética.

O outro protocolo testado foi adaptado de Souza et al. (2002), com maceração das raízes com nitrogênio líquido e emprego do detergente SDS a 25% (Protocolo 2). Inicialmente foram adicionadas 50 gr de raízes micorrizadas em um cadinho e procedeu-se a maceração com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Cerca de 300µL do macerado foram transferidos para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 400µL de tampão SET (NaCl 0,15M, Tris 0,02M, EDTA 1mM pH 8,0) + 14,5µL de proteinase K (10mg/mL) + 18µL de SDS (25%). O material foi então incubado por 1 hora à 55°C. Após este período adicionou-se 400µL de NaCl 5M e procedeu-se a homogeneização em vórtex (Figura 2).



**Figura 2:** (A) Raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.); (B) Trituração com nitrogênio líquido; (C) Adição da solução tampão; (D) centrifugação das amostras; (E) amostras coradas com Safer Dye (Kasvi) e utilizou-se Ladder de 1 Kb (Ludwig Biotec) para controle (F) Quantificação do DNA em gel de agarose 1%; (F) Quantificação do DNA em gel de agarose 1%; (F) Quantificação do DNA em gel de agarose 1%.

Então, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde adicionou-se 150µL de Tris (0,01M pH 8,0). Procedeu-se então outra centrifugação por 10

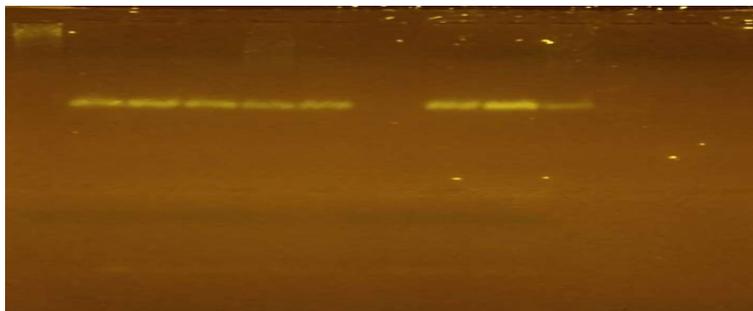
minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado em um novo microtubo e adicionou-se 6µL de RNase (10mg/mL), o material foi então incubado por meia hora a 37°C. Após a incubação adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio ao sobrenadante coletado e centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se o mesmo volume de etanol 100%. Os microtubos foram então incubados à -20°C overnight.

Após o período, procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se etanol 70%. Centrifugou-se, novamente, por 20 minutos a 12.000 rpm e o etanol foi descartado. Os tubos foram então invertidos e mantidos abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi então ressuscitado adicionando-se 100µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram armazenadas a 4°C.

Para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. As amostras foram coradas com Safer Dye (Kasvi) e foi utilizado o Ladder de 1 Kb (Ludwig Biotec) para controle. Os produtos obtidos foram submetidos a revelação em transiluminador LED, para visualização e registro do DNA extraído.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

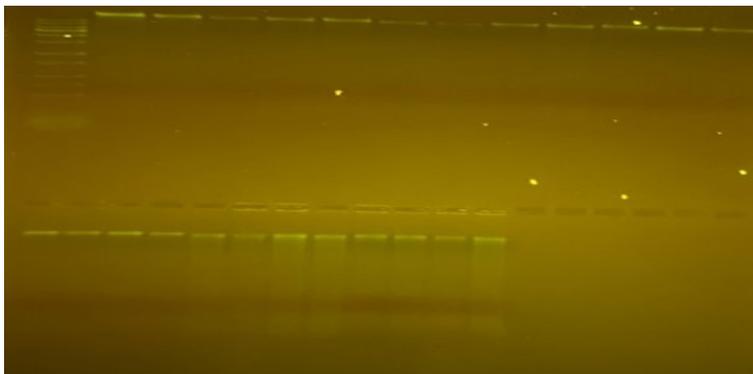
A extração de DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas por meio de trituração com pérolas de vidro e emprego de clorofane (Protocolo I) possibilitou a obtenção de DNA de boa qualidade por apresentar bandas integras e não haver material retido no poço do gel, indicando que não houve contaminação por polissacarídeos (Figura 3).



**Figura 3:** Gel de agarose contendo amostras de DNA extraídas de raízes de cana-de-açúcar empregando trituração com pérolas de vidro e clorofane (Protocolo 1).

Já o protocolo II apresentou menor eficiência, pois verificou-se muitos contaminantes em todas as amostras extraídas por este protocolo (Figura 4), interferindo em uma leitura limpa do DNA, o que pode alterar os resultados de posteriores reações de polimerase em cadeia (PCR) visando a determinação da diversidade genética dos fungos micorrízicos associados as raízes de cana-de-açúcar.

Segundo Oliveira et al. (2007) a extração de DNA deve incluir de forma básica dois procedimentos principais: a quebra das células presentes nas amostras e a purificação do DNA. Após o rompimento das células, o DNA deve ser separado dos resíduos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas.



**Figura 4:** Gel de agarose contendo amostras de DNA extraídas de raízes de cana-de-açúcar empregando o protocolo baseado na maceração com nitrogênio líquido e SDS 25% (Protocolo II).

Destaca-se que em ambos os protocolos testados, após a extração do DNA total das amostras de raízes, o DNA obtido foi suspenso em solução tampão TE, porém, o protocolo II não foi eficiente para separar o DNA total extraído das raízes e os contaminantes, o que pode ser verificado pelos arrastes apresentados na figura 04. Apenas o protocolo I possibilitou a extração do DNA em boa concentração, integridade e pureza, sem arrastes (Figura 3).

Nesta perspectiva, Latif et al. (2017) abordam que durante o processo de extração do DNA, solventes, detergentes, sais e outras substâncias são empregadas visando reduzir a ação que compostos presentes nos vegetais ocasionam na integridade do DNA extraído. Contudo, mesmo com o uso de 25% de SDS observou-se nesta pesquisa arraste vertical durante a amplificação do DNA extraído por meio do protocolo II (Figura 4).

Ressalta-se ainda que para a identificação molecular de espécies de fungos micorrízicos arbusculares associados a plantas de cana-de-açúcar a obtenção de um DNA genômico com qualidade é essencial, assim como destacado por Silva et al. (2015). A qualidade do DNA extraído é o primeiro passo para a determinação da variabilidade genética molecularmente. Todavia, estudos relatam diversos problemas no isolamento de DNA de plantas devido a contaminantes presentes nos tecidos vegetais (PEDRI et al., 2020; LUCAS et al., 2019; AGBAGWA et al., 2012).

Assim, o protocolo I é uma alternativa para obtenção de DNA de fungos micorrízicos arbusculares em simbiose com raízes de cana para o desenvolvimento de futuros estudos de diversidade genética ou monitoramento ambiental em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Este é um passo relevante já que a análise baseada em características morfológicas, destes organismos, muitas vezes apresenta baixa eficiência a nível de espécie como abordado por Novais et al. (2010). Desta forma, o emprego de técnicas moleculares pode ser útil para a identificação da variabilidade de FMAs associadas a cana.

## CONCLUSÕES

O protocolo I com trituração das raízes com pérolas de vidro e limpeza com clorofane (fenol:clorofórmio:isopropanol; 24:24:1) foi eficiente para ser utilizado na obtenção de DNA total contendo DNA das raízes de cana-de-açúcar e DNA dos fungos micorrízicos arbusculares, promovendo a obtenção de DNA de qualidade.

Já o protocolo II com maceração em nitrogênio líquido e lise com SDS 25% não foi eficiente para obtenção de DNA de raízes de cana micorrizadas, pois as amostras apresentaram contaminação com contaminantes.

O protocolo I apresenta-se como um recurso útil para futuras pesquisas de monitoramento de espécies de fungos micorrízicos arbusculares associados a raízes de cana-de-açúcar via molecular.

## REFERÊNCIAS

AGBAGWA, I.; DATTA, S.; PATIL, P.; SINGH, P.; NADARAJAN, N. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.4, p.4632-4639, 2012. DOI: <http://doi.org/10.4238/2012.September.14.1>

AMBROSANO, E. J.; AZCÓN, R.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E. A.; MURAOKA, T.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSI, F.; GUIRADO, N.; UNGARO, M. R. G.; TERAMOTO, J. R. S.. Crop rotation biomass and arbuscular mycorrhizal fungi effects on sugarcane yield. **Scientia Agricola**, v.67, n.6, p.692-701, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0103-90162010000600011>

ARCOVERDE, S. N. S.; SOUZA, C. M. A.; ORLANDO, R. C.; SILVA, M. M.; DO NASCIMENTO, J. M. Crescimento inicial de cultivares de cana-de-açúcar em plantio de inverno sob preparos conservacionistas do solo. **Revista Engenharia na Agricultura**, v.27, n.2, p.142-156, 2019. DOI: <http://doi.org/10.13083/reveng.v27i2.803>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.9 – safra 2022/23, n.2 – segundo levantamento. 2022.

CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.8 – safra 2021/22, n. 1 - terceiro levantamento. 2021.

DATTA, P.; KULKARNI, M.. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in sugarcane rhizosphere in relation with soil properties. **Notulae Scientia Biologicae**, v.4, n.1, p.66-74, 2012. DOI: <https://doi.org/10.15835/nsb416567>

SCHIAVO, J. A.; AZEVEDO, L. S.; LIMA, M. F.; OLIVEIRA, N. S.; LOPES, V. R.. Crescimento inicial de cana-de-açúcar inoculada com fungos micorrízicos arbusculares e fósforo. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.2, p.398-407. DOI: <http://doi.org/10.19084/RCA17136>

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V.. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers Microbiology**, v.6, p.1-13, 2016. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>

BONITO, R. D.; ELLIOT, M. L.; DES JARDINS, E. A.. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2809-2810, 1995. DOI: <http://doi.org/10.1128/aem.61.7.2809-2810.1995>

BÜNEMANN, E.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R.; DEYN, G.; GOEDE, R.; FLESKENS, L.; GEISSEN V.; KUYPER, T.; MÄDER, P.; PULLEMAN, M.; SUKKE, W.; GROENIGEN, J.; BRUSSAARD, L.. Soil quality: A critical review. **Soil Biology**

**and Biochemistry**, v.120, p.105-125, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>

DURAZZINI, A. M. S.; TEIXEIRA, M. A.; ADAMI, A. A. V.. Quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo sob diferentes cultivos de cafeeiros. **Revista Agrogeoambiental**, v.8, n.4, p.83-91, 2016. DOI: <http://doi.org/10.18406/2316-1817v8n42016923>

FERROL, N.; AGUILAR, C. A.; TIENDA, J. P.. Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v.280, p.441-447, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>

LATIF, A. A.; OSMAN, G.. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. **Plant Methods**, v.13, n.1, p.1, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>

LUCAS, M. S.; CARVALHO, C. S.; HYPOLITO, G. B.; CÔRTEZ, M. C.. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. **Hoehnea**, v.46, n.2, e942018, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1590/2236-8906-94/2018>

MARON, P. A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L.. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus Biologies**, v.334, n.4-5, p.403-411, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.003>

NOVAIS, C. B.; SOUZA, F. A.; SIQUEIRA, J. O.. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.886-896, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000800015>

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N.. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

PEDRI, E. C. M.; BRAGA, C. S.; OLIVEIRA, C. A. C.; TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B.. Avaliação de dois métodos de trituração foliar de *Acianthera ciliata* (Orchidaceae) para extração de DNA. **Nativa**, v.8, n.1, p.97-101, 2020. DOI: <http://doi.org/10.31413/nativa.v8i1.7252>

PARNISKE, M.. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.10, p.763-775, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro1987>

RAEDER, U.; BRODA, P.. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, n.1, p.17-20, 1985. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. A.. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. **Ciência Florestal**, v.28, n.1, p.25-34, 2018. DOI: <http://doi.org/10.5902/1980509831572>

SILVA, A. Z. C.; COSTA, R. B.; CAMPOS, D. T. S.. Comparação de três tampões para extração de DNA genômico de tecidos foliares de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **Multitemas**, n.48, p.179-193, 2015.

SILVA, F. F.; SANTOS, T. A.; JESUS, E. C.; CHAER, G. M.. Characterization of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in areas impacted by gravel mining in Brazil. **Revista Caatinga**, v.32, n.4, p.995-1004, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n416rc>

SOUZA, C. S.; PEREIRA, C. D.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; KERR, W. R.. Extração de DNA genômico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) para análises AFLP. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.1-5, 2002.

ZOU, Y. N.; HUANG, Y. N.; WU, Q. S.; HE, X. H.. Mycorrhiza-induced lower oxidative burst is related with higher antioxidant enzyme activities, net H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effluxes, and Ca<sup>2+</sup> influxes in trifoliolate orange roots under drought stress. **Mycorrhiza**, v.25, p.143–152, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00572-014-0598-z>

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.