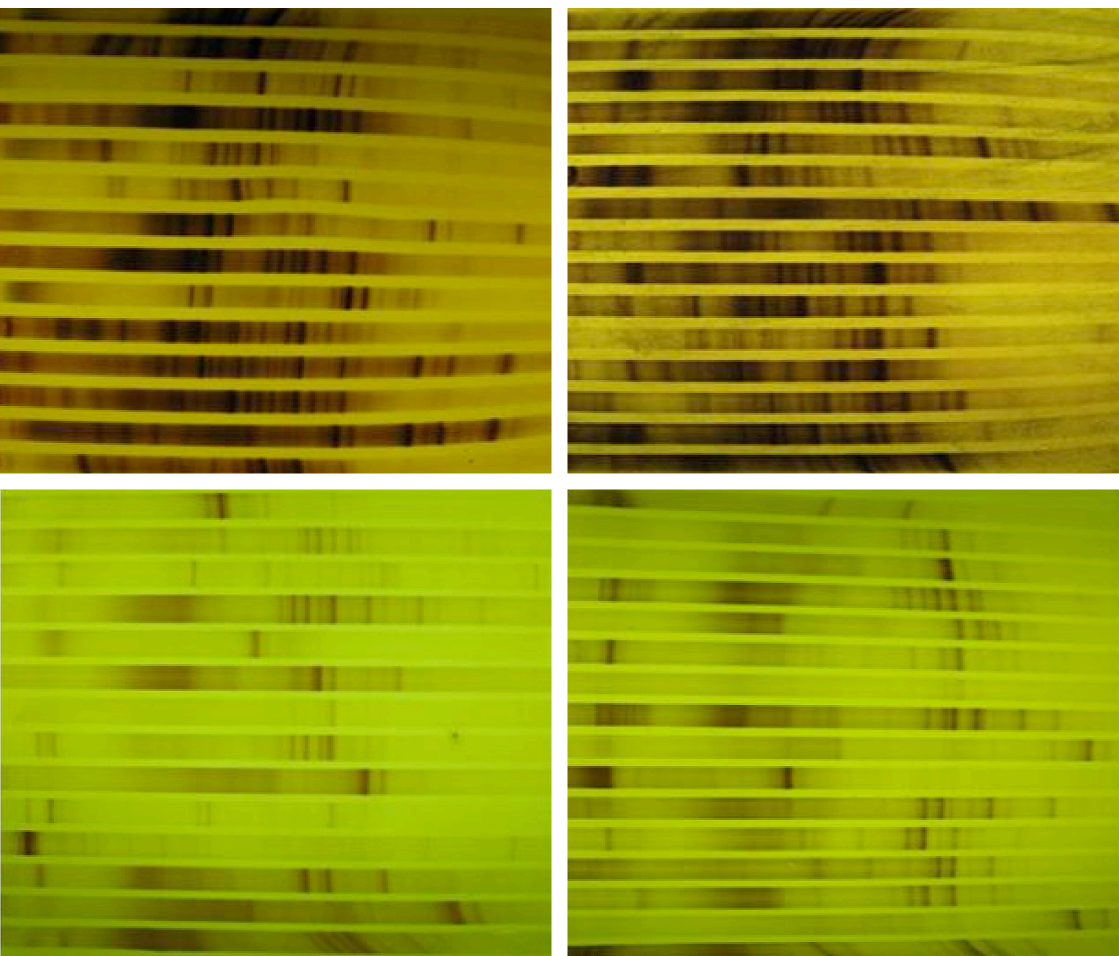


Análise Molecular de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Raízes de Milho



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29

Análise Molecular de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Raízes de Milho

Eliane Aparecida Gomes
Flávia A. S. Oliveira
Ubiraci G. P. Lana
Francisco A. de Souza

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo

Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira

Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Supervisão editorial: Adriana Noce

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Alexandre Esteves Neves

Editoração eletrônica: Alexandre Esteves Neves

Foto da capa: Flávia A. S. Oliveira

1ª edição

1ª impressão (2010): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Análise molecular de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de milho / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

21 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 29).

1. Micorriza arbuscular. 2. Microbiologia do solo 3. Zea mays. 4. Raiz. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 631.422 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	11
Conclusões	17
Agradecimentos	18
Referências	18

Análise Molecular de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Raízes de Milho

Eliane A. Gomes¹

Flávia A. S. Oliveira²

Ubiraci G. P. Lana³

Francisco A. de Souza¹

Resumo

A comunidade nativa de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), presente em amostras de raiz e de solo rizosférico de 15 genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo, foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Foram amplificados fragmentos do DNA ribossomal com primers específicos para as famílias Acaulosporaceae e Glomeraceae. Os primers para a família Glomeraceae foram eficientes em diferenciar a estrutura da população de fungos micorrízicos, indicando grande diversidade da comunidade entre os genótipos. No DGGE específico para Glomeraceae, foram observadas bandas exclusivas nas linhagens eficientes L228-3 e L3, ambas cultivadas sob baixo teor de fósforo, indicando uma associação preferencial entre os genótipos e os simbiontes, que pode resultar em melhor eficiência na aquisição de fósforo. Além disso, a presença de *Glomus clarum* nestas duas linhagens eficientes, cultivadas sob baixo P, indica uma possível relação dessa espécie à tolerância ao estresse de P nesse solo. Com relação à família Acaulosporaceae, a técnica de DGGE detectou pouca variação entre os genótipos cultivados em baixo P, além de menor diversidade de fungos micorrízicos dessa família colonizando as raízes de milho.

Termos para indexação: Fungos micorrízicos arbusculares (FMA), DGGE, fósforo, milho

¹Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, sac@cnpms.embrapa.br

²Estudante de Biologia, Centro Universitário de Sete Lagoas, Minas Gerais, flaviasetelagoas@yahoo.com.br

³Químico, Mestre em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, ubiraci@cnpms.embrapa.br

Análise Molecular de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Raízes de Milho

Abstract

*The native community of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) present in samples of root and rhizosphere soil of 15 maize genotypes contrasting to phosphorus use efficiency was evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Ribosomal DNA fragments were amplified with specific primers for Acaulosporaceae and Glomeraceae families. Primers for the family Glomeraceae were efficient to differentiate the structure of the population of mycorrhizal fungi, indicating great diversity of community among the genotypes. In DGGE Glomeraceae specific, unique bands were observed in efficient lines L228-3 and L3, both grown under low phosphorus, indicating a preferential association between maize genotypes and the symbiont, which can result in better efficiency in the phosphorus acquisition. Moreover, the presence of *Glomus clarum* in these two efficient lines cultivated under low P indicates a possible relationship of this species to P tolerance stress in soil. With regard to the family Acaulosporaceae, the DGGE detected minor variation among genotypes grown in low P, and low diversity of mycorrhizal fungi of this family that colonize maize roots.*

Index terms: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), DGGE, phosphorus, maize

Introdução

Os solos do Cerrado brasileiro geralmente são altamente intemperizados, ácidos e distróficos, expondo as plantas cultivadas nestes ambientes a várias formas de estresses durante seu ciclo de crescimento. Um dos fatores limitantes da expansão agrícola nestes solos é a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade deste nutriente para as plantas (MARSCHNER et al., 2006). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm uma importante função na aquisição e na mobilização de nutrientes do solo, principalmente P, pois formam uma extensa malha de hifas, que se estendem a partir das raízes, permitindo à planta explorar um grande volume de solo, superando limitações impostas pela baixa difusão de fósforo no solo (SMITH; READ, 2008).

O benefício da associação micorrízica depende da diversidade e da identidade dos fungos, do genótipo da planta hospedeira e do teor de P no solo (KLIRONOMOS et al., 2000; COSTA et al., 2005; PIVATO et al., 2007). As plantas de milho, principalmente as cultivadas em solos pouco férteis, utilizam interações micotróficas como recurso para suprir sua demanda por nutrientes (CLARK; ZETO, 1996). Uma melhor compreensão da interação desses fungos com os genótipos de milho poderia representar uma estratégia para uma agricultura sustentável em sistemas com recursos limitados, apresentando grande potencial como insumo biológico para produção agrícola (GOSLING et al., 2006).

Embora o volume de estudos sobre os FMA seja grande e seus efeitos positivos sobre a planta estarem estabelecidos, o conhecimento da biologia e da relação ecológica desses fungos ainda é insuficiente. Além disso, há poucos estudos sobre a interação destes fungos com genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P. As principais limitações nas pesquisas envolvendo fungos micorrízicos são a dificuldade de identificação morfológica e a incapacidade de crescimento desses fungos em meio de cultura por serem biotróficos obrigatórios (SILVA; COLOZZI FILHO, 2007).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular baseadas em análises do DNA possibilitou estudos ecológicos das populações nativas de fungos micorrízicos presentes nas áreas de cultivo. Dentre essas técnicas, análises por DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) e clonagem e sequenciamento de DNA ribossômico (rDNA) estão entre as mais utilizadas para estudar as variações intra e interespecíficas e as relações filogenéticas entre esses fungos (ÖPIK et al., 2003; SOUZA et al., 2004; MA et al., 2005; LIANG et al., 2008, LI et al., 2010). A técnica de DGGE fornece os perfis genéticos de populações por meio da separação de acordo com a sequência das bases dos fragmentos amplificados permitindo uma avaliação espacial e temporal da comunidade de microrganismos no ambiente. A identidade das bandas mais proeminentes pode ser determinada por eluição, purificação e posterior sequenciamento de DNA.

O objetivo do presente trabalho é caracterizar a população de FMA presente em raízes e em solos rizosféricos de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo, cultivados em solo de Cerrado, com alta e baixa disponibilidade deste nutriente pela técnica de DGGE.

Material e Métodos

Genótipos de milho cultivados

Foram utilizados 15 genótipos de milho (*Zea mays*) sendo três linhagens eficientes (L3, L161, L228-3), uma linhagem moderadamente eficiente (L36), três linhagens ineficientes (L22, L53, CATETO), três híbridos eficientes (BRS 1010, L3 x L22, BRS 3060) e cinco híbridos ineficientes (L3 x L53, L36 x CATETO, HS20 x 22, HS5046 x 53, HS26 x 1113-01) no uso de P, previamente selecionados dentro do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Milho e Sorgo. O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados completos, com três repetições, em um latossolo vermelho distrófico, fase cerrado, com baixo (3 mg Kg⁻¹) e alto nível de P (29 mg kg⁻¹),

sem limitação dos demais nutrientes. As raízes e amostras do solo rizosférico de cinco plantas de cada repetição foram coletadas aos 60 dias após o plantio, durante a fase de florescimento, e transportadas até o laboratório. Nesse local, o solo rizosférico foi separado das raízes, em seguida, peneirado para retirar os restos vegetais e armazenado a 4°C. As raízes mais finas foram selecionadas, lavadas, envoltas em papel alumínio, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80° C.

Extração do DNA total das raízes

O DNA total das raízes das plantas de milho foi extraído a partir de 5 g do tecido de uma amostra composta por três repetições, segundo protocolo descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações.

Extração do DNA total de solo rizosférico

O DNA foi extraído a partir de 500 mg de solo rizosférico utilizando o Kit FastDNA SPIN Kit for soil (BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Condições de PCR utilizando primers específicos para FMA

Os fragmentos de rDNA dos fungos micorrízicos foram amplificados por PCR, utilizando-se os *primers* universais para eucariotos NS1 e NS4 (WHITE et al., 1990), seguido de uma segunda reação de *nested*-PCR, com os *primers* NS31 universal (WHITE et al., 1990) e AM1 específico para FMA (HELGASON et al., 1998). Para reação com os *primers* NS1 e NS4 foi utilizado um volume final de 25 μ L, contendo 2 μ L de DNA, 2,5 μ L tampão 10X; 1,25 μ L de MgCl₂ (50 mM); 1,0 μ L de dNTP's (2,5 mM cada); 2,0 μ L de cada *primer* (5 μ M); 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase Invitrogen (5 U/ μ L); 6,25 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) 20% e 7,7 μ L de H₂O. As condições de PCR foram: 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 51°C por 30 seg, 72°C por 2 min, com um passo final de extensão de 72°C por 10 min.

Para a segunda reação, o produto obtido na primeira reação de PCR foi diluído em água ultrapura na razão de 1:100 quando não apresentavam bandas na 1ª PCR, ou na razão de 1:1000 quando as bandas apareciam na primeira reação. Foi utilizado um volume final de 50 μ L con-

tendo 2,0 μ L de DNA (produto da 1ª reação), 5,0 μ L de tampão 10X; 2,5 μ L de MgCl₂ (50 mM); 2,0 μ L de dNTP's (2,5 mM cada); 4,0 μ L de cada *primer* (5 μ M); 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L); 12,5 μ L de DMSO 20% e 17,7 μ L de H₂O. As condições de PCR foram: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min, 72°C por 45 seg; seguidos de extensão final de 72°C por 5 min.

Para a obtenção de produtos de amplificação específicos das famílias de FMA foi também utilizado o sistema de PCR em *nested*, sendo que na primeira reação foram utilizados os *primers* universais NS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e para a segunda reação, os *primers* específicos para família Glomeraceae e Acaulosporaceae, GLOM1310 e ACAU1660, respectivamente (REDECKER, 2000), juntamente com o ITS2 (WHITE et al., 1990). Para o DGGE, um grampo de CG foi anexoado aos *primers* GLOM1310 e ACAU1660. A reação de PCR foram a mesma descrita acima, exceto as condições no termociclador para a segunda reação, que foram as seguintes: 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 20 seg, 55°C por 35 seg, 72°C por 1 min; seguidos de extensão de 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (1 μ g mL⁻¹) e as imagens visualizadas e capturadas em um fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) sob luz UV.

Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE)

As análises por DGGE foram realizadas em DCODETM (Universal Mutation Detection System) BIORAD (Richmond, EUA), utilizando-se géis de poliácridamida 6%, com gradiente desnaturante (uréia e formamida deionizada) de 30-45% para o par de *primers* NS31/AM1, de 25-35% para GLOM 1310/IT2 e de 35-60% para ACAU1660/IT2. Foram aplicados 40 μ L de cada amostra de DNA e os fragmentos foram separados por eletroforese a 70 volts por 16 horas com tampão de corrida TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 60° C. Os géis foram corados com nitrato de prata segundo Creste et al. (2001), fotografados, e as bandas mais informativas foram eluídas do gel e purificadas.

Eluição e purificação das bandas de DGGE

Foi utilizado o método "Crush and Soak" (SAMBROOK et al., 1989) para o isolamento dos fragmentos de DNA do gel de poli-acrilamida. Os fragmentos do gel contendo as bandas de interesse foram cortados com o uso de um estilete e em seguida transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 100 μ L de tampão de eluição (0,5 M acetato de amônio; 10 mM acetato de magnésio; 1 mM EDTA, pH 8,0 e 0,1% SDS) e com o auxílio de um pistilo o gel foi esmagado. Em seguida, os microtubos foram incubados a 37°C por aproximadamente 3 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 15 min e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após transferência, 0,5 volumes de tampão de eluição foram adicionados aos tubos contendo os fragmentos e novamente centrifugados por 2 min a 16.000 x g. O sobrenadante foi retirado e misturado ao que foi coletado anteriormente, transferido para um filtro Millipore e centrifugado por 1 min. O filtrado foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionados 250 μ L de etanol 95% e mantido a -20° C por 30 min. Os microtubos foram centrifugados por 15 min a 13.800 x g e o precipitado lavado com 100 μ L de etanol 70%. Em seguida o DNA foi seco e ressuspenso em 10 μ L de água ultrapura.

Sequenciamento dos fragmentos purificados do gel de DGGE

O DNA purificado foi utilizado como molde para uma reação de PCR nas mesmas condições descritas acima. Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% (m/v), corado com brometo de etídeo (1 μ g mL⁻¹). Em seguida as bandas foram cortadas e purificadas usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante e sequenciadas utilizando o Kit "Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing" (Applied Biosystems, Foster City, CA), em um sequenciador de DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Análise dos dados

Os padrões de bandas obtidos do DGGE foram comparados através do programa Statistica 6.0 utilizando UPGMA ("Unweighted Pair Group With Mathematical Averages").

Os dados das sequências de nucleotídeos foram comparados com as informações disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa BlastN (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

PCR

A amplificação do DNA dos fungos micorrízicos presentes nas raízes e no solo rizosférico dos genótipos de milho utilizando os pares de *primers* NS31/AM1, GLOM1310/ITS2 e ACAU1660/ITS2 resultaram em fragmentos de 580, 600 e 445 pares de bases, respectivamente.

DGGE específico de FMA das raízes de milho

A análise por DGGE dos fragmentos amplificados com os *primers* NS31/AM1 das raízes de 15 genótipos de milho cultivados sob baixo P resultou em padrões de bandas muito semelhantes, demonstrando que este par de *primers* não foi eficiente para diferenciar as populações de FMA entre os genótipos de milho (dados não mostrados).

DGGE da família Glomeraceae

Raiz

O DGGE dos fragmentos amplificados com os *primers* GLOM1310 e ITS2 das raízes de sete linhagens e oito híbridos cultivados sob baixo e alto teor de P no solo resultou em várias bandas em todas as amostras, indicando grande diversidade da população micorrízica (Figura 1). Foi analisado um total de 33 bandas no gel contendo as linhagens e 36 bandas no gel contendo híbridos. Bandas exclusivas foram encontradas nos genótipos eficientes L228-3 e L3 (Figura 1-I), ambos cultivados em baixo teor de P, porém, somente a banda correspondente a *Glomus clarum* foi identificada por sequenciamento (banda 5, Figura 1-I). Essas bandas podem estar relacionadas a uma associação preferencial entre espécies de FMA e esses genótipos. Diversos trabalhos têm demonstrado que, apesar da ausência de especificidade hospedeira, há uma variação nas espécies de FMA que colonizam a planta e os seus bene-

fícios ao hospedeiro em função do genótipo da planta (KLIRONOMOS et al., 2000; JANSA et al., 2005; PIVATO et al., 2007). A variação da comunidade fúngica pode ser atribuída à composição da exsudação radicular dos genótipos de milho sob deficiência de P (MARSCHNER, 1998). O genótipo ineficiente L22 (Figura 1-I), também cultivado em baixo P, apresentou uma banda exclusiva, podendo estar relacionado com o estresse de P no solo.

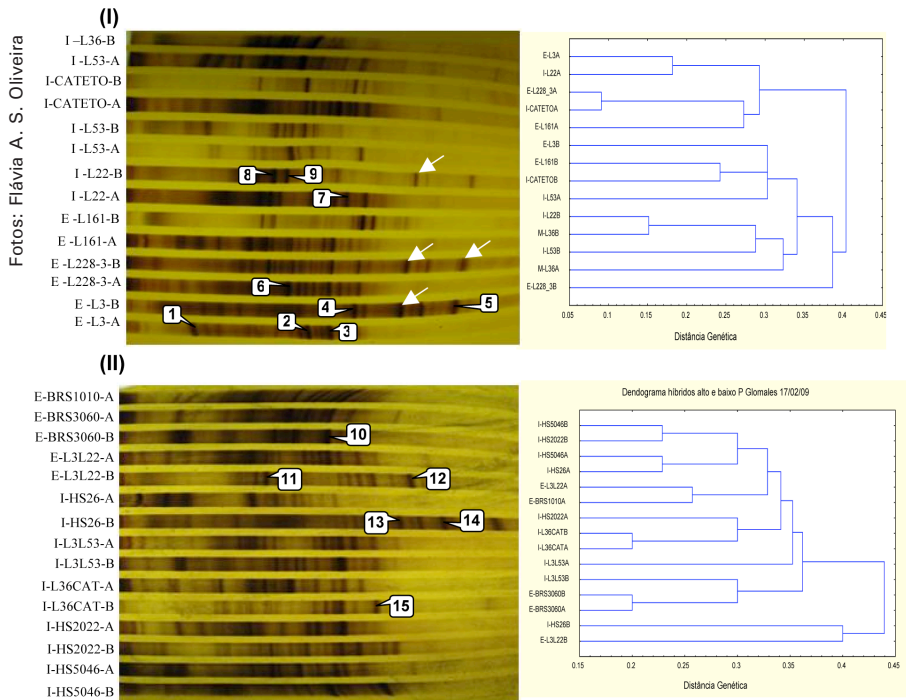


Figura 1. DGGE dos fragmentos amplificados com os primers GLOM1310/ITS2, específicos para a família Glomeraceae de FMA, utilizando DNA extraído de raízes. O dendrograma mostra o agrupamento das linhagens (I) e dos híbridos (II) eficientes-E e ineficientes-I no uso de fósforo, cultivados sob baixo-B e alto-A teor de P. As setas indicam as bandas exclusivas e os números, as bandas que foram eluídas e sequenciadas.

Os perfis das bandas no gel de DGGE foram usados para construção de dendrogramas de linhagens (Figura 1-I) e híbridos (Figura 1-II). O dendrograma das linhagens indicou que, a uma distância de 0,4%, houve um agrupamento de quase todas as linhagens cultivadas em

alto P e o agrupamento de todas as linhagens cultivadas em baixo P (Figura 1-I). Somente as linhagens L53 e L36, sob alto P, foram agrupadas junto com as linhagens cultivadas em baixo P. Pode-se considerar que, no caso das linhagens, o agrupamento da população de fungos micorrízicos foi influenciado pela disponibilidade de P no solo, enquanto a eficiência no uso de P não foi o fator determinante do agrupamento. Quanto aos híbridos, não foi detectado nenhum fator determinante do agrupamento, uma vez que os grupos apresentaram genótipos tanto eficientes quanto ineficientes, cultivados sob alto e baixo P. Em 0,31% de distância genética foi observada uma tendência dos híbridos de se agruparem quanto à eficiência no uso de P, porém não de forma conclusiva.

A análise das sequências de DNA confirma a especificidade dos *primers* para a família Glomeraceae, uma vez que todas as espécies identificadas pertencem a esta família (Tabela 1). Uma mesma amostra apresentou bandas diferentes, pertencentes a uma mesma espécie, indicando a ocorrência de uma variação intraespecífica.

As bandas 4 e 5 (Tabela 1, Figura 1-I) da linhagem eficiente L3 cultivada em baixo fósforo e as bandas 13 e 14 (Figura 1-II) do híbrido ineficiente HS26 X 1113-01, também cultivado em baixo P foram identificadas como pertencentes à espécie *G. clarum* (Tabela 1). Estes dados sugerem que as diferentes bandas produzidas por *G. clarum* ocorreram devido a variações entre as cópias do rDNA. Essa heterogeneidade parece ser comum entre os FMA, pelo fato de núcleos geneticamente diferentes poderem coexistir dentro de cada esporo. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2009) em amostras de rizosfera de milho, onde três bandas diferentes em uma mesma amostra foram identificadas como *G. coremioides*. Estudos realizados por Kowalchuk et al. (2002) com o gênero *Glomus* e por de Souza et al. (2004) com espécies do gênero *Gigaspora*, também relataram variações intraespecíficas.

Das 15 bandas sequenciadas, somente a banda 6 (Figura 1-I), pertencente à linhagem eficiente L228-3 cultivada em baixo P, identificou

G. intraradices (Tabela 1). Apesar do número de sequências identificadas não ser representativo da comunidade de fungos presente nos genótipos, a espécie *G. clarum* apareceu somente nos genótipos de milho cultivados sob baixo P, podendo estar relacionada à tolerância ao estresse de P nesse solo.

Tabela 1. Espécies de FMA presentes em raízes e solo rizosférico de genótipos de milho identificadas no gel de DGGE

Identificação das bandas	Número de acesso no Genbank	Família	Microrganismos (% similaridade)	E- value
1	AM384926	Glomeraceae	Glomus (96%)	2e-145
2	AM992840	Glomeraceae	Glomus (99%)	0.0
3	AM992840	Glomeraceae	Glomus (100%)	0.0
4	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (98%)	1e-167
5	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (99%)	4e-177
6	AM980857	Glomeraceae	<i>G. intraradices</i> (99%)	4e-172
7	AM992840	Glomeraceae	Glomus (91%)	3e-114
8	AM942491	Glomeraceae	Glomus (100%)	4e-177
9	AM942491	Glomeraceae	Glomus (97%)	4e-163
10	AY744275	Glomeraceae	Glomus (100%)	2e-176
11	AM942491	Glomeraceae	Glomus (99%)	3e-174
12	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (99%)	9e-169
13	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (100%)	7e-175
14	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (100%)	2e-171
15	AM992840	Glomeraceae	Glomus (100%)	4e-172
16	AM992820	Glomeraceae	Glomus (97%)	0.0
17	FN423697	Glomeraceae	<i>G. clarum</i> (96%)	0.0
18	X96826	Glomeraceae	<i>G. mosseae</i> (96%)	0.0
19	AM992819	Glomeraceae	Glomus (93%)	0.0

Rizosfera

O DGGE específico para família Glomeraceae da rizosfera dos genótipos de milho com baixa e alta disponibilidade de P apresentou diferencia-

ção no padrão de bandas, porém com um número de bandas menor em relação ao DGGE das raízes (Figura 2). Esse resultado pode ser atribuído à qualidade do DNA, uma vez que a extração de DNA microbiano de amostras ambientais como o solo pode apresentar algumas dificuldades, pois podem existir compostos inibidores que comprometem a eficiência da PCR.

No DGGE das linhagens, foi obtido um total de 32 bandas, sendo que uma delas foi específica nas linhagens L22 e CATETO (Figura 2-I), ambas ineficientes e sob condições de alto teor de P. Não foi possível o sequenciamento dessas bandas, o que dificulta um melhor entendimento. Porém, não deve ser descartada uma possível associação entre os fungos e esses genótipos.

No DGGE dos híbridos, foram analisadas 27 bandas, sendo várias exclusivas de determinados genótipos. No dendrograma das linhagens, o agrupamento dos genótipos não foi influenciado nem pela disponibilidade, nem pela eficiência no uso de P, uma vez que os grupos apresentaram tanto genótipos eficientes, quanto ineficientes sob condições de alto e baixo teor de P (Figura 2-I). O agrupamento dos híbridos deixa

claro que a disponibilidade de P não foi o fator determinante para sua formação. Em 0,27% de distância genética, houve um agrupamento de quase todos os genótipos ineficientes no uso de P, indicando que a eficiência dos genótipos no uso de P pode ter influenciado a formação dos grupos (Figura 2-II).

No solo rizosférico, das bandas retiradas dos géis, somente 5 fragmentos foram identificados, sendo um deles correspondente a *G. mosseae* (banda 18, Tabela1), presente na linhagem ineficiente L53 (Figura 2-I) sob alto P.

Para compreender melhor esses resultados, novas análises de DGGE devem ser feitas utilizando novos pares de *primers*, porém, com uma nova estratégia capaz de recuperar uma maior quantidade de bandas

dos géis para identificação das espécies. Além disso, a visualização da colonização micorrízica por microscopia como uma técnica complementar pode ajudar no estudo das diferenças da população dos FMA.

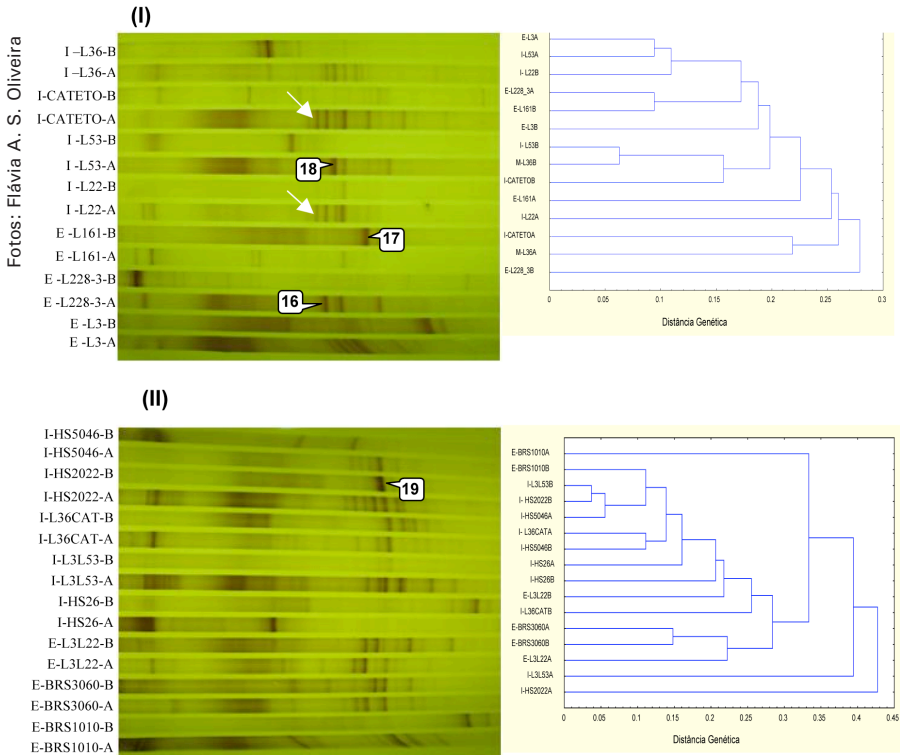


Figura 2. DGGE dos fragmentos amplificados com os primers GLOM/ITS2, específicos para família Glomeraceae de FMA utilizando DNA extraído do solo rizosférico. O dendrograma mostra o agrupamento das linhagens (I) e dos híbridos (II) eficientes-E e ineficientes-I no uso de fósforo, cultivados sob baixo-B e alto-A teor de P. As setas indicam as bandas exclusivas.

DGGE da família Acaulosporaceae

Raiz

O padrão de bandas do DGGE específico para raízes de Acaulosporaceae apresentou uma menor diversidade de fungos micorrízicos (Figura 3) em comparação com Glomeraceae. O padrão de bandas mais distinto foi observado no híbrido L3 X L22, eficiente no uso de fósforo, indi-

cando diferenças na população deste híbrido em relação aos demais genótipos.

Foram analisadas 18 bandas, sendo apenas duas monomórficas, ou seja, todos os genótipos apresentaram este fragmento (Figura 3), sendo observada uma banda exclusiva nos híbridos BRS1010 e L3 X L22 (Figura 3). O dendrograma baseado no padrão de bandas gerado foi gerado, porém ele mostra somente uma pequena tendência ao agrupamento ter sido influenciado pela eficiência no uso de P (Figura 3).

Não foi avaliado o perfil de DGGE do solo rizosférico da família Acaulosporaceae porque não foi obtido um gel com qualidade suficiente para análise.

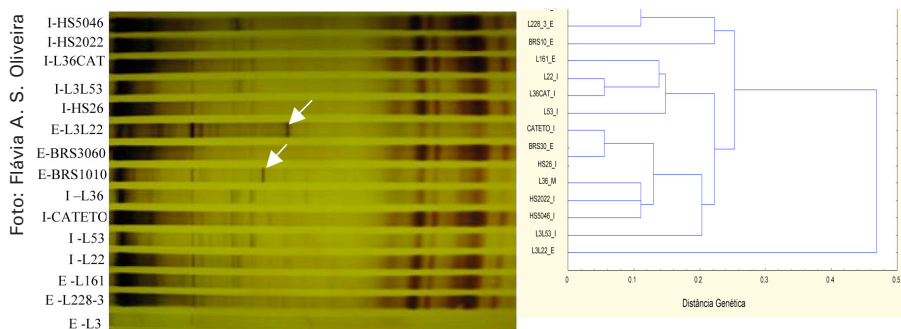


Figura 3. DGGE dos fragmentos amplificados com os primers ACAU1660/ITS2, específicos para família Acaulosporaceae de FMA utilizando DNA extraído de raízes. O dendrograma mostra o agrupamento das linhagens e dos híbridos eficientes-E e ineficientes-I no uso de fósforo, cultivados sob baixo teor de P. As setas indicam as bandas exclusivas.

Conclusões

A técnica PCR-DGGE foi eficiente no estudo da estrutura das comunidades de fungos micorrízicos que colonizam as raízes e a rizosfera de milho utilizando *primers* para família Glomeraceae.

A técnica PCR-DGGE específico para Acaulosporaceae das raízes de milho cultivadas em baixo P apresentou pouca variação entre os genótipos, além de menor diversidade de fungos micorrízicos dessa família.

Fragmentos presentes nas raízes das linhagens eficientes L228-3 e L3, cultivadas em baixo P, no DGGE específico para Glomeraceae, podem estar relacionados com a eficiência destes genótipos.

A presença de *G. clarum* nas raízes de genótipos cultivados sob baixo P no DGGE específico para Glomeraceae indica uma possível relação dessa espécie com a tolerância ao estresse de P nesse solo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Embrapa Milho e Sorgo e Fundação McKnight.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- CLARK, R. B.; ZETO, S. K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 10/11, p. 1505-1511, 1996.
- COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F.; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

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

HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 384, p. 431, 1998.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; FROSSARD, E. Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. **Plant and Soil**, The Hague, v. 276, p. 163-176, 2005.

KLIRONOMOS, J. N.; MCCUNE, J.; HART, M.; NEVILLES, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 137-141, 2000.

KOWALCHUK, G. A.; SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 571-581, 2002.

LI, L.-F.; LI, T.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z.-W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 71, p. 418-427, 2010.

LIANG, Z.; DRIJBER, R. A.; LEE, D. J.; DWIEKAT, I. M.; HARRIS, S. D.; WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 956-966, 2008.

MA, W. K.; SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37. p. 1589-1597, 2005.

MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular micorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 56, p. 203-207, 1998.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceas genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.

OLIVEIRA, C. A.; SÁ, N. M. H.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; SCOTTI, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C. Assessment of the mycorrhizal community the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 249-258, 2009.

ÖPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; KÕLJALG, U.; ZOBEL, M.; SEN, R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. **New Phytologist**, Oxford, v. 160, p. 581-593, 2003.

PIVATO, B.; MAZURIER, S.; LEMANCEAU, P.; SIBLOT, S.; BERTA, G.; MOUGEL, C.; VAN TUINEN, D. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 197-210, 2007.

REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, p. 73-80, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 89, p. 1477-1481, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SILVA, M. M.; COLOZZI-FILHO, A. Emprego de técnicas moleculares na taxonomia e em estudos sobre ecologia e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. cap. 8, p. 127-152.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3. ed. New York: Academic Press, 2008. 787 p.

SOUZA, F. A. de; KOWALCHUK, G.; LEEFLANG, P.; VAN VEEN, J. A.; SMIT, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1413-1424, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

Embrapa

Milho e Sorgo

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

