

Análise da Comunidade de Fungos Micorrízicos Associada a Genótipos de Milho Contrastantes para Eficiência no Uso de Fósforo

Eliane A. Gomes¹, Ubiraci G. P. Lana¹, Flávia A. S. Oliveira², Carlos F. S. Tinoco³, Christiane A. Oliveira² e Ivanildo E. Marriel¹

¹ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG 35701-970.

² Centro Universitário UNIFEMM, Sete Lagoas, MG.

³ Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas, MG.

Palavras-chave: fósforo, fungos micorrízicos, genótipos contrastantes, milho

Os solos do Cerrado brasileiro geralmente são altamente intemperizados, ácidos e pouco férteis, sendo as plantas cultivadas nestes ambientes expostas a várias formas de estresses durante seu ciclo de crescimento. Um dos fatores limitantes da expansão agrícola no Cerrado é a toxidez de alumínio e a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade de P para as plantas (Marschner et al., 2006). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm uma importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente P, pois estes fungos 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 inorgânico no solo (Schachtman et al., 1998).

As plantas de milho têm uma alta taxa de crescimento e uma alta demanda por nutrientes, apresentando, freqüentemente, interações com fungos micorrízicos (Clark e Zeto, 1996). No entanto, existe pouca informação sobre os efeitos de genótipos de milho eficientes na absorção de P na dinâmica do desenvolvimento de FMA. O reconhecimento, identificação e quantificação dos FMAs envolvidos na associação com plantas de milho eficientes no uso de P é uma etapa difícil porque esses fungos não crescem em meio de cultura, requerendo vários meses de crescimento em cultura-armadilha, junto com as plantas, sob condições de casa-de-vegetação. Estas diferem das condições do campo e podem interferir com a sobrevivência do fungo (Simon et al., 1992). Como resultado, a distribuição da população no campo pode ser interpretada erroneamente.

O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises do DNA favoreceu os estudos ecológicos das populações nativas de fungos micorrízicos presentes nas áreas de cultivo. Dentre estas técnicas, análises por clonagem e seqüenciamento de rDNA (DNA ribossômico) e DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) estão entre as mais utilizadas atualmente para se estudar as variações intra e interespecíficas e as relações filogenéticas entre FMA (Kowalchuk et al., 2002; Opik et al., 2003; de Souza et al., 2004; Ma et al., 2005). Estas são duas técnicas complementares que analisam fragmentos de PCR do rDNA amplificados por “primers” seletivos para FMA. A técnica de DGGE fornece os perfis genéticos de populações e o padrão de diferentes amostras pode ser comparado no mesmo gel, aumentando o potencial para a amostragem temporal e espacial. A identidade de determinadas bandas, mais proeminentes, pode ser determinada por purificação e posterior seqüenciamento de DNA.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a população de fungos micorrízicos nativa presente nas raízes de genótipos de milho, contrastantes quanto à eficiência na absorção de fósforo, cultivados em solos com baixa e alta disponibilidade deste nutriente.

Material e Métodos

Foram utilizados quinze genótipos de milho (*Zea mays*) eficientes, moderadamente eficientes e ineficientes no uso de P (Tabela 1), previamente selecionados dentro do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados completos, com três repetições, em um latossolo vermelho-escuro, com baixo (3 mg kg⁻¹) e alto nível de P (29 mg kg⁻¹), sem limitação dos demais nutrientes. Amostras do ápice das raízes dos genótipos de milho foram coletadas aos 60 dias após o plantio, durante a fase de florescimento.

Tabela 1. Genótipos cultivados e respectivas eficiências no uso de P

Linhagens eficientes	Linhagens ineficientes	Linhagem média	Híbridos eficientes	Híbridos ineficientes
L3	L22	L36	BRS 1010	L3 x L53
L228-3	L53		BRS 3060	L36 x CATETO
L161	CATETO		L3 x L22	HS20 x 22
				HS5046 x 53
				HS26 x 1113-01

DNA total foi extraído das raízes, utilizando-se o protocolo descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações. Os fragmentos de rDNA (DNA ribossômico) dos fungos micorrízicos foram amplificados por uma reação de PCR, utilizando-se os “primers” universais NS5 e ITS4 (White et al., 1990), seguido de uma segunda reação de “nested” PCR, com o “primer” específico para a família Glomaceae de fungos micorrízicos, GLOM1310 (Redecker, 2000) juntamente com ITS2 (White et al., 1990).

Para a análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE), uma seqüência CG-grampo foi adicionada ao “primer” GLOM1310. Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 6% contendo um gradiente de 25% a 35% de agentes desnaturantes (uréia e formamida deionizada) e submetidos à eletroforese em uma unidade de DGGE da Bio-Rad (Richmond, EUA) a 70 V por 16 horas a 60°C. Após a corrida, os géis foram corados com prata e os padrões de bandas obtidos comparados através do programa Statistica 6.0 utilizando UPGMA (“Unweighted Pair Group with Mathematical Averages”).

Resultados e Discussão

A amplificação de fragmentos de DNA dos fungos micorrízicos presentes nas raízes dos genótipos contrastantes resultou em fragmentos de 1.450 pares de bases (pb) utilizando os pares de “primers” NS5 e ITS4 e em fragmentos de 600 pb com os “primers” GLOM1310 e ITS2 para todos os genótipos analisados (Figura 1).

A análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos fragmentos amplificados com os “primers” GLOM1310 e ITS2 das raízes de quinze genótipos cultivados em baixo fósforo e treze cultivados em alto P indicou um elevado nível de polimorfismo entre as populações dos fungos micorrízicos (Figura 2). Sob baixo P, foram analisadas 15 bandas, todas

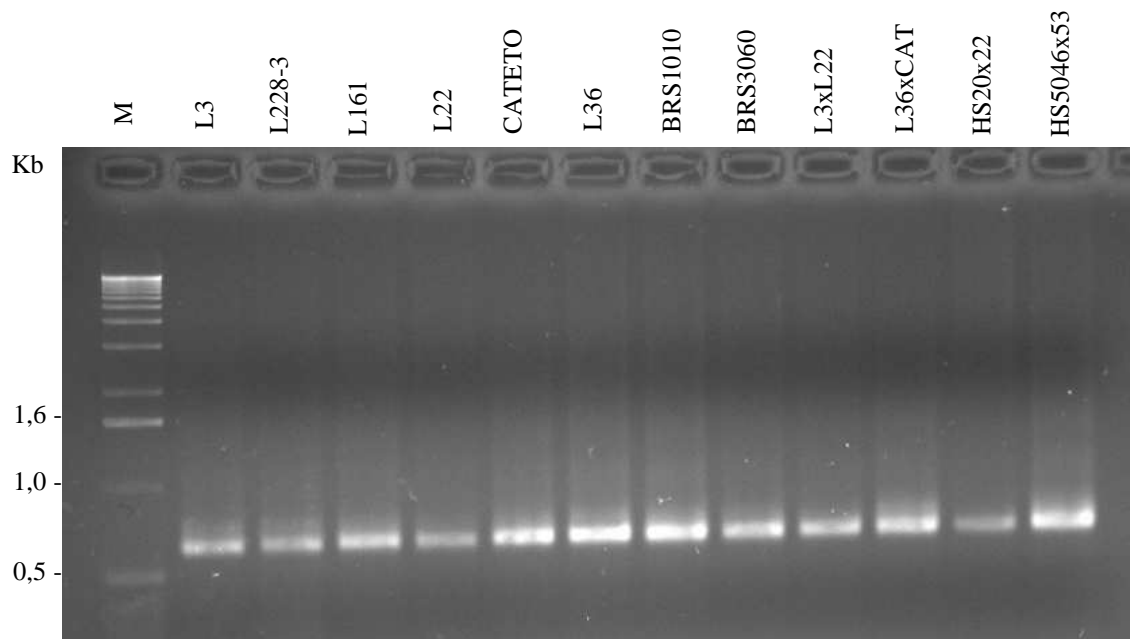


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados com os “primers” GLOM1310 e ITS2 de raízes genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P. M. 1 Kb ladder.

polimórficas, enquanto que, sob alto P, foi obtido um total de 17 fragmentos, sendo apenas um monomórfico, ou seja, todos os genótipos apresentaram este fragmento (Figura 2). O padrão mais distinto de bandas foi observado na linhagem L161, sob alto P, indicando que a população de FMA, da família Glomaceae, que infectam a raiz desta linhagem, eficiente no uso de P, é diferente da população que infecta os demais genótipos. As bandas de DGGE mais proeminentes foram purificadas do gel e, posteriormente, serão seqüenciadas para determinação da identificação taxonômica dos fungos.

Os perfis de bandas no gel de DGGE foram usados para a construção de dendrogramas, onde a eficiência no uso de P não foi o fator determinante no agrupamento dos genótipos (Figura 2), uma vez que os grupos formados apresentaram tanto genótipos eficientes quanto ineficientes, independente do valor de distância genética. A distância genética, sob baixo P, variou de 0% (L36xCATETO e HS26x1113) a 73% (L3xL53 e L53), enquanto que sob alto P, variou de 6% (L53 e HS5046x53) a 59% (L161 e L36xCATETO) (dados não mostrados).

Concluindo, pode-se observar que a eficiência no uso de P não foi o principal fator de agrupamento dos genótipos, apesar da existência de polimorfismo entre eles. Como o agrupamento dos genótipos cultivados, sob alto P, foi diferente do agrupamento observado sob baixo P (Figura 2), pode-se concluir que a população de fungos micorrízicos da família Glomaceae que infectam as raízes foi mais afetada pelo teor de P no solo do que pelos genótipos de milho cultivados (P eficiente e P ineficiente). Estes são dados preliminares, onde somente a família Glomaceae foi estudada. Novas análises de DGGE, utilizando “primers” gerais para FMA e/ou específicos para as famílias Acaulosporaceae e Gigasporaceae, serão feitas para representar as diferenças entre as populações de FMA e correlacionar com os dados quantitativos de produção e de eficiência dos genótipos.

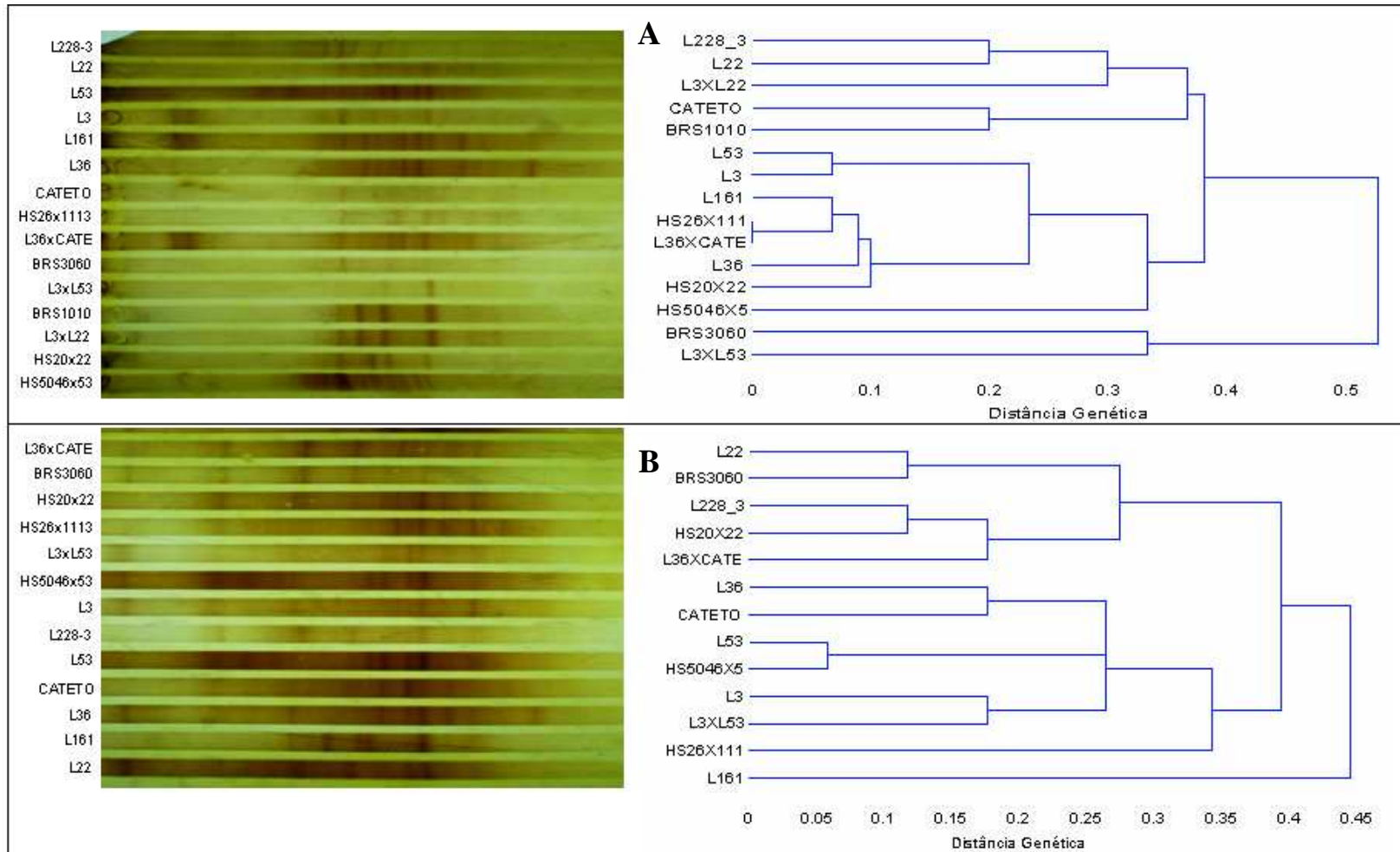


Figura 2. Gel de DGGE dos fragmentos amplificados com “primers” específicos para a família Glomaceae de fungos micorrízicos utilizando DNA extraído de raízes de genótipos de milho contrastantes na eficiência no uso de P, cultivados sob baixo (A) e alto (B) teor de P no solo e dendrograma mostrando o agrupamento entre os genótipos.

Referências bibliográficas

- CLARK, R.B.; ZETO, S.K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.1505-1511, 1996.
- KOWALCHUK, G.A.; de SOUZA, F.A.; van VEEN, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v.11, p.571-581, 2002.
- 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**, v.37, p.589-1597, 2005.
- ÖPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; KOLJALG, U.; ZOBEL, M.; SEM, R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. **New Phytologist**, v.160, p.581-593, 2003.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, 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 U.S.A.**, Washington, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.
- SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. **Plant Physiology**, v.116, p. 447-453, 1998.
- SIMON L., LALONDE M., BRUNS T.D. Specific Amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.2908-2915, 1992.
- de SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; van VEEN, J.A.; SMIT, E. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiling of the 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**, v.70, 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. (Eds). PCR protocols: a guide to methods and applications Academic Press, San Diego, Calif, pp 315-322, 1990