



***Revisões em Micorriza I: Técnicas Moleculares
Aplicadas ao Estudo dos Fungos Micorrízicos
Arbusculares***



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 68

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

***Revisões em Micorriza I: Técnicas Moleculares
Aplicadas ao Estudo dos Fungos Micorrízicos
Arbusculares***

*Joana Falcão Salles
Francisco Adriano de Souza*

*Seropédica - RJ
1998*

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Agrobiologia

Caixa Postal 74505

23851-970 - Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Norma Gouvêa Runjanek

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix
e/ou Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

SALLES, J.F.; SOUZA, F.A. de Revisões em micorriza I: técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 24p. (Embrapa-CNPAB. Série Documentos, 68).

ISSN 0104-6187

1. Fungo. 2. Micorriza VAM. I. Souza, F.A. de, colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 579.5

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. CARACTERIZAÇÃO DE ESPOROS DE FMA.....	5
3. EXTRAÇÃO DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE FMA.....	6
4. TÉCNICAS MOLECULARES EMPREGADAS NO ESTUDO DE FMA7	
4.1. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FMA	7
4.2. FILOGENIA.....	17
5. PROTOCOLOS	18
5.1. EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE ESPOROS DE FMA	18
5.1.1. A partir de um esporo (Lloyd-Macglip et al., 1996).....	18
5.1.2. De 10 a 20 esporos	18
5.1.3. A partir de 50 esporos (Lloyd-Macglip et al., 1996).....	19
5.1.4. A partir de micélio (Longato e Bonfante, 1997)	19
5.2. EXTRAÇÃO DE DNA DE RAÍZES COLONIZADAS POR FMA (ABBAS ET AL., 1996).....	20
6. CONCLUSÕES	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

Revisões em Micorriza I: Técnicas Moleculares Aplicadas ao Estudo dos Fungos Micorrízicos Arbusculares

Joana Falcão Salles¹
Francisco Adriano de Souza²

1. Introdução

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem a ordem *Glomales* (*Zygomycetes*) e se distinguem de outros fungos micorrízicos pela formação de arbúsculos quando em associação com raízes de plantas. A importância destes fungos para a sustentabilidade de sistemas agrícolas e naturais pode ser compreendida por sua ampla ocorrência em ecossistemas naturais terrestres, pela capacidade de formar associação com pelo menos 80% das famílias de plantas fanerogâmicas, e pelos benefícios que conferem a estas (Trappe, 1987). Neste sentido, plantas micorrizadas apresentam maior capacidade de absorção de nutrientes, especialmente fósforo, e maior resistência à estresses bióticos e abióticos (Souza & Silva, 1996). Tais fatos tornam esta simbiose uma das mais importantes entre microrganismos e plantas (Smith & Read, 1997).

A impossibilidade de crescimento desses fungos em meios sintéticos na ausência de raízes metabolicamente ativas e a não caracterização da fase sexuada dos FMA em seu ciclo de vida, faz com que a identificação e classificação destes fungos esteja baseada, quase que exclusivamente, na morfologia e estrutura de seus esporos vegetativos (Morton & Benny, 1990). Entretanto, a caracterização fenotípica pode ser influenciada por condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento dos esporos, introduzindo problemas para a identificação precisa de populações de FMA oriundas do campo, bem como para o acompanhamento de espécies introduzidas. Além disso, é extremamente difícil distinguir as diferentes espécies de FMA durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares.

¹ Bolsista PADCT/Embrapa Agrobiologia.

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970, Seropédica-RJ.

É urgente o desenvolvimento de ferramentas para a detecção e identificação de FMA durante todos os estádios de seu ciclo de vida. Sem esta perfeita caracterização, torna-se difícil a otimização desta simbiose em campo, pois estudos básicos ligados à competição, sobrevivência, dispersão, e eficiência ficam comprometidos quando executados em comunidades complexas como as encontradas em solos tropicais. Atualmente, a evolução dos métodos baseados nas moléculas de DNA e RNA tornou possível o estudo da ecologia de organismos não culturáveis, permitindo uma melhor avaliação da diversidade de organismos do solo como um todo. Este trabalho tem por objetivo revisar de forma sucinta os principais métodos moleculares empregados atualmente no estudo dos FMAs e apresentar alguns protocolos de execução destes métodos.

2. Caracterização de esporos de FMA

Os FMAs produzem esporos multinucleados e o número de núcleos varia com a espécie (tamanho do esporo). De acordo com Burggraaf & Beringer (1989), o número de núcleos por esporo de *Gigaspora margarita*, *Gi. decipiens* e *Glomus caledonium* foi estimado em 20000, 35000 e 9000, respectivamente.

Os esporos de FMA são aparentemente formados de maneira assexuada, e por esta razão deveria-se encontrar uma baixa variabilidade genética entre estas estruturas. Entretanto, vários trabalhos têm mostrado que os esporos possuem grande diversidade genética, e que esta variabilidade ocorre até mesmo entre núcleos de um mesmo esporo (Sanders et al., 1996). A diversidade tem sido detectada mesmo em regiões bem conservadas, como a que codifica para a subunidade menor do gene do RNA ribossomal, que por serem homogêneas e estarem presentes em cópias múltiplas, vêm sendo utilizadas para estudos de filogenia em diversas espécies. Lloyd-MacGilpp et al. (1996) seqüenciaram a região compreendida entre os primers ITS1 e ITS4, que abrange o 5.8S rDNA, de esporos de diversos isolados de *G. mossae* (Figura 2). A análise destes fragmentos revelou que, em alguns casos, seqüências provenientes de diferentes esporos são mais similares que aquelas obtidas a partir de um único esporo, e que a variabilidade nas regiões ITS1/ITS2 foi maior que a observada na região 5.8S rDNA.

Alguns resultados obtidos recentemente comprovam o caráter heterocariótico da população de núcleos dentro de um mesmo esporo. Hijri et al. (1998) demonstraram que a região ITS de *Scutellospora castanea* (BEG1) apresenta variação tanto inter como intranuclear, o que foi avaliado a partir de núcleos individualizados provenientes de um único esporo. Já a análise de PCR, utilizando o minisatélite M13 como primer, revelou diferenças no padrão de bandas obtidas a partir de culturas monospóricas de *Gi. margarita* (Zézé et al., 1997), o que pode ser explicado pelo caráter heterocariótico da população de núcleos de um mesmo esporo. Este caráter heterocariótico dos esporos de FMA pode dificultar a compreensão dos resultados obtidos a partir de técnicas moleculares.

Ainda existem dúvidas de como um organismo aparentemente assexuado pode apresentar uma diversidade genética tão elevada. Especula-se que a troca de núcleos ocorreria através da fusão de diferentes hifas, gerando uma população de núcleos geneticamente diferentes em um mesmo esporo. Sejalon-Delmas et al. (1998) demonstraram a fusão de hifas em esporos de *Gi. margarita* e *Gi. gigantea*. Para esporos provenientes de culturas monospóricas, a taxa de fusão foi de 80%, enquanto que para culturas oriundas de diferentes esporos, a taxa foi de 10%. Estes resultados sugerem que a fusão intra-específica de hifas em FMA é estritamente controlada a nível genético, e que este mecanismo pode estar envolvido na formação de esporos heterocarióticos (Sejalon-Delmas et al., 1998).

3. Extração DNA a partir de amostras de FMA

A extração de DNA é uma etapa fundamental para a aplicação de métodos moleculares e para tal, a origem do material é de primordial importância. No caso de FMA, os esporos são a única fonte de material taxonomicamente confiável para a caracterização inicial, além de possuírem uma grande quantidade de DNA. Segundo Bianciotto & Bonfante (1992), a quantidade estimada de DNA por núcleo é de 0,74-0,77 μg para *Gi. margarita* e de 0,25-0,27 μg para *G. versiforme*. Desta forma, um esporo de *Gi. margarita* contém cerca de 2,8 ηg de DNA, enquanto que um esporo de *G. versiforme* possui 0,6 ηg de DNA, quantidade suficiente para realizar, respectivamente, 120 e 30 reações de PCR.

4. Técnicas moleculares empregadas no estudo de FMA

Atualmente diversas técnicas moleculares vem sendo empregadas no estudo de FMAs, visando um maior conhecimento de aspectos filogenéticos, citogenéticos, funcionais e ecológicos, entre outros, e a escolha de uma ou de um conjunto de técnicas é função do objetivo da pesquisa. A seguir serão comentados alguns métodos empregados para cada estudo específico.

4.1. Detecção e identificação de FMA

Os FMAs, como mencionado anteriormente, são organismos biotróficos obrigatórios, e a sua taxonomia baseia-se quase exclusivamente na morfologia de seus esporos. Em amostras coletadas no campo, a identificação de FMAs é restrita, já que os esporos encontrados podem não representar a população de fungos que colonizam ativamente as raízes (Clapp et al., 1995), levando a uma subestimativa da diversidade destes organismos. Com a utilização de técnicas moleculares, vários trabalhos mostraram ser possível a identificação de FMAs, não só no solo, mas também em raízes colonizadas (Bonito et al., 1995; Zézé et al., 1996; Harney et al., 1997)

A maioria das técnicas moleculares empregadas na identificação de FMAs baseia-se na utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação e caracterização do DNA a partir de uma pequena amostra do fungo. Esta técnica se baseia na amplificação de regiões específicas do DNA, e para que isto ocorra, são necessários: (1) amostra de DNA que servirá de molde; (2) quantidades adequadas de 2 oligonucleotídeos ou primers (seqüência iniciadora), que determinarão a região a ser amplificada; (3) 4 deoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), que formarão a fita complementar; (4) a enzima DNA polimerase termoestável, que promoverá a síntese das novas fitas; e (5) um tampão Tris contendo $MgCl_2$ e KCl, que fornecerá as condições ideais para a atividade desta enzima. A região a ser amplificada é determinada pela seqüência dos primers (pequenos fragmentos de DNA de fita simples), que reconhecem regiões específicas no DNA utilizado como molde. O anelamento dos primers à sua seqüência complementar direciona a síntese enzimática da nova cadeia de DNA. Cada ciclo de

PCR é composto de 3 etapas realizadas a diferentes temperaturas. Na etapa de desnaturação a temperatura utilizada varia de 90 a 95°C e ocorre a separação da fita dupla do DNA molde, possibilitando o pareamento dos primers. A segunda etapa consiste no anelamento dos primers a sua seqüência complementar, e a temperatura varia em função da composição de bases dos primers utilizados (36-65°C). A terceira etapa é a de síntese, resultando na formação da nova fita de DNA. Nesta fase, a enzima Taq DNA polimerase, cuja temperatura ótima é de 72°C, inicia a síntese da fita complementar ao DNA molde. Este ciclo é repetido várias vezes, possibilitando um aumento exponencial na concentração de DNA da amostra. Uma representação esquemática da reação de PCR está ilustrada na figura 1.

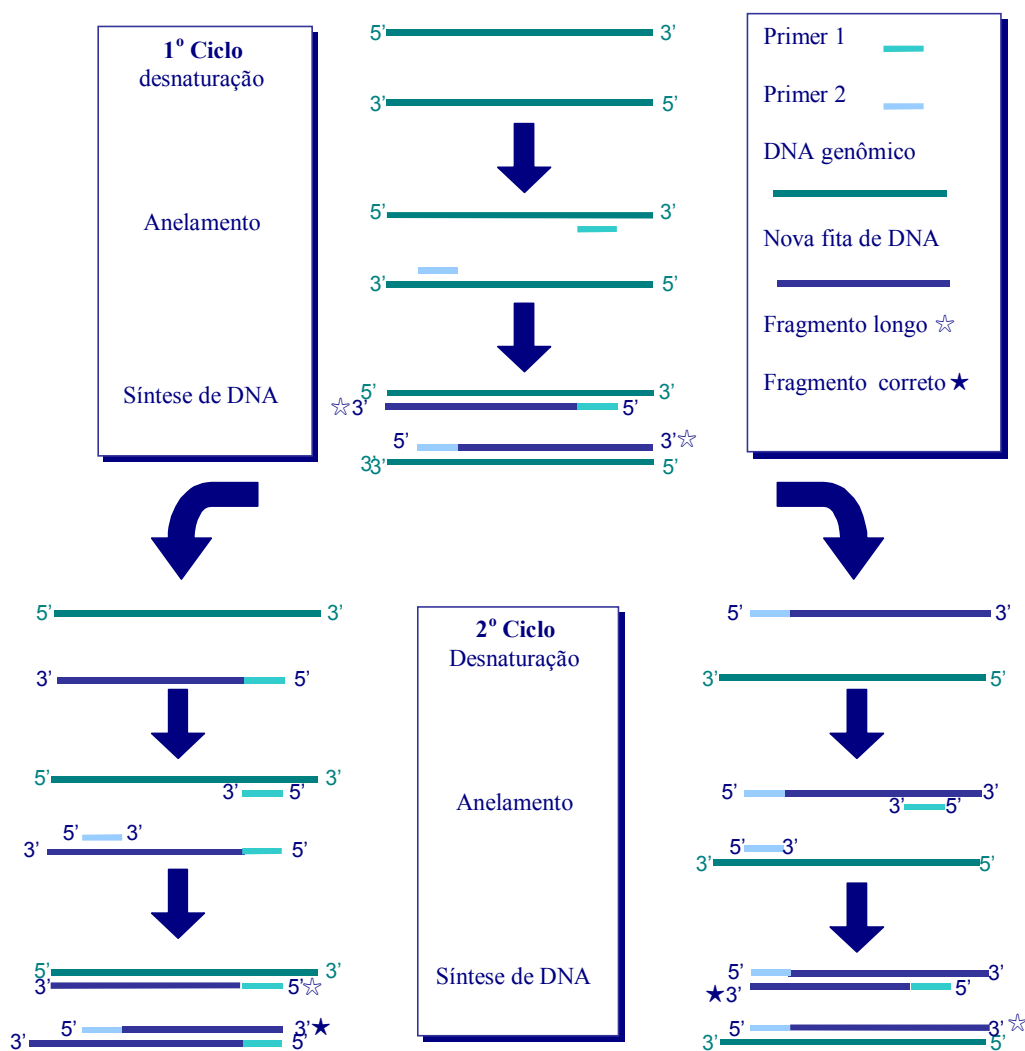


Figura 1: Representação esquemática da reação de PCR, mostrando os primeiros 2 ciclos. Na primeira etapa do primeiro ciclo, as 2 fitas do DNA genômico são desnaturadas por aquecimento a 95°C; na segunda etapa, a baixa temperatura permite o anelamento dos primers na região complementar presente no DNA genômico. Na terceira etapa, os híbridos DNA/primer funcionam como ponto de partida para que a DNA polimerase inicia a síntese da nova fita de DNA, que pode ser sintetizada “indefinidamente” (fragmento longo). Durante o 2º ciclo, o fragmento longo se torna fita molde, e o anelamento e extensão do primer a partir deste gera o fragmento mais curto, que possui a seqüência compreendida entre os dois primers. Do 3º ciclo em diante, tanto os fragmentos longos como os curtos serão utilizados como fitas molde, dando origem a fragmentos curtos, cuja concentração aumentará exponencialmente. Adaptado de Lanfranco et al. (1998).

A técnica de PCR pode ser utilizada para amplificar regiões específicas do DNA de FMAs, entretanto a maior parte das seqüências já caracterizadas destes fungos está relacionada aos genes ribossomais (18S, 5.8 e 28S), que são separados por regiões mais variáveis. Estas são conhecidas como regiões internas (ITS - internal transcribed spacers) e intergênicas (IGS - intergenic spacers), que por apresentarem taxas de evolução mais rápidas que o DNA ribossomal, podem ser utilizadas na caracterização de diferentes espécies (Figura 2). A técnica de PCR também pode ser usada para amplificar regiões do DNA ainda não conhecidas, através da utilização de primers randômicos ou de primers que amplifiquem pequenas seqüências repetidas (micro-satélite). Um esquema ilustrando as técnicas que podem ser usadas na análise de DNA está representado na Figura 3, e os detalhes sobre cada uma destas técnicas serão abordadas ao longo do texto.

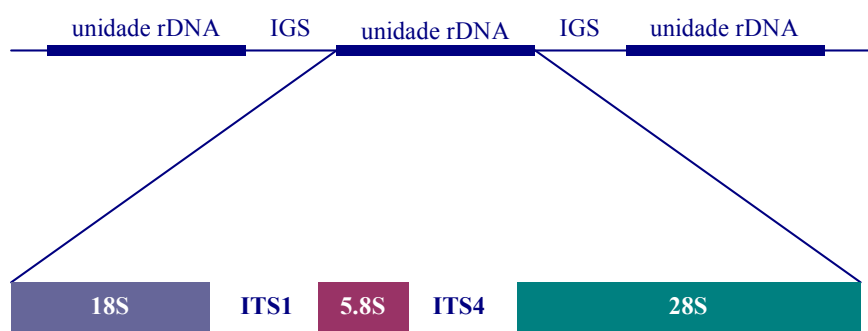


Figura 2: Representação esquemática dos genes ribossomais no genoma eucarioto. As unidades do rDNA se encontram repetidas em seqüência e separadas entre si por regiões intergênicas (IGS). Em detalhe, cada unidade de genes ribossomais é composta pelos genes 18S, 5.8S e 28S e a região contida entre estes é chamada de região interna (ITS). Adaptado de Lanfranco et al. (1998)

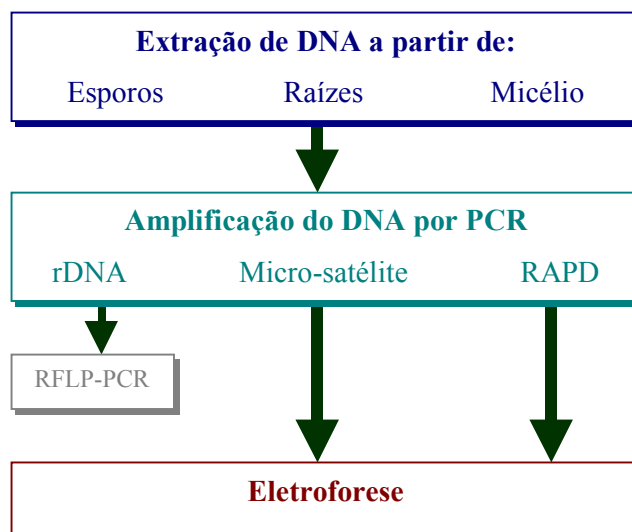


Figura 3: Fluxograma ilustrando os passos envolvidos na análise do polimorfismo do DNA de fungos micorrízicos. Adaptado de Lanfranco et al. (1998).

A região que compreende os genes ribossomais vêm sendo bastante utilizadas em estudos de filogenia (item 4.2) e identificação de FMA por conterem regiões extremamente conservadas, o que permitiu a construção de diversos primers. A amplificação da região ITS possibilitou a distinção, a nível genérico, de 3 espécies de FMA (Harney et al., 1997). Estes autores, utilizando os pares de primers ITS1/ITS2 e ITS1/ITS4, concluíram que as espécies *Scutelospora calospora*, *Acaulopora laevis*, *Glomus deserticola* apresentam suficiente variação na região ITS, permitindo a sua distinção a partir de amostras oriundas do campo. A utilização destes primers também possibilitou a detecção destes fungos em raízes colonizadas, entretanto como estes primers não são específicos para a ordem *Glomales*, o fragmento gerado não é suficiente para determinar quais fungos estão presentes, sendo necessário o desenvolvimento de sondas específicas que confirmem a origem dos fragmentos amplificados.

A subunidade 5.8S e a região ITS do rDNA de dois isolados de *G. mosseae* foram amplificadas por PCR e seqüenciadas, utilizando-se os primers ITS1/ITS4 (Millner et al., 1998). A partir da análise destas seqüências, foram desenvolvidos

primers específicos para *G. mosseae*. A especificidade dos primers foi confirmada através da técnica de PCR, realizada a partir de esporos de 36 isolados de diferentes espécies de FMA. Os primers GMOS1:GMOS2 promoveram a amplificação de uma região de 400 pb, presente em todos os isolados avaliados de *G. mosseae* e *G. monosporum*. A utilização de uma sonda específica para *G. mosseae* (GMSO5) confirmou os resultados obtidos por PCR, tendo hibridizado com o DNA proveniente de *G. mosseae* e *G. monosporum*. Estes resultados confirmam que estas duas espécies são indistinguíveis taxonomicamente, a nível de rRNA. Tanto a sonda como os primers foram utilizados com sucesso na detecção de *G. mosseae* a partir de DNA extraído de raízes colonizadas.

Sanders et al. (1995) promoveram a amplificação do DNA de um único esporo para estudar a diversidade de FMA em populações naturais. Para tal, foram utilizados os primers ITS1 e ITS4, e o produto proveniente da amplificação foi cortado com enzimas de restrição. Esta técnica, conhecida como RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polimorfism-PCR) detectou diferentes padrões de bandeamento obtidos de diversos isolados. Entretanto, este método apresenta limitações se a região ITS não for conhecida. A detecção de diferentes padrões de bandeamento obtidos de 2 isolados distintos confirma geneticamente esta diferença. Porém, se não é observada diferença entre o padrão de bandas de 2 isolados, estes podem ser idênticos ou diferentes, pois a região ITS pode ser realmente semelhante ou diferente. Neste último caso, é possível que as enzimas de restrição utilizadas não tenham sido capazes de detectar esta diferenças.

A técnica de PCR também pode ser utilizada na quantificação de FMA. Recentemente, Edwards et al. (1997) desenvolveram uma técnica de PCR competitivo para quantificar *G. mosseae* dentro de raízes de plantas. Estes autores utilizaram os primers M3 e P0 (Lanfranco et al., 1995) obtidos a partir de bandas de RAPD não polimórficas, e específicos para esta espécie. A comparação entre o PCR competitivo e a microscopia, técnica usualmente utilizada na quantificação de FMA em raízes, mostrou que a técnica molecular é tão acurada e sensível como a tradicional. Além disso, o PCR competitivo permite quantificar uma determinada espécie presente em raízes colonizadas por mais de uma espécie, o que não pode

ser obtido por microscopia, já que as diferenças morfológicas entre hifas é muito pequena.

Simon et al. (1993) desenvolveram primers táxon-específicos para *Glomus etunicatum* (VALETC) e *Glomus sp.* (VAGLO), e para as famílias *Acaulosporaceae* (VAACAU) e *Gigasporaceae* (VAGIGA), que utilizados em conjunto com os primers VANS1, amplificam um fragmento do gene do 18S rRNA. O produto obtido por PCR foi então analisado através de SSCP (Single-Strain Conformation Polymorfism), onde as amostras são analisadas através de gel de poliacrilamida de alta resolução, sob condições não desnaturantes. As duas fitas de DNA são desnaturadas imediatamente antes de serem aplicadas no gel, migrando separadamente de acordo com a conformação que cada uma irá adotar. Desta forma, esta técnica é capaz de detectar alterações de até uma única base entre fragmentos homólogos, sem que haja necessidade de seqüenciamento do fragmento. Os primers desenvolvidos permitiram a identificação dos fungos a nível de família, sendo a técnica de SSCP aplicada com sucesso na caracterização de amostras de raízes colonizadas por FMA (Simon et al., 1993). Entretanto, estes autores propõem que a diferenciação entre gênero e espécie pode ser obtida pela utilização dos primers VANS22/VANS32, que amplificam uma região mais variável. Em trabalho posterior, Simon (1996) comparou 15 seqüências relativas a subunidade menor do rDNA de *Glomales*, visando determinar as regiões mais variáveis, e concluiu que apesar das regiões amplificadas pelos primers VANS22/VANS32 e NS71/SSU1492' apresentarem alta variabilidade, o polimorfismo detectado é suficiente apenas para diferenciação entre gêneros de FMA. Como estes primers não são específicos para FMA, as amostras devem ser primeiramente amplificadas com os primers VANS1 (específico para a ordem *Glomales*) e VANS22, posteriormente amplificadas com VANS22/VANS32 e analisadas pelo método de SSCP (Simon et al., 1993). Resultados obtidos por Sanders et al. (1996) revelaram que a região VANS1 não é conservada, podendo variar em até 3 bases. Estas diferenças na seqüência podem reduzir a eficiência do anelamento deste primer, dificultando a obtenção de fragmentos a partir da reação de PCR.

Clapp et al. (1995) estudaram a diversidade de FMA em uma comunidade natural através de uma técnica denominada de SEAD (Selective Enrichment of Amplified DNA). Esta técnica tem como objetivo aumentar a eficiência da reação de PCR através da eliminação do DNA oriundo da planta. Para tal, o DNA de plantas não micorrizadas foi marcado com biotina (dUTP-biotina) através de uma reação de PCR, utilizando primers que amplificam para região do 18S rDNA. Estes mesmos primers foram usados para amplificar DNA proveniente de raízes micorrizadas, porém não foram utilizados dNTPs marcados com biotina. Um excesso do produto de PCR biotinilado foi combinado com o produto obtido a partir do PCR comum, e posteriormente a mistura foi desnaturada e submetida a novo anelamento, de forma a permitir a formação de moléculas de dupla fita de DNA (oriundo de planta), com pelo menos uma fita biotinilada. Com a adição de estreptavidina, ocorreu a formação de um complexo entre esta substância e as moléculas biotiniladas, e este complexo, que contém o DNA das plantas, foi eliminado por extração com fenol. O DNA restante foi então amplificado com os primers VAGIGA, VAGLO e VAACAU (Simon et al., 1993), em conjunto com o primer VANS1. Os resultados obtidos por PCR indicaram que algumas raízes estavam infectadas simultaneamente por fungos pertencentes aos 3 gêneros. A contagem dos esporos do solo de onde foram coletadas as raízes, revelou a presença de esporos de *Acaulospora* e *Scutellospora* em alta quantidade, enquanto os esporos de *Glomus* foram observados em apenas 5% das amostras (Clapp et al., 1995). Por este motivo, o sinal positivo obtido pelo primer VAGLO era inesperado e revelou a necessidade de identificação de FMA direto de raízes infectadas. Conclui-se então que não há necessariamente uma relação entre número de esporos e colonização das raízes por FMA, e é necessária a utilização de outras técnicas para se avaliar a diversidade de FMA.

A construção de uma biblioteca genômica de DNA de fungos micorrízicos pode representar uma alternativa para obtenção de sondas espécie-específicas. Zézé et al. (1996) construíram uma biblioteca parcial do DNA genômico de *S. castanea* e observaram a presença de seqüências repetidas, que poderiam ser usadas como marcadores moleculares para identificação desta espécie. Esta seqüência, chamada de SC1, possui tamanho de 1.202 pb e está distribuída em

2.600 cópias, representando 0,24% do genoma de *S. castanea*. A partir do seqüenciamento de SC1, foram desenvolvidos primers (SC1-1 e SC1-2), que quando utilizados em amostras de raiz, se mostraram específicos para esta espécie, não tendo amplificado DNA de *Scutellospora spp.* ou de outras espécies de FMA. Entretanto, devido a pequena quantidade de isolados classificados como *S. castanea* em Bancos de Germoplasma, não é possível determinar se os primers são específicos para a espécie ou para o isolado. A técnica de PCR, usando os primers SC1-1 e SC1-2 se mostrou bastante sensível, sendo possível detectar até 0,25 η g de DNA de *S. castanea*, quando este foi misturado com 20 η g de DNA proveniente de plantas não micorrizadas (Zézé et al., 1996).

O uso da técnica de PCR, por meio de primers arbitrários (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA), possibilita a detecção de polimorfismo sem que haja conhecimento anterior da seqüência nucleotídica. O padrão de bandejamento obtido pode então ser utilizado como marcador molecular ou na construção de primers ou sondas a serem usadas na detecção de uma determinada espécie. Este método utiliza um único primer (10 nucleotídeos) de seqüência arbitrária, que em condições de baixa estringência durante os primeiros ciclos de amplificação, se anelam ao DNA permitindo o pareamento de algumas bases não complementares. O restante da reação é realizada com alta estringência, gerando produtos cujas extremidades são complementares aos primers. Esta técnica não permite a detecção de FMA diretamente de raízes, já que utiliza primers inespecíficos, que amplificam também o genoma da planta. Entretanto, o RAPD pode ser usado para comparar isolados a partir de esporos ou para construir primers específicos, desenvolvidos após o seqüenciamento dos fragmentos obtidos por este método.

Wyss & Bonfante (1993) amplificaram o DNA genômico de FMA a partir de RAPD e verificaram que o padrão de bandejamento variava em função do origem geográfica do isolado. Isolados de uma mesma região geográfica compartilhavam 60 a 76% dos fragmentos amplificados, enquanto que aqueles obtidos de diferentes regiões possuíam entre 44 a 64% dos fragmentos em comum. Abbas et al. (1996), utilizando a mesma técnica, identificaram seqüências de DNA específicas para *G. mosseae* e *Gi. margarita*, a partir das quais foram construídos primers isolado-específicos, capazes de detectar a presença destes fungos em misturas de esporos e raízes infectadas.

Outras regiões podem ser utilizadas para estudar o polimorfismo do DNA de forma mais eficiente, como os micro-satélites. Estes são regiões hipervariáveis do DNA, compostas por seqüências repetitivas de 2 a 10pb, dispostas em tandem e altamente dispersas através do genoma eucariótico. Primers específicos para seqüências micro-satélites podem ser obtidos sem que seja necessária a construção de uma biblioteca genômica.

Longato e Bonfante (1997) utilizaram diversos primers baseados em seqüências de micro-satélite para detectar estas regiões em FMAs e verificaram que o micro-satélite (GTG)₅ estava presente nas sete espécies de FMA testadas. A amplificação do DNA destas espécies, utilizando esta seqüência como primer, gerou um padrão de bandeamento que possibilitou a distinção destas espécies através do número, tamanho e intensidade dos fragmentos. Já o primer (GACA)₄ revelou diferenças intra-específicas entre 3 linhagens de *G. mosseae*. A comparação dos resultados obtidos pela amplificação de regiões de micro-satélite com a amplificação da região ITS revelou que a primeira é mais simples, já que fornece resultados conclusivos a partir de um único passo, enquanto que nesta última técnica, o fragmento amplificado geralmente é submetido posteriormente a restrição por endonucleases ou SSCP. O uso da técnica de micro-satélite também se mostrou mais vantajosa que o RAPD, que por apresentar um grande número de bandas, torna difícil a análise. A partir dos resultados obtidos por Longato e Bonfante (1997), conclui-se que a técnica de PCR, associada a primers para regiões micro-satélite é uma ferramenta bastante sensível para detecção da variabilidade genética. Através desta metodologia, foram obtidos padrões de polimorfismos capazes de caracterizar isolados a nível inter e intra-específicos.

Vandenkoornhuysse & Leyval (1998) compararam diversos isolados de *G. mosseae* através de 2 técnicas: seqüenciamento da subunidade menor do rDNA e amplificação de regiões de micro-satélites. De acordo com estes autores, a relação entre as análises moleculares e morfológicas podem ser usadas para definir variações entre espécies. Resultados obtidos a partir do seqüenciamento da subunidade menor do rDNA podem complementar a descrição de espécies de *Glomales*, enquanto outras técnicas moleculares como seqüenciamento da região ITS do rDNA ou amplificação com primers randômicos, podem ser usadas no estudo da diversidade de FMA.

4.2. Filogenia

A exemplo de outros organismos, a subunidade menor do rDNA foi escolhida para estudos filogenéticos de FMAs. Inicialmente, Simon et al. (1992) utilizando primers universais para a região 18S, desenvolveram a partir da análise de seqüências obtidas de diversas espécies de FMA, um primer específico para a Ordem *Glomales* (taxon-específico), denominado VANS1.

Após seqüenciamento parcial da região do 18S do rDNA de diversos FMAs, este grupo estimou a origem dos FMA (462-353 milhões de anos), confirmou a presença de 3 famílias dentro da Ordem *Glomales*, e a origem monofilética dos *Glomales*, o que está de acordo com os dados baseados na morfologia dos esporos (Simon et al., 1993). No entanto, o dendograma proposto por Simon et al. (1993) difere daquele apresentado por Morton & Benny (1990), obtido a partir de dados morfológicos. De acordo com Simon et al. (1993), a família *Gigasporaceae* está mais próxima de *Acaulosporaceae* que de *Glomaceae*. A análise de seqüências do 18S rDNA de 12 isolados de FMA revelou a presença de 2 agrupamentos principais (Simon, 1996), confirmando os resultados obtidos anteriormente por Simon et al. (1993). Recentemente foi proposto que a ordem *Glomales* é polifilética, onde *Glomacea* e *Acaulosporacea* tiveram origem em um mesmo ancestral, que por sua vez difere daquele que deu origem a família *Gigasporaceae* (Morton, 1998). Uma possível explicação para as diferenças na filogenia de FMA está relacionada com o caráter heterocarióticos dos seus esporos. A variabilidade da região do 18S rDNA destes fungos já foi observada (Clapp et al., 1995) e este polimorfismo pode levar a uma interpretação errônea dos dados. Para contornar este problema, é necessário que um número maior de isolados tenham a subunidade menor do rDNA seqüenciada, possibilitando uma análise filogenética mais próxima da realidade (Morton, 1998).

Recentemente 28 isolados de *Gigaspora* foram avaliados através de caracteres morfológicos e técnicas moleculares (análise do 18S rDNA e padrão de isoenzimas). Tanto o seqüenciamento da subunidade menor do rDNA, como o padrão de isoenzimas, delimitaram 3 grupos subgenéricos, que correspondem às diferenças morfológicas observadas dentro deste gênero (Bago et al., 1998). Estes resultados sugerem que, apesar da variabilidade observada na região do 18S rDNA,

esta pode ser utilizada para estudos filogenéticos. Dodd et al. (1996) compararam diversos isolados de *Glomus mosseae* e *G. coronatum* através da análise de isoenzimas (malato desidrogenase e esterase), do perfil de proteínas em SDS-Page, do polimorfismo do DNA (RAPD e amplificação da região ITS) e da utilização de primers específicos para *G. mosseae*. Todas as técnicas utilizadas forneceram evidências que suportam a separação taxonômica destas 2 espécies.

Isolados de *Glomus mosseae* foram comparados usando duas técnicas moleculares: amplificação de regiões de micro-satélite do DNA genômico e seqüenciamento do 18S do rDNA. A árvore filogenética obtida pelo seqüenciamento do rDNA foi similar aquela obtida pela amplificação das regiões de micro-satélites exceto para um isolado (*Glomus mosseae* – DAOM 221475) (Vandenkoornhuyse & Leyval, 1998). Estes autores sugerem que as seqüências da subunidade menor do rDNA sejam usadas na descrição de espécies de *Glomales* e que a amplificação de regiões de micro-satélite seja usada para estudar a diversidade entre espécies de *Glomales* (filogenia).

5. Protocolos

5.1. Extração de DNA a partir de esporos de FMA

5.1.1. A partir de um esporo (Lloyd-Macglip et al., 1996)

- a) Quebrar o esporo em tubo de microcentrífuga contendo 20 µl de Instagene (Bio-Rad), com o auxílio de um microbastão e incubar a 56°C por 30 minutos;
- b) Agitar a amostra em vortex por 10 segundos, incubar a 100°C por 10 minutos, agitar novamente pelo mesmo período e centrifugar a 10000 g por 3 minutos;
- c) Transferir o sobrenadante para novo tubo de microcentrífuga e estocar a -20°C;
- d) Usar a amostra em um período de 1 mês.

5.1.2. De 10 a 20 esporos

- a) Romper os esporos em tubos de microcentrífuga com ajuda de um microbastão;
- b) Ressuspender a amostra em 50 µl de água e 20 µl de resina Chelex 100 (20%);
- c) Submeter a amostra a 3 choques térmicos em N líquido e banho a 100°C;

- d) Aquecer a amostra e adicionar 2 μ l de RNase (10 mg/ml);
- e) Incubar a 37° por 30 minutos e centrifugar;
- f) Coletar o sobrenadante e estocar a -20°C;
- g) Diluir em água (1:10; 1:50 e 1:100) para as reações de PCR.

5.1.3. A partir de 50 esporos (Lloyd-Macglip et al., 1996)

- a) Quebrar os esporos em tubos de microcentrífuga contendo N líquido, com o auxílio e um microbastão;
- b) Ressuspender em 750 μ l de tampão de extração contendo CTAB (2%), NaCl (1,4M), EDTA (20mM), Tris-HCl (100mM; pH 8,0) e mercaptoetanol (0,2%) e incubar por 30 minutos a 65°C;
- c) Para extração dos restos celulares, adicionar o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitar em vortex, centrifugar por 10 minutos a 12000 g e coletar a fase aquosa (superior). Realizar este procedimento duas vezes;
- d) Adicionar um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitar em vortex, centrifugar por 10 minutos a 12000 g e coletar a fase aquosa (superior);
- e) Precipitar o DNA com isopropanol (1/10 do volume; -20°C; 15 minutos). Centrifugar a 12000 g por 15 minutos;
- f) Lavar o pelete com 100 μ l de etanol (70%), secar e ressuspender em 20 μ l de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM);
- g) Estocar a mostra a -20°C

5.1.4. A partir de micélio (Longato e Bonfante, 1997)

- a) Liofilizar o micélio e utilizar entre 0,5-1 mg;
- b) Romper a amostra em N líquido, transferir o resíduo para tubos de microcentrífuga e ressuspender em 600 μ l de Tris-HCl (100 mM; pH 9,0), EDTA (20 mM; pH8,0), NaCl (1,4 M), CTAB (2%) e mercaptoetanol (0,2%). Incubar a 65°C por 30-60 minutos;

- c) Centrifugar a mostra por 5 minutos a 13000 rpm e transferir a fase superior para microtubos novos;
- d) Remover as proteínas por extração seqüencial com 600 μ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- e) Remover a fase aquosa e precipitar o DNA com 1,5 volume de isopropanol;
- f) Centrifugar a mostra e lavar o pelete 2 vezes com etanol (70%);
- g) Secar o pelete a temperatura ambiente e ressuspender o DNA em 40-50 μ l de tampão TE (pH 8,0). Estocar a -20°C .

5.2. Extração de DNA de raízes colonizadas por FMA (Abbas et al., 1996)

- a) Lavar as raízes com água deionizadas e secá-las em papel toalha;
- b) Congelar as raízes com N líquido e macerá-las até a pulverização do material;
- c) Transferir o resíduo para tubos de microcentrífuga e adicionar o mesmo volume de tampão de extração contendo Tris-HCl (100 mM; pH 9,0), EDTA (20 mM; pH8,0), NaCl (1,4 M), CTAB (2%);
- d) Agitar o tubo e aquecê-lo a 50°C por 40 minutos;
- e) Remover os materiais insolúveis por centrifugação a 14000 g por 5 minutos;
- f) Extrair as proteínas com uma lavagem de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- g) Remover a fase aquosa e tratá-la com RNase (100 μ g/ml) por 50 minutos a 37°C ;
- h) Precipitar o DNA pela adição de etanol contendo acetato de amônia (0,75 M) por 15 minutos a -75°C ;
- i) centrifugar o material, lavar o pelete com etanol (70%) e secar a temperatura ambiente por uma noite;
- j) Ressuspender o DNA em 50 μ l de água deionizada e estocar a -20°C

Observação: Lavar previamente o microbastão com NaOH (1 N), HCl (1 N) e água esterilizada, com o intuito de remover qualquer fragmento contaminante de DNA.

6. Conclusões

A detecção, a identificação e classificação de fungos micorrízicos é baseada quase que exclusivamente na morfologia e estrutura de seus esporos vegetativos (Morton & Benny, 1990). Entretanto, os resultados obtidos através do estudo morfológico dos esporos podem variar em função das condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento dos esporos, gerando informações nem sempre precisas.

Através das técnicas de biologia molecular, principalmente aquelas baseadas na reação de PCR, vem sendo possível estudar a ecologia de FMA de uma forma mais precisa. Algumas espécies como *G. mosseae* e *S. castanea* possuem primers específicos, que permitem a sua identificação em amostras provenientes de solo ou planta. A construção de primers espécie-específicos permite a quantificação de um determinado indivíduo, em raízes colonizadas por mais de uma espécie, o que não pode ser obtido por microscopia, devido as semelhanças morfológicas existentes entre hifas de diferentes espécies. A técnica de PCR também foi aplicada no estudo da diversidade de FMA. Os resultados obtidos revelaram que algumas técnicas convencionais, como a contagem de esporos, devem ser utilizadas com cautela, pois nem sempre existe uma correlação entre o número de esporos e a colonização das raízes por FMA. Os primers citados neste documento e outros, específicos para gênero e isolados, foram obtidos a partir de diversas técnicas como RAPD e microsatélite. Estas e outras técnicas podem ser ainda aplicadas para desenvolver seqüências específicas para outro indivíduos.

Com relação a filogenia, os dados obtidos por biologia molecular tem divergido daqueles obtidos por métodos tradicionais. Entretanto, o seqüenciamento do gene do 18S rRNA de um maior número de espécies de FMA poderá esclarecer com maior exatidão a origem destes fungos.

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, J.D.; HENTRICK, B.A.D.; JURGENSON, J.E. Isolate specific detection of mycorrhizal fungi using genome specific primer pairs. **Mycologia**, New York, v.88, n.6, p.939-946, 1996.

- BAGO, B.; BENTIVENGA, S.P.; BRENAC, V.; DODD, J.C.; PICHÉ, Y.; SIMON, L. Molecular analysis of *Gigaspora* (*Glomales*, *Gigasporaceae*). **New Phytologist**, Cambridge, v.139, n.3, p.581-588, 1998.
- BIANCIOTTO, V.; BONFANTE, P. Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.12, p.1071-1076, 1992.
- BONITO, R. DI; ELLIOT, M.L.; DES JARDIN, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.7, p.2809-2810, 1995.
- BURGGRAAF, A.J.P.; BERINGER, J.E. Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, n.1, p.25-33, 1989.
- CLAPP, J.P.; YOUNG, J.P.W.; MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist**, Cambridge, v.130, n.2, p.259-265, 1995.
- DODD, J.C.; ROSENDAHL, S.; GIOVANNETTI, M.; BROOME, A.; LANFRANCO, L. WALKER, C. Inter-and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. **New Phytologist**, Cambridge, v.133, n.1, p.113-122, 1996.
- EDWARDS, S.G., FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.12, p.1440-1444, 1997.
- HARNEY, S.K.; EDWARDS, F.S.; ALLEN, M.F. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. **Mycologia**, New York, v.89, n.4, p.547-550, 1997.
- HIJRI, M.; DARMENCY, M.; DULIEU, H. Inter and intranuclear genetic polymorphism of the internal transcribed spacer (ITS) in *Scutellospora castanea* (*Glomales*, *Zygomycetes*). In: **International Conference on Mycorrhiza**, 2., 1998, Uppsala, Abstracts... Uppsala: SJFR, 1998. p82.
- LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; LONGATO, S.; MELLO, A.; COMETTI, V.; BONFANTE, P. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In: VARMA, A. eds. **Mycorrhiza manual**. Berlin: Springer, 1998, p.353-372.

- LANFRANCO, L.; WYSS, P., MARZACHI, C.; BONFANTE, P. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Ecology**, Oxford, v.4, n.1, p.61-68, 1995.
- LLOYD-MACGILP, S. A.; CHAMBERS, S. M.; DOOD, J. C.; FITTER, A. H.; WALKER, C; YOUNG, J.P.W. Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v.133, n.1, p.103-111, 1996.
- LONGATO, S.; BONFANTE, P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.4, p.425-432, 1997.
- MILLNER, P.D.; MULBRY, W.W.; REYNOLDS, S.L.; PATTERSON, C.A. A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, Berlin, v.8, n.1, p.19-27, 1998.
- MORTON, J.B. Evolution of fungi in *Glomales*. In: International Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Collection, 1998. Disponível: <http://www.invam.caf.wvu.edu>. consultado em nov. 1998
- MORTON, J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature and identification. **Mycotaxon**, Ithaca, v.32, p.267-324, 1988.
- MORTON, J.B; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. **Mycotaxon**, Ithaca, v.37, p.471-491, 1990.
- SANDERS, I.R., CLAPP, J.P.; WIEMKEN, A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Cambridge, v.133, n.1, p.95-101, 1996.
- SANDERS, J.R., ALT, M.; GROOPE, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 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 Phytologist**, Cambridge, v.130, n.3, p.419-427, 1995.
- SEJALON-DELMAS, N.; MAGNIER, A.; BÉCARD, G. Hyphal fusion and intersporal crossing in arbuscular mycorrhizal fungi. In: **International Conference on Mycorrhiza**, 2., 1998, Uppsala, Abstracts... Uppsala: SJFR, 1998. p. 156.

- SIMON, L. Phylogeny of the *Glomales*: deciphering the past to understand the present. **New Phytologist**, Cambridge, v.133, n.1, p.95-101, 1996.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, London, v.363, n.6424, p.67-69, 1993.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.1, p.291-295, 1992
- SIMON, L.; LÉVESQUE, R.C.; MALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.12, p.4211-4215, 1993.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2 ed. San Diego, California: Academic Press, 1997. 605p.
- SOUZA, F.A. de; SILVA, E.M.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J.O. eds. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF. p.255-290, 1996.
- TRAPPE, J.M. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the Angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G.R. ed. **Ecophysiology of VA mycorrhizal plants**. Boca Raton: CRC, 1987, p.5-25.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; LEYVAL, C. SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mossea*. **Mycologia**, New York, v.90, n.5, p.791-797, 1998.
- WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, n.11, p.1351-1357, 1993.
- ZÉZÉ, A.; HOSNY, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DULIEU, H. Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in planta. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.7, 2443-2448, 1996.
- ZÉZÉ, A.; SULISTYOWATI, E.; OPHEL-KELLER, K.; BARKER, S.; SMITH, S. Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular

mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.2, p.676-678, 1997.