

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16

Análise da Diversidade Micorrízica na Rizosfera de Genótipos de Milho (*Zea mays L.*) Contrastantes Para Eficiência no Uso de P Utilizando Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

*Christiane A. Oliveira
Eliane A. Gomes
Ivanildo E. Marriel
Claudia T. Guimarães
Robert E. Schaffert
Ubiraci G. P. Lana
Vera M.C. Alves*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

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 Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação

1ª edição

1ª impressão (2009): 200 exemplares

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 da diversidade micorrízica na rizosfera de genótipos de milho (*Zea mays* L.) contrastantes para eficiência no uso de P utilizando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) / Christiane Abreu de Oliveira ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 29 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1217-1981; 16).

1. Microbiologia do solo. 2. Micorriza. 3. Milho. I. Oliveira, Christiane Abreu de. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

Sumário

Resumo.....	5
Introdução	6
Material e métodos	8
Resultados	12
Discussão	20
Referências.....	23

Análise da Diversidade Micorrízica na Rizosfera de Genótipos de Milho (*Zea mays* L.) Contrastantes Para Eficiência no Uso de P Utilizando Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Christiane A. Oliveira¹
Eliane A. Gomes²
Ivanildo E. Marriel²
Claudia T. Guimarães²
Robert E. Schaffert²
Ubiraci G. P. Lana²
Vera M. C. Alves²

Resumo

A diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) presentes na rizosfera de genótipos de milho tropicais, selecionados como contrastantes para eficiência no uso de fósforo (P), foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Fragmentos de DNA ribossômico (rDNA) foram amplificados por PCR, utilizando primers específicos para as famílias Acaulosporaceae e Glomaceae de fungos micorrízicos. Na análise por DGGE, os primers para as famílias Acaulosporaceae e Glomaceae foram eficientes na diferenciação das populações micorrízicas. Os genótipos de milho tiveram uma maior influência na comunidade de FMA da rizosfera do que o nível

¹ Professora do UNIFEMM - Centro Universitário de Sete Lagoas. Av. Marechal Castelo Branco, 2765, Santo Antônio, 35701-242, Sete Lagoas, MG.

² Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.
eliane@cnpms.embrapa.br

de P no solo. Os perfis de DGGE revelaram bandas que estavam presentes somente nos genótipos eficientes no uso de P (L3 e HT3060), sugerindo que alguns grupos de FMA foram estimulados por estes genótipos. As espécies *Acaulospora longula*, *A. rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae* e *Glomus caledonium* foram encontradas somente na rizosfera dos genótipos de milho eficientes no uso de P cultivados em solos com baixo teor de fósforo. Uma maior diversidade micorrízica foi encontrada nas amostras coletadas em solos de plantio direto, comparados com solos de plantio convencional. A efetiva colonização das raízes por FMA pode aumentar a eficiência de uso de P de cultivares em solos sob baixo P, influenciando a produção de milho em solos ácidos do Cerrado.

Palavras-chave: solos ácidos, deficiência de P, fungos micorrízicos arbusculares (FMA), milho, PCR-DGGE.

Introdução

Os solos do Cerrado brasileiro apresentam elevada acidez e alta capacidade de fixação de fósforo (P), o que limita o crescimento das plantas (HINSINGER, 2001; NOVAIS; SMYTH, 1999). Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm uma função importante na aquisição e mobilização de nutrientes escassos e pouco móveis, como o P, pois aumentam a área superficial das raízes, facilitando a absorção de nutrientes pelas plantas (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; SMITH et al., 2003; KOIDE; MOSSE, 2004; GOSLING et al., 2006).

O micélio dos fungos micorrízicos pode atingir até 3% da massa da raiz, formando aproximadamente de 10 a 100 metros de micélio por cada centímetro de raiz (CARDOSO; KUYPER, 2006). Como um sistema simbiótico, o fungo recebe fontes de carbono da planta hospedeira e fornece nutrientes às plantas. Os fungos micorrízicos também atuam na

melhoria da estabilidade dos solos, uma vez que a hifa pode unir as partículas do solo mecânica e quimicamente, através da exsudação da proteína glomalina (VAN DER HEIJDER et al., 1998; WRIGHT et al., 2005).

A contribuição dos fungos micorrízicos para a aquisição de nutrientes apresenta diferenças marcantes entre as espécies e isolados de fungos e os genótipos das plantas hospedeiras (ABBOTT; ROBSON, 1991; MARSCHNER, 1995, 1998; KOIDE, 2000; SIQUEIRA et al., 2002; WRIGHT et al., 2005). Efeitos positivos da associação micorrízica já foram relatados, sob condições de baixos teores de P, com aumento da produção da biomassa e melhor desenvolvimento e produção de diversos cereais, como sorgo (RAJU et al., 1990), trigo (MARSCHNER et al., 2006), aveia (PLENCHETTE et al., 1983), cevada (BAON et al., 1992) e milho. A planta de milho possui elevada taxa de crescimento e grande demanda por nutrientes, apresentando frequentemente interação com fungos micorrízicos, principalmente em solos pouco férteis (BRESSAN; VASCONCELLOS, 2002; CLARK; ZETO, 1996; KAEPLER et al., 2000; KELLY et al., 2001; LIU et al., 2003; NURLAENY et al., 1996; WRIGHT et al., 2005).

De acordo com Gosling et al. (2006), FMA podem ser utilizados na agricultura para aumentar a produção das culturas enquanto minimizam os requerimentos de fertilizantes químicos. Apesar dos numerosos estudos mostrando aumentos de produção, a tecnologia das micorrizas ainda não é rotineiramente aplicada na agricultura. Dentre as principais causas, estão problemas na identificação e no acompanhamento das espécies dos fungos no campo, além do menor entendimento da biologia básica e da incapacidade de crescer destes fungos biotróficos obrigatórios em meios de cultura. A seleção de FMA apropriados, a produção de inóculos em qualidade e quantidade e o conhecimento da ecologia dos FMA são etapas críticas para a aplicação dessa tecnologia na agricultura (BAREA et al., 2005a,b; GIANINAZZI et al., 2002; SIMON et al., 1992).

O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises do DNA favorece os

estudos ecológicos das populações nativas de fungos micorrízicos presentes nas áreas de cultivo. Dessas técnicas, o sequenciamento de rDNA (DNA ribossômico) clonado e DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) (MUYZER; SMALLA, 1998) estão entre as mais utilizadas atualmente para estudar as variações intra e interespecíficas e as relações filogenéticas entre FMA (KOWALCHUK et al., 2002; ÖPIK et al., 2003; SOUZA et al., 2004; MA et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição da comunidade de fungos micorrízicos nativa no solo rizosférico de genótipos de milho contrastantes na eficiência do uso de P, cultivados em solos com alto e baixo teor de P disponível. Um conjunto de primers que amplificam DNA ribossômico das famílias Acaulosporaceae e Glomaceae de FMA foi utilizado para caracterizar a diversidade genética desses fungos. Adicionalmente, o número de esporos no solo rizosférico e a taxa de colonização das raízes dos genótipos contrastantes por FMA foram avaliados por microscopia.

Material e Métodos

2.1. Delineamento experimental e amostragem

O experimento foi realizado em uma área de Cerrado, durante o verão 2006-2007, na Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, na latitude 19°28'S e longitude 44°15'W, a uma altitude de 732 m. O experimento foi um fatorial 2x8, com dois níveis de P no solo e oito genótipos, respectivamente, utilizando um delineamento em blocos casualizados com três repetições. Os genótipos de milho consistiram de três híbridos eficientes (HT3060, HS228xL3, HS20x723), dois híbridos ineficientes (HS2841x5046, HS26x1113), duas linhagens eficientes (L228, L3) e uma linhagem ineficiente (L22), classificados em diferentes níveis de eficiência de aquisição de fósforo de acordo com Parentoni e Souza Júnior

(2008). As plantas foram cultivadas em dois sistemas de manejo convencionais: fósforo elevado (P alto), com 29 mg Kg⁻¹, e baixo teor de fósforo (P baixo), com 3 mg kg⁻¹.

As amostras foram compostas de raízes e de solo aderido às raízes de cinco plantas aleatórias dentro de cada parcela, para cada uma das três repetições, 60 dias após a semeadura, durante a fase de florescimento. As raízes foram agitadas para separar o solo rizosférico. Foram também coletadas amostras do solo (bulk) entre as linhas, tanto no nível de baixa quanto de alta concentração de P dos tratamentos descritos acima. Amostras adicionais foram retiradas de um campo de plantio direto de milho e de vegetação de Cerrado nativo como controles. As amostras utilizadas para extração de DNA foram transportadas a 4°C o até o laboratório, onde foram peneiradas para remover os restos vegetais e armazenadas a -20°C até a extração do DNA.

2.2. Coloração e avaliação de FMA nas raízes

Raízes individuais de cada genótipo foram separadas aleatoriamente, cortadas em fragmentos de 1 cm de comprimento e clarificadas com KOH 5% (m/v) por uma hora, seguida pela acidificação com HCl 1% (v/v) durante a noite. Após a coloração com azul de tripan 0,05% (m/v) em lactoglicerol ácido por 20 minutos, uma centena de fragmentos de raízes de cada amostra foi analisada para a presença de micélios de FMA sob lupa. A porcentagem de colonização foi avaliada utilizando o método de intersecção de linha de grade descrito por Giovannetti e Mosse (1980).

2.3. Isolamento e contagem de esporos

Esporos de fungos micorrízicos arbusculares foram extraídos de amostras de solo rizosférico de cada genótipo, em triplicata, a partir 100 g de solo rizosférico, por centrifugação em gradiente de sacarose e coletados em peneiras de 250, 125, 63 e 32 mm de malha, de acordo com a metodologia

descrita por Clapp et al. (1996).

2.4. Extração de DNA total da comunidade e de esporos

O DNA foi extraído a partir de 500 mg de solo rizosférico de uma amostra composta por três repetições, utilizando o protocolo descrito no kit de extração de DNA do solo (FastDNA SPIN kit for soil, Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA). DNA dos esporos de *Acaulospora morrowiae*, *A. serobienta*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Gl. etunicatum* e *Scutellospora sp.* foi usado como controle em todos os géis de gradientes desnaturantes (DGGE). DNA dos esporos foi extraído diretamente dos esporos em culturas armadilha utilizando o FastDNA kit SPIN, de acordo com o protocolo modificado descrito por Chellius e Triplett (1999).

2.5. Condições de PCR

A amplificação de fragmentos do gene 18S ribossomal de FMA foi realizada por uma reação de nested PCR utilizando os primers universais de fungos, NS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990) na primeira etapa e os primers ACAU1660 e GLOM1310 (REDECKER et al., 2000), específicos das famílias Acaulosporaceae e Glomaceae, respectivamente, na segunda etapa. Para o DGGE, um grampo de CG foi anexado aos primers ACAU1660 e GLOM1310 (MUYZER; SMALLA, 1998). Reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μ L com 50 μ M de cada dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1% (v/v) formamida, 0,2 μ M de cada primer, 20 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As condições de PCR foram: 95 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos para a primeira etapa e 25 ciclos de segunda etapa a 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 35 segundos, 72 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corado com brometo de etídio (1 g mL⁻¹) e as imagens

visualizadas e capturadas em um fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) sob luz UV.

2.6. Análise de produtos de PCR por DGGE

A análise por DGGE foi realizada utilizando DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Um volume de 20 μ L da reação de PCR foi aplicada em gel de poli(acrilamida em tampão TAE 1X (20 mM tris-acetato [pH 7,4], 10 mM de acetato de sódio, 0,5 mM EDTA dissódico). Os gradientes de desnaturação foram de 35-60% para ACAU1660/ITS2 e 25-50% para GLOM1310/ITS2. Estes gradientes foram formados com 6% (m/v) de solução estoque de acrilamida contendo entre 0 e 100% de desnaturantes [7 M uréia e 40% (v/v) formamida deionizada]. Os fragmentos foram separados por eletroforese a 75 V por 16 horas em tampão TAE 0,50 X a uma temperatura constante de 60 °C. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001) e as imagens foram captadas digitalmente por uma câmera digital Nikon.

2.7. Sequenciamento dos fragmentos purificados do gel de DGGE e alinhamento das sequências

Os fragmentos de DNA amplificados foram recuperados utilizando um segundo gel de DGGE preparado nas mesmas condições, porém corado com brometo de etídio. As bandas de DNA mais proeminentes foram eluídas do gel e utilizadas como molde para uma reação de PCR adicional nas mesmas condições. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5% (m/v), purificados usando "QiaQuick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados com o kit "Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems). Os dados da sequência de nucleotídeos foram comparados com sequências

depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa Blast N (ALTSCHUL et al., 1997).

2.8. Análise dos dados

Os valores de porcentagem de colonização radicular e contagem de esporos foram transformados utilizando arco seno antes da análise fatorial de variância (ANOVA) entre as cultivares de milho e os níveis de fósforo. Teste Tukey a 5% de significância foi aplicado para comparação de médias, quando apropriado.

Os padrões de bandejamento de DGGE foram avaliados por análise de agrupamento e as diferenças entre os perfis das comunidades de FMA foram visualizadas em um dendrograma construído pelo método de UPGMA (unweighted pair group with mathematical average method) utilizando o programa Statistica versão 6,0.

3. Resultados

3.1. Colonização micorrízica e número de esporos

A presença de fungos micorrízicos nativos nos solos avaliados variou entre os genótipos de milho e os níveis de P (Figuras 1A e 1B). Os genótipos eficientes apresentaram maior taxa de colonização micorrízica em comparação com os ineficientes para ambos os níveis de P no solo. A linhagem eficiente L3, sob estresse de P, apresentou um aumento na infecção por FMA de cerca de 20% quando comparado com o solo com alto P.

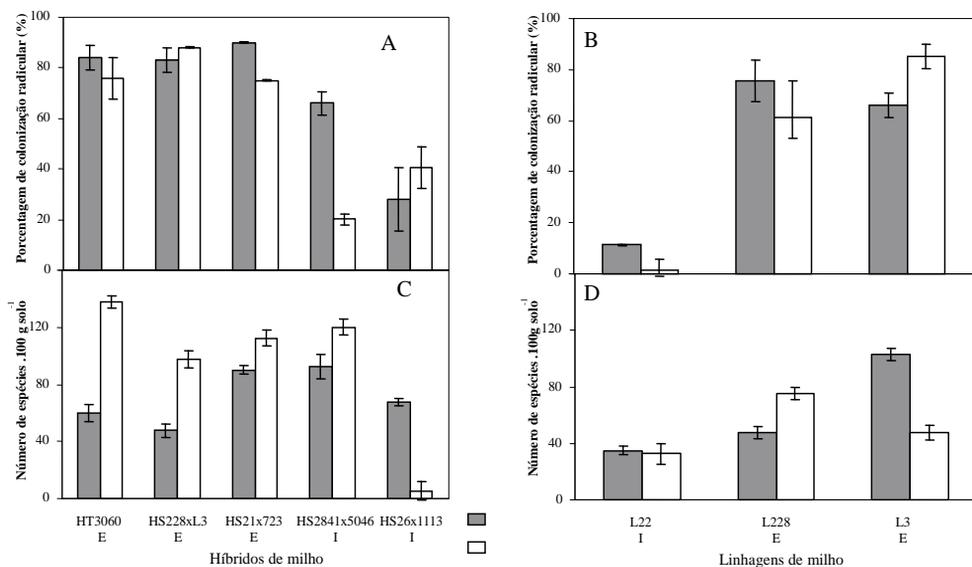


Figura 1. Colonização de raízes de milho cultivado sob baixo (3 mg kg⁻¹) e alto (29 mg kg⁻¹) teor de P no solo por fungos micorrízicos arbusculares. Cada coluna de dados representa uma média de três repetições; barras de erro representam o erro padrão no nível de 5%. As letras E e I referem-se a genótipos eficientes e ineficientes, respectivamente

O número de esporos de FMA presentes na rizosfera também variou entre os diferentes genótipos de milho e os níveis de P (Figuras 1C e 1D). Para os híbridos, o número de esporos foi maior nos solos de baixo P, exceto para o híbrido ineficiente HS26x1113 (Figura 1C). No entanto, para a linhagem L3, o número total de esporos foi superior nos solos com alto P, em comparação com os solos com baixo P (Figura 1D).

3.2. DGGE das famílias Acaulosporaceae e Glomaceae

Os primers ACAU1660/ITS2 e GLOM1310/ITS2 amplificaram produtos de PCR com o tamanho esperado de 445 e 645 pares de bases, respectivamente. Os fragmentos de rDNA amplificados por PCR das famílias Acaulosporaceae e Glomaceae diferenciaram todas as amostras da rizosfera (Figuras 2 e 3), sendo comum a presença de bandas múltiplas, indicando a presença de variabilidade de ribotipo nos solos rizosféricos examinados.

O padrão de bandas de DGGE específico para Acaulosporaceae da rizosfera de híbridos de milho revelou um grupo maior com a maioria dos híbridos eficiente em uma distância genética de 0,26, exceto para o HT3060, sob baixo P (Figura 2A). Além disso, os dois híbridos ineficientes ficaram em grupos diferentes, dependendo do nível de P no solo, ambos a uma distância genética de 0,21.

Um maior número de bandas de Acaulosporaceae foi observado entre as linhagens de milho, mas sem um fator discriminatório claro na análise de agrupamento (Figura 2B). Contudo, sob baixo P, tanto as amostras do bulk do solo quanto da linhagem L22 foram agrupadas em uma distância genética de 0,06, apoiada por um bootstrap de 90%, indicando que L22, provavelmente, não influenciou a comunidade de FMA. A amostra com o padrão de bandas mais distinto foi Acaulosporaceae de Cerrado nativo, sugerindo que o cultivo do milho afetou a comunidade de fungos micorrízicos dessa família. Além disso, as amostras do sistema de plantio direto foram agrupadas em 0,11 de distância genética com um apoio de bootstrap de 87%, diferentemente das amostras da rizosfera do plantio convencional.

As análises das sequências de DNA não confirmaram a especificidade dos primers da família Acaulosporaceae, uma vez que espécies do filo Ascomycota e da família Glomaceae foram também identificadas (Tabela 1).

Algumas espécies de *Acaulospora scrobiculata*, *A. morrowiae*, *A. rugosa* e *A. longula* foram encontradas na rizosfera dos genótipos de milho P eficientes, L3 e HT3060, em baixo P (Figura 2 e Tabela 1). A banda 8 da Figura 2 foi encontrada na rizosfera da maioria dos híbridos, mas sua sequência de DNA não se alinhou com qualquer sequência depositada no GenBank, indicando que ela pertence a uma espécie desconhecida. Bandas de diferentes tamanhos visualizadas em algumas linhas de DGGE foram identificadas como pertencentes à mesma espécie, como as bandas

Tabela 1. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares presentes na rizosfera de milho identificadas no gel de DGGE

Banda DGGE ¹	Espécies		
	Microrganismos ² (% similaridade)	Grupo filogenético	Acesso Genbank
Acaulosporaceae			
1	<i>Acaulospora scrobiculata</i> (88%)	<i>Acaulosporaceae</i>	AJ306442
2	<i>A. morrowiae</i> (88%)	<i>Acaulosporaceae</i>	AJ242500
3	<i>Glomus intraradices</i> (94%)	<i>Glomaceae</i>	AF185692
4	<i>G. intraradices</i> (97%)	<i>Glomaceae</i>	AF185692
5	<i>Glomus</i> sp. 0191 (98%)	<i>Glomaceae</i>	AY174693
6	<i>A. rugosa</i> (93%)	<i>Acaulosporaceae</i>	AZ14005
7	<i>Ajellomyces capsulatus</i> ² (100%)	<i>Ajellomycetaceae</i>	AF322387
8	Clone de solo	-	
9	<i>Archaeospora</i> sp. (93%)	<i>Archaeosporaceae</i>	AF452636
10	<i>A. longula</i> (89%)	<i>Acaulosporaceae</i>	AJ306439
11	<i>Archaeospora</i> sp. (94%)	<i>Archaeosporaceae</i>	AF452636
12	<i>G. intraradices</i> (100%)	<i>Glomaceae</i>	AF185692
13	<i>Archaeospora</i> sp. (94%)	<i>Archaeosporaceae</i>	AY174699
14	<i>G. intraradices</i> (96%)	<i>Glomaceae</i>	AF185692
15	<i>Glomus</i> sp. (98%)	<i>Glomaceae</i>	AF452626
16	<i>A. morrowiae</i> (88%)	<i>Acaulosporaceae</i>	AJ242500
Glomaceae			
17	<i>Glomus caledonium</i> (98%)	<i>Glomaceae</i>	GCA17653
18	<i>Glomus mosseae</i> (91%)	<i>Glomaceae</i>	GMSUSMA
19	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (94%)	<i>Glomaceae</i>	AY174691.1
20	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (98%)	<i>Glomaceae</i>	GMA301857
21	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (96%)	<i>Glomaceae</i>	AY174691.1
22	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (96%)	<i>Glomaceae</i>	GMA301857
23	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (95%)	<i>Glomaceae</i>	AY174691.1
24	<i>G. coremioides</i> (95%)	<i>Glomaceae</i>	SCO249715
25	<i>G. coremioides</i> (96%)	<i>Glomaceae</i>	SCO249715
26	<i>G. coremioides</i> (98%)	<i>Glomaceae</i>	SCO249715
27	<i>Glomus</i> sp. 5014b25 (90%)	<i>Glomaceae</i>	AF480158.1
28	<i>G. manihotis</i> (93%)	<i>Glomaceae</i>	GMA17648
29	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (96%)	<i>Glomaceae</i>	AY174691.1
30	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (92%)	<i>Glomaceae</i>	GMA301857
31	<i>Glomus</i> sp. 5014b24 (93%)	<i>Glomaceae</i>	AF480157.1
32	<i>G. mosseae</i> (98%)	<i>Glomaceae</i>	GMSUSMA
33	<i>Glomus</i> sp. 5014b25 (93%)	<i>Glomaceae</i>	AF480157.1
34	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (95%)	<i>Glomaceae</i>	AY174691.1

¹ Identificação das bandas de DGGE segundo as Figuras 2, 3 e 4 ² Espécie da ordem Ascomycota

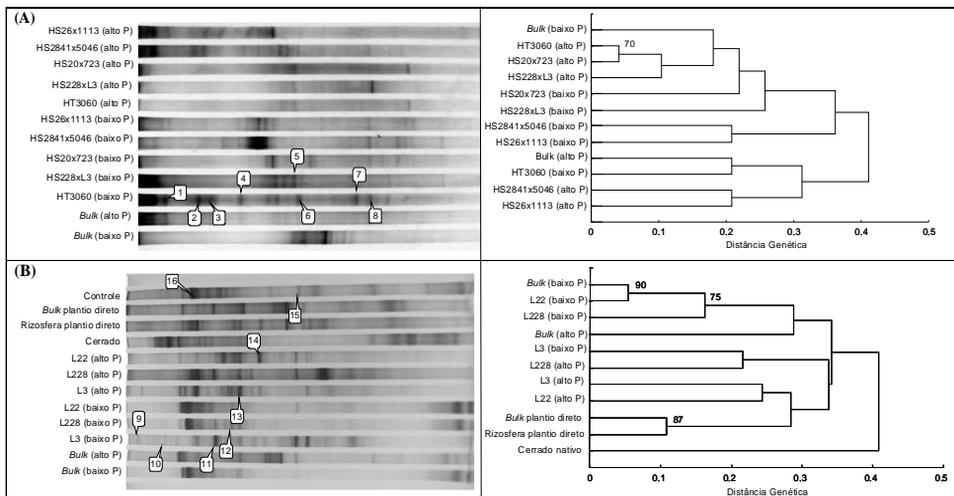


Figura 2. Gel de PCR-DGGE mostrando o padrão de bandas obtido para a família Acaulosporaceae, de fungos micorrízicos arbusculares, do solo rizosférico e respectivos dendrogramas de híbridos (A) e linhagens de milho (B). Controle: produtos de PCR de esporos de *Acaulospora morrowiae* e *A. serobienta*. Os números indicam as bandas identificadas na Tabela 1. Análises de bootstrap foram feitas com 10.000 repetições

Análise da Diversidade Micorrízica na Rizosfera de Genótipos de Milho (*Zea mays L.*) Contrastantes para Eficiência no Uso de P Utilizando Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

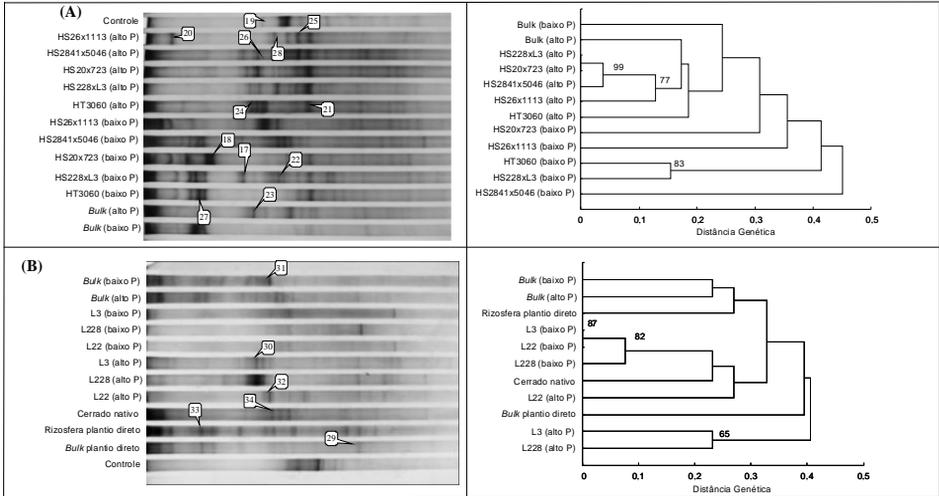


Figura 3. Gel de PCR-DGGE mostrando o padrão de bandas obtido para a família Glomaceae, de fungos micorrízicos arbusculares, do solo rizosférico e respectivos dendrogramas de híbridos (A) e linhagens de milho (B). Controle: produtos de PCR de esporos de *Glomus clarum* e *G. etunicatum*. Os números indicam as bandas identificadas na Tabela 1. Análises de bootstrap foram feitas com 10.000 repetições

3 e 4, que correspondem a *G. intraradices* (Tabela 1, Figura 2).

O dendrograma baseado no padrão de bandas de DGGE específico de Glomaceae gerou um grupo a uma distância genética de 0,18, que incluiu híbridos eficientes e ineficientes cultivados em solos com alto P (Figura 3A). No entanto, nos solos com baixo P, não foram agrupados, exceto os dois híbridos eficientes (HT3060 e HS228xL3) que formaram um agrupamento, com valor de bootstrap de 83%. O maior grupo de bandas de DGGE específicas de *Glomus* foi observado na rizosfera de híbridos de milho em solos de baixo P. As populações de FMA de dois diferentes híbridos eficientes, em baixo P, (HT3060 e HS228xL3) foram agrupadas em uma distância genética de 0,16 (bootstrap 83%) (Figura 3B), em contraste com os híbridos ineficientes a P.

A disponibilidade de P no solo parece ser um possível fator de agrupamento das populações de Glomaceae da rizosfera das linhagens de milho, que foram agrupadas a uma distância genética de 0,08 em baixo P e apoiadas por um bootstrap de 82% (Figura 3B). As linhagens eficientes L228 e L3 no solo de alto P também foram agrupadas a uma distância genética de 0,23 (bootstrap 65%). Além disso, os perfis da rizosfera obtidos em solos de alto P mostraram bandas exclusivas que não foram visualizadas em solos de baixo P (bandas 30 e 32, Figura 3B).

A análise da sequência de DNA (Tabela 1) confirmou as identidades de todos os fragmentos de DGGE de Glomaceae como pertencentes ao gênero *Glomus*, com algumas bandas exclusivamente presentes na rizosfera dos genótipos de milho eficientes (Figura 3), tais como *G. caledonium* em HS228xL3 (baixo P). No entanto, a similaridade de algumas sequências não foi suficientemente alta (91%) para confirmar as espécies, como demonstrado na Tabela 1 para *G. mosseae*.

4. Discussão

O resultado do PCR-DGGE das famílias Acaulosporaceae e Glomaceae da rizosfera dos genótipos de milho, juntamente com a análise visual da colonização de FMA, mostrou que tanto os genótipos de milho quanto o nível de P no solo influenciaram a densidade da população total (número de esporos e colonização das raízes), bem como as espécies de FMA (bandas de DGGE).

Poucas diferenças foram encontradas na densidade de esporos entre os genótipos eficientes e ineficientes a P avaliados. Em contrapartida, os perfis de PCR-DGGE de Acaulosporaceae e Glomaceae mostraram bandas exclusivas, encontradas apenas nos genótipos eficientes em baixo P. Em geral, estes resultados mostraram que a colonização micorrízica das raízes e os perfis de DGGE da maioria dos genótipos de milho eficientes foram diferentes dos genótipos ineficientes, sugerindo que o nível de eficiência dos genótipos de milho a P pode ser influenciado pela comunidade de FMA na rizosfera. As diferenças na ocorrência de espécies de FMA podem depender da exsudação radicular dos genótipos de milho sob estresse de P. Segundo Lynch e Whipps (1990), Marschner (1998) e Barea et al. (2005b), os exsudatos das raízes são determinantes da diversidade de microrganismos na rizosfera. Plantas cultivadas em solos com deficiência de P podem exsudar substâncias funcionais, tais como ácidos orgânicos, ácido jasmônico, fosfatases e compostos fenólicos, que podem estimular a colonização e o crescimento da micorriza (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1989; SIQUEIRA et al., 1991; MARSCHNER, 1998; LAMBAIS, 2000; HINSINGER, 2001; KOIDE; MOSSE, 2004) e influenciar a especificidade FMA-hospedeiro.

Variabilidade na resposta micorrízica entre diferentes cultivares de milho também foi observada por Kaepler et al. (2000) e Wright et al. (2005). Além disso, outros autores mostraram aumento da produtividade de milho com a colonização micorrízica (CLARK; ZETO, 1996; KAEPLER et al.,

2000; WRIGHT et al., 2005), além do efeito do genótipo e/ou tipo de solo sobre as comunidades de bactérias e fungos (GOMES et al., 2001, 2003; MOTA et al., 2002). Este é o primeiro relato da diversidade e estrutura da comunidade de FMA nos solos do Cerrado com esses genótipos de milho contrastantes para eficiência a P. O entendimento dos mecanismos de aquisição de P pode ser útil no delineamento de estratégias em programas de melhoramento de milho para a seleção de genótipos que favoreçam maiores populações de FMA (ALVES et al., 1999; PICARD et al., 2008). Além disso, estudos de caracterização da composição da comunidade de FMA, incluindo genes que controlam mecanismos de sinalização dos hospedeiros, são necessários.

O PCR-DGGE específico de Acaulosporaceae foi eficiente na diferenciação de populações de FMA nas amostras de rizosfera de milho avaliadas neste estudo. No entanto, a análise da sequência de DNA não confirmou a identidade de algumas bandas, sendo identificadas espécies de outros grupos de fungos e outras famílias de Glomeromycota.

As populações das famílias micorrízicas estudadas foram afetadas pelo sistema de cultivo. Efetivas diferenças foram encontradas entre plantio convencional e plantio direto, formando grupos separados por perfis de DGGE de Acaulosporaceae e Glomaceae. Além disso, bandas específicas (33 na Figura 3B, por exemplo) foram obtidas do sistema de plantio direto para todas as famílias avaliadas. Maiores populações micorrízicas em milho no sistema plantio direto foram também encontrados por Jansa et al. (2003). Kabir (2005) avaliou a densidade de hifas de FMA e os teores de nutrientes em milho cultivado sob plantio direto e convencional por 11 anos e verificou que o comprimento e densidade das hifas na rizosfera de milho foram maiores no plantio direto. Essas diferenças nas comunidades de FMAs que colonizam raízes de milho no plantio direto e no convencional podem ser devidas a: (1) rompimento das hifas causado pelo trato convencional, (2) mudanças no conteúdo de matéria orgânica e nutrientes do solo, (3) mudanças na atividade microbiana e/ou (4) mudanças em populações de plantas daninhas em resposta ao sistema de preparo do

solo. Espécies de FMA diferem na sua eficiência simbiótica (SMITH et al., 2003) e, assim, quaisquer mudanças induzidas na estrutura da comunidade de FMA podem levar a mudanças na absorção de nutrientes e/ou na produtividade das culturas. Perfis genéticos de DGGE baseados nos fragmentos de rDNA amplificados foram eficazes no estudo de estruturas das comunidades micorrízicas na rizosfera de milho. Esta análise foi apoiada pelo sequenciamento de DNA, pela visualização da colonização micorrízica e pela contagem de esporos. Estes resultados mostram claramente que os genótipos de milho e o nível de P no solo podem influenciar as populações micorrízicas, indicando que alguns grupos de FMA podem ser favorecidos por genótipos de milho eficientes.

Compreender a estrutura da comunidade de FMA nativos no sistema radicular das culturas é um pré-requisito para um manejo efetivo em sistemas agrícolas sustentáveis, principalmente em solos ácidos com baixo P, normalmente encontrados no Cerrado brasileiro. A produtividade do milho pode depender da eficiência simbiótica da colonização micorrízica e da cultivar de milho. O uso e compreensão do controle genético da exsudação de compostos de sinalização de micorrizas pela planta hospedeira e a utilização destes compostos (metabólitos) podem ser úteis ao manejo das populações de FMA nativos.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela Embrapa Milho e Sorgo e Fundação McKnight. C.A. Oliveira agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado. Agradecimentos à equipe de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo pelo fornecimento dos genótipos contrastantes.

Referências

ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 35, p. 121-150, 1991.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAEFFER, A. A. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, V. M. C.; MAGALHÃES, J. V.; NOVAIS, R. F.; BAHIA FILHO, A. F. C.; OLIVEIRA, C. A.; FRANÇA, C. C. M. Acúmulo de nitrogênio e de fósforo em plantas de milho afetado pelo suprimento parcial de fósforo às raízes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, p. 299-305, 1999.

BAON, J. B.; SMITH, S. E.; ALSTON, A. M.; WHEELER, R. D. Phosphorus efficiency of three cereals as related to indigenous mycorrhizal infection. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 43, p. 479-491, 1992.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: BUSCOT, F.; VARMA, S. (Ed.). **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005a. p. 195-212.

BAREA, J. M.; WERNER, D.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbioses in sustainable agriculture. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Agriculture, forestry, ecology and the environment**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005b. p. 199-222.

BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C. C. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 37, n. 4, p. 509-517, 2002.

CARDOSO, I. M.; KUYPER, T. W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 116, p. 72-84, 2006.

CHELLIUS, K. M.; TRIPLETT, E. W. Rapid detection of arbuscular mycorrhiza in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 9, p. 61-64, 1999.

CLAPP, J. P.; FITTER, A. H.; MERRYWEATHER, J. W. Arbuscular mycorrhizas. In: HALL, G. S. (Ed.). **Methods for the examination of organismal diversity in soils and sediments**. New York: CAB International, 1996. p. 145-161.

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, p. 1505-1511, 1996.

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

GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J. M.; HASELWANDTER, K. (Ed.). **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Basel: Birkhäuser Verlag, 2002. 296 p.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 7, p. 243-255, 1989.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford,

v. 84, p. 489-500, 1980.

GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3758-3766, 2003.

GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

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

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 173-195, 2001.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; KUHN, G.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I. R.; FROSSARD, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. **Ecological Applications**, Tempe, v. 13, 1164-1176, 2003.

KABIR, Z. Tillage or no-tillage: impact on mycorrhizae. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 85, p. 23-29, 2005.

KAEPLER, S. M.; PARKE, J. L.; MUELLER, S. M.; SENIOR, L.; STUBER, C.; TRACY, W. F. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal colonization. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 358-364, 2000.

KELLY, V. A.; MPYISI, E.; MUREKEZI, A.; NEVEN, D. **Fertilizer**

consumption in Rwanda: past trends, future potential, and determinants. 2001. Disponível em: <<http://www.aec.msu.edu/fs2/rwanda/fertilizerconsumption.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2009.

KOIDE, R. T.; MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, v. 14, p. 145-163, 2004.

KOIDE, R. T. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 147, p. 233-235, 2000.

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

LAMBAIS, M. R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G. K.; DOUDS, D. D. (Ed.). **Current advances in mycorrhizae research**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. p. 46-60.

LIU, J. Y.; BLAYLOCK, L. A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C. D.; VANDENBOSCH, K. A.; HARRISON, M. J. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2106-2123, 2003.

LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, The Hague, v. 129, p. 1-10, 1990.

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. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London:

Academic Press, 1995. 889 p.

MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, 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 Poacea genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.

MOTA, F. F.; NÓBREGA, A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes planted in Cerrado soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 20, p. 119-132, 2002.

MUYZER, G.; SMALLA, K. The need for DGGE and TGGE in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Delft, v. 73, p. 127-141, 1998.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

NURLAENY, N.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 181, p. 275-285, 1996.

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**, Cambridge, v. 160, p. 581-593, 2003.

PARENTONI, S. N.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 893-901, 2008.

PICARD, C.; BARUFFA, E.; BOSCO, M. Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 106-115, 2008.

PLENCHETTE, C.; FORTIN, J. A.; FURLAN, V. Growth response of several plants species to mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 70, p. 191-209, 1983.

RAJU, P. S.; CLARK, R. B.; ELLIS, J. R.; DUNCAN, R. R.; MARANVILLE, J. W. Benefit and cost analysis and phosphorus efficiency of VA mycorrhizal fungi colonizations with sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes grown at varied phosphorus levels. **Plant and Soil**, The Hague, v. 124, p. 199-204, 1990.

REDECKER, D.; MORTON, J. B.; BRUNS, T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 14, p. 276-284, 2000.

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. 54, p. 2908-2915, 1992.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 10, p. 63-121, 1991.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STURMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, p. 12-21, 2002.

SMITH, S. E.; SMITH, A. F.; JAKOBSEN, I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 133, p. 16-20, 2003.

SOUZA, F. A. de; KOWALCHUK, G. A.; 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1413-1424, 2004.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; KLIRONOMOS, J. N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

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.

WRIGHT, D. P.; SCHOLE, J. D.; READ, D. J.; STEPHEN, A. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, p. 881-896, 2005.