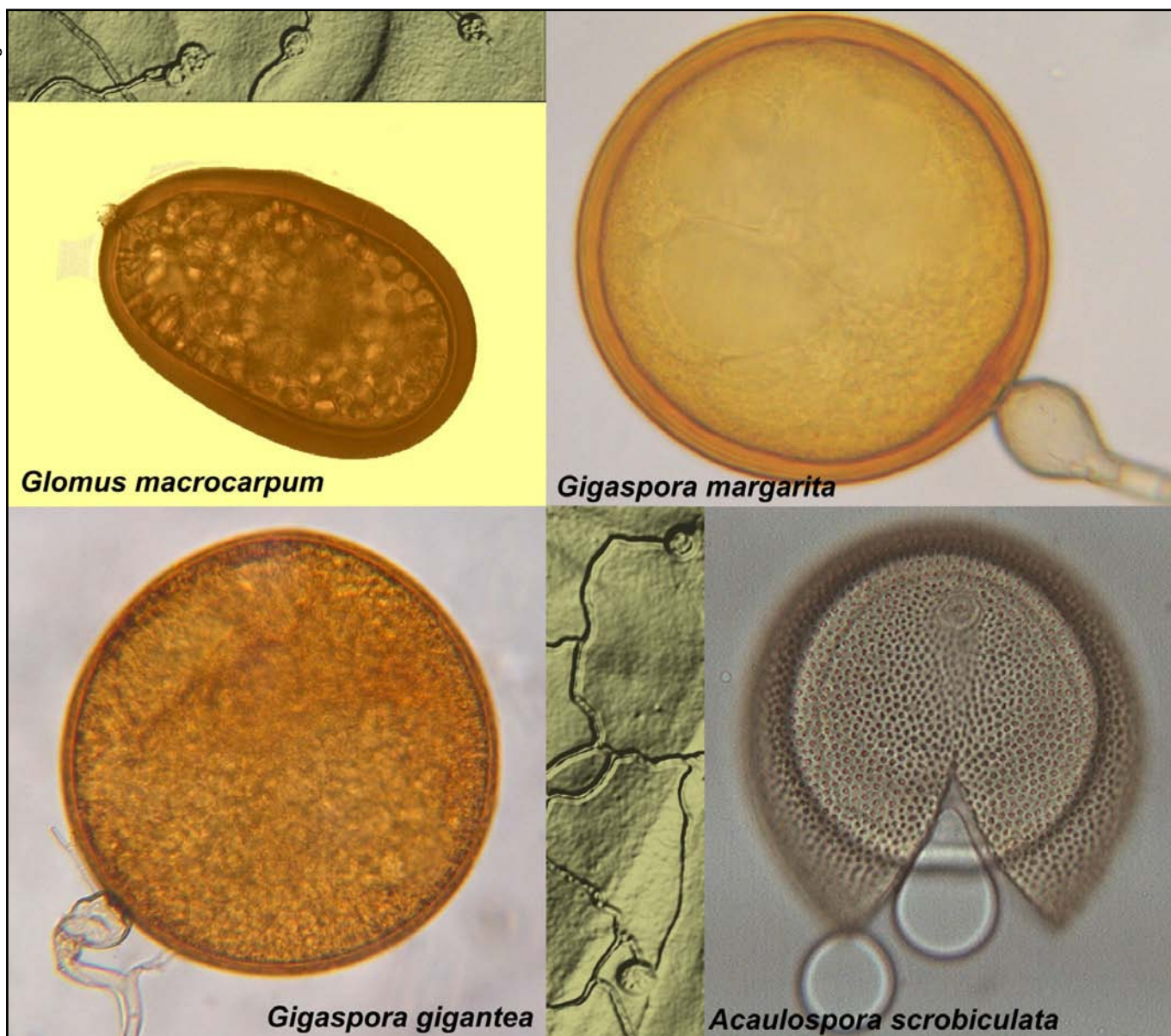


Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Micorrízicos Arbusculares

Fotos: Itamar Garcia Ignácio



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

334 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

290 *Embrapa Agrobiologia
ISSN 1517-8498*

76 *Embrapa Amapá
ISSN 1517-4859*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Micorrízicos Arbusculares

Orivaldo José Saggin Júnior
Wardsson Lustrino Borges
Cândido Barreto de Novais
Eliane Maria Ribeiro da Silva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Fotos da capa: Itamar Garcia Ignácio

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Micorrízicos Arbusculares. / Orivaldo José Saggin Júnior, Wardsson Lustrino Borges, Cândido Barreto de Novais e Eliane Maria Ribeiro da Silva. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

23 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 334; Documentos / Embrapa Agrobiologia, 290; Documentos / Embrapa Amapá, 76).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Fungos Micorrízicos Arbusculares. I. Saggin Júnior, Orivaldo José. II. Borges, Wardsson Lustrino. III. Novais, Cândido Barreto de. IV. Silva, Eliane Maria Ribeiro da. V. Título. VI. Série.

576.15 - CDD

© Embrapa 2011

Autores

Orivaldo José Saggin Júnior

Ph.D. em Ciências do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia
saggin@cnpab.embrapa.br

Wardsson Lustrino Borges

Ph.D. em Ciências do Solo, Pesquisador da Embrapa Amapá
wardsson.lustrino@cpafap.embrapa.br

Cândido Barreto de Novais

Doutorando da Universidade Federal de Lavras – UFLA
Departamento de Ciências do Solo
candidobnn@yahoo.com.br

Eliane Maria Ribeiro da Silva

Ph.D. em Ciências do Solo, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia
eliane@cnpab.embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, essa necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: “Manual de Curadores de Germoplasma”.

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Coleta de amostras	09
Isolamento	09
Estabelecimento de culturas-armadilha	09
Culturas- armadilha a partir de plantas coletadas no campo	10
Culturas-armadilha a partir de raízes ou solo coletados no campo	10
Isolamento de esporos de FMAs	12
Identificação e caracterização	14
Caracterização genotípica	14
Preservação	17
Armazenamento	17
Criopreservação	18
Dados, comprovantes e intercâmbio das linhagens	18
Dados das linhagens da Coleção	18
Identidade	18
Depósito	19
Isolamento	19
Coleta	19
Comprovantes físicos de cada repicagem das linhagens	19
Lâminas permanentes para microscopia	19
Esporos de referência	20
Fotos digitais	20
Intercâmbio das linhagens	20
Referências	21

Fungos Micorrízicos Arbusculares

Orivaldo José Saggin Júnior
Wardsson Lustrino Borges
Cândido Barreto de Novais
Eliane Maria Ribeiro da Silva

Introdução

No presente manual, estão descritos os procedimentos básicos e as principais técnicas utilizadas para coleta, isolamento, identificação, caracterização e preservação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em coleção de culturas mantidas e multiplicadas em plantas cultivadas em casa de vegetação.

Os FMAs são fungos do solo do filo Glomeromycota (SCHÜBLER *et al.*, 2001), caracteristicamente microssimbiontes obrigatórios de plantas. Diferenciam-se de outros fungos endofíticos por apresentarem formação de arbúsculos dentro das células de raízes ou talos vegetais, hifas cenocíticas (ou às vezes esparsamente septadas) e esporos grandes (40-800 μM), com várias paredes em camadas contendo algumas dezenas de milhares de núcleos. Os arbúsculos são semelhantes a haustórios; entretanto, não rompem o citoplasma e têm duração efêmera na vida celular, o que caracteriza uma simbiose não patogênica ao vegetal.

Os FMAs formam o tipo mais comum de micorriza na natureza, simbiose esta que teve origem quando as primeiras plantas colonizaram o ambiente terrestre, há pelo menos 460 milhões de anos (REDECKER *et al.*, 2000), sendo onipresentes em ecossistemas terrestres, embora raras em ambientes com grande e longa cobertura de neve ou gelo.

Atualmente, o filo Glomeromycota é um dos sete filos descritos no reino Fungi, possuindo em torno de 200 espécies descritas. Porém, essas espécies mostram uma enorme variabilidade e adaptação aos mais diferentes solos e plantas do planeta, apresentando uma biodiversidade praticamente desconhecida, e com grande importância para ser preservada em coleção por seu potencial biotecnológico.

Historicamente, a maioria das espécies desse filo foi descrita pela morfologia de seus esporos. Entretanto, uma mesma espécie de FMA pode apresentar diferentes morfotipos de esporos (MORTON *et al.*, 1997) e nem sempre a semelhança morfológica dos esporos indica a filogenia verdadeira acessada por métodos moleculares (SCHÜBLER; WALKER, 2010). Porém, independentemente das grandes discussões taxonômicas que estão ocorrendo sobre esse filo de fungos, a preservação de sua biodiversidade em coleção transpõe essas questões e se torna necessária para fornecer material visando ao avanço das pesquisas.

Dessa forma, o objetivo deste manual é fornecer informações básicas de procedimentos a serem adotados para a manutenção de coleções de fungos micorrízicos arbusculares, a fim

de dar suporte a curadores dentro do Sistema de Curadoria da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

Coleta de amostras

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem ser isolados tanto de solo quanto de raízes colonizadas. Assim, em campo, podem ser coletadas amostras de solo da região das raízes (aqui denominado de solo rizosférico), de raízes ou plantas que suportem o transplante para vasos. A época de coleta depende do objetivo e planejamento do estudo; entretanto, é preferível realizar a coleta em épocas de máxima atividade radicular, como na floração das culturas anuais ou em estações de crescimento das perenes. As amostras devem ser retiradas na profundidade em que se encontra a maior quantidade de raízes crescendo.

Ao coletar, deve-se fazer anotações em uma caderneta de campo. É essencial para a coleta de FMAs em campo a tomada da georeferência do local amostrado, a coleta de solo suficiente para a caracterização química da fertilidade e a anotação da planta hospedeira amostrada. Caso seja uma planta desconhecida, faz-se necessária a coleta de exsicata para posterior identificação. Esses são os dados mais importantes para um “passaporte” de FMAs em coleções. Outras informações necessárias ao “passaporte” são: responsável pela coleta; data da coleta; país, estado, município, localidade e local detalhado da coleta; histórico da área; e classificação do solo, clima e bioma.

Para o transporte das amostras, embora a refrigeração aumente a conservação, ela não é necessária para garantir que o solo rizosférico e as raízes cheguem ao laboratório em condições ideais para o isolamento. Entretanto, as amostras devem ser protegidas do sol intenso no campo e durante o transporte. Para o transporte, utilizam-se sacos plásticos ou vidros com tampa, devidamente identificados com marcador permanente ou lápis, em dois locais, pois as identificações podem ser apagadas ou perdidas.

Quando o material coletado (solo rizosférico, raízes ou plantas) chega ao laboratório da coleção, as amostras devem ser registradas dentro do sistema de qualidade adotado e armazenadas sob refrigeração, em geladeira, a 5°C. Devem ser estabelecidas culturas-armadilha com as amostras de raízes e plantas num período máximo de 48 horas.

Isolamento

Esporos de FMAs podem ser isolados diretamente de solo coletado no campo ou de substrato de vasos de culturas-armadilha estabelecidas a partir de solo, raízes ou plantas coletadas em campo. Dentro da coleção da Embrapa Agrobiologia, o sucesso do isolamento a partir de substrato de culturas-armadilha é maior do que o isolamento direto de solo proveniente do campo.

Estabelecimento de culturas-armadilha

Culturas-armadilha de FMAs são necessárias a fim de se obter esporos para o isolamento a partir de amostras de plantas, raízes ou mesmo de solo com pequenas quantidades de propágulos. As culturas-armadilha apresentam resultados muito diferentes, dependendo da combinação solo-ambiente-fungo-plantas a que estão submetidas, a qual interfere no

estabelecimento e no funcionamento da simbiose micorrízica. Uma cultura-armadilha ocasiona mudança das condições em que a simbiose encontrava-se no campo, mudando um ou mais dos seguintes fatores: planta hospedeira, solo, microbiota acompanhante, temperatura, umidade e insolação. Assim, mesmo quando a riqueza de espécies de FMAs for alta na amostra, poucos fungos autóctones esporulam com um ciclo de cultivo em cultura-armadilha. Em geral, somente as espécies mais agressivas e com maior plasticidade de adaptação ambiental acabam esporulando, o que muitas vezes resulta em culturas com apenas uma espécie de fungo (culturas monoespecíficas). Dessa forma, algumas espécies de FMAs são frequentemente obtidas em culturas-armadilha e outras raramente são obtidas. Para minorar esse problema, pode-se utilizar a técnica de diluição em série do inóculo dos vasos-armadilha (CAPRONI *et al.*, 2003), que fornece maior oportunidade para a multiplicação de espécies raras ou pouco competitivas.

A metodologia básica de montagem de culturas-armadilha baseia-se no cultivo em vasos plásticos. Recomendam-se vasos com capacidade de mais de 500 mL de substrato para não haver limitação precoce do crescimento radicular, evitando competição entre espécies de fungos por espaço de colonização das raízes.

Como substrato, pode-se utilizar o mesmo solo coletado no campo, quando o material é coletado em quantidade suficiente. Entretanto, a opção mais comum é colocar o inóculo trazido do campo (solo, raízes ou planta) em um substrato esterilizado. Recomenda-se como substrato uma mistura de solo argiloso:areia grossa:solo orgânico (1:1:1), que deve ser autoclavada durante 1 hora por dois dias consecutivos. A essa mistura pode-se acrescentar alguns corretivos, como calcário ou matéria orgânica, para tornar o substrato mais próximo das condições do solo do local da coleta. Sempre que possível, no preparo do substrato deve-se utilizar solo similar ao do local de coleta no campo.

Os vasos são cultivados principalmente com capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), mas podem ser cultivadas outras espécies de plantas hospedeiras descritas em literatura, ou, ainda, uma mistura de plantas hospedeiras para ampliar a diversidade de espécies fúngicas multiplicadas. Preferencialmente, deve-se cultivar na cultura-armadilha a planta amostrada em campo.

Culturas-armadilha a partir de plantas coletadas no campo

Plantas coletadas inteiras no campo devem ter seu sistema radicular lavado em água corrente para eliminar esporos e hifas micorrízicas que estejam aderidas, sem a colonização do córtex radicular. A seguir, as plantas com raízes nuas e lavadas devem ser transplantadas para substrato autoclavado, visando à multiplicação apenas das espécies micorrízicas que estejam colonizando as raízes.

Culturas-armadilha a partir de raízes ou solo coletados no campo

Neste caso, utilizam-se raízes ou solo como inoculantes do substrato autoclavado. Colocam-se nos vasos 2/3 do volume de solo autoclavado, e em seguida uma camada de raízes coletadas em campo, lavadas e picadas, ou uma camada de solo do campo. Coloca-se mais uma camada de substrato autoclavado para completar o volume do vaso e faz-se a semeadura das plantas hospedeiras (Figura 1).

As culturas são mantidas em laboratório ou sala de crescimento e transferidas para casa de vegetação após as plantas hospedeiras estiverem germinadas ou pegadas. As culturas são mantidas em casa de vegetação por no mínimo de 4 meses e no máximo de 24 meses.

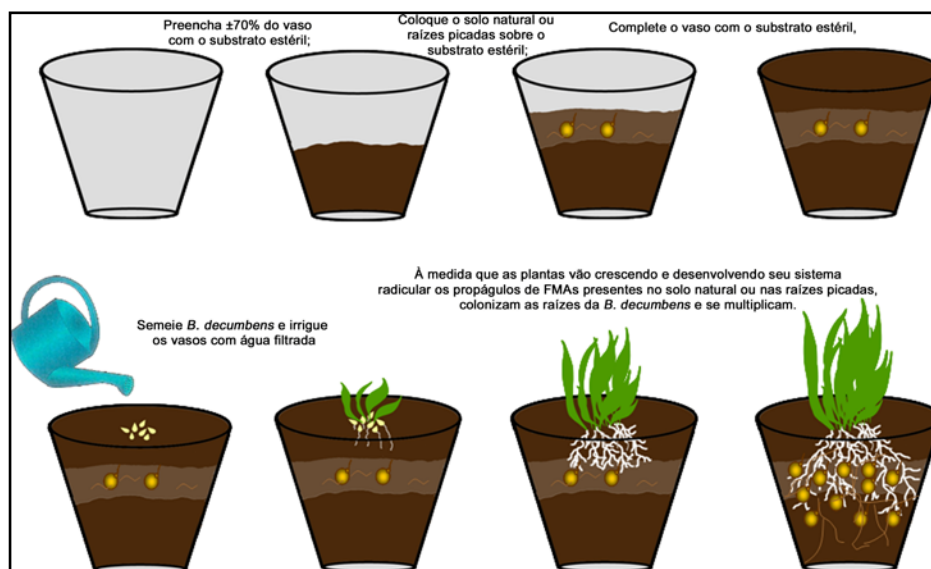


Figura 1. Plantio de culturas-armadilha de fungos micorrízicos arbusculares. Fonte: NOVAIS *et al.*, 2010.

A aplicação de fertilizantes somente é utilizada em culturas-armadilha quando as plantas mostram sinais acentuados de deficiência de fósforo (arroxeamento das folhas) ou deficiência de nitrogênio (clorose das folhas jovens). Utiliza-se solução nutritiva de Hoagland, modificada por Sylvia e Hubbell (1986), para o sistema aeropônico de multiplicação de FMAs. A concentração final de cada nutriente da solução em mg.L^{-1} é: N = 62,8; P = 0,093; K = 58,7; Ca = 60,1; Mg = 14,5; S = 19,2; Cl = 1,79; Na = 1,72; Fe = 1,60; B = 0,15; Mn = 0,15; Zn = 0,015; Cu = 0,006 e Mo = 0,0018.

Após quatro meses de cultivo, iniciam-se as avaliações das culturas-armadilha para tomar decisão sobre o momento da colheita ou do isolamento de espécies fúngicas. Culturas-armadilha com pequena ou nenhuma esporulação não devem ser descartadas caso exista colonização nas raízes da planta hospedeira. Uma ampliação da esporulação pode ser obtida por ciclos de estresse hídrico e umedecimento ou com novos ciclos de cultura no vaso. Neste último procedimento, corta-se a parte aérea das plantas hospedeiras com uma tesoura e deixa-se brotar novamente (no caso de capim braquiária ou outra planta que rebrote) ou faz-se nova semeadura de plantas que não rebrotam. Para isso, a superfície do vaso é escarificada, semeada e coberta com substrato estéril. Deve-se ter clareza que uma cultura de FMAs sem planta hospedeira fica estática, pois o fungo não se multiplica sem o fluxo de carbono fornecido pelas raízes.

Isolamento de esporos de FMAs

Isolamentos de FMAs são feitos a partir da separação de esporos de uma única espécie de fungo, diretamente de solo coletado no campo ou do substrato de vasos-armadilha cultivados conforme descrito acima.

Os esporos são extraídos do solo de campo ou do substrato de vasos-armadilha por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em gradiente de densidade, utilizando-se água e sacarose 45% (JENKINS, 1964), conforme esquematizado na Figura 2. Os esporos são transferidos na água para uma placa de Petri e observados em microscópio estereoscópico; os que têm as mesmas características morfológicas são separados. O método de separação varia com a preferência e o treinamento individual. Geralmente, utilizam-se estiletes de pontas finas (agulhas) para agrupá-los e pipetas tipo “Pasteur” para transferi-los da placa de Petri para um vidro de relógio, onde todos os esporos de mesmo morfotipo são reunidos. Opcionalmente, os esporos podem ser filtrados em papel-filtro, de onde são retirados delicadamente com uma pinça de ponta fina. A vantagem da utilização de vidro de relógio é a possibilidade de checagem adicional para separação de pedaços de hifas, que, caso sejam de outra espécie, serão fontes de contaminação.

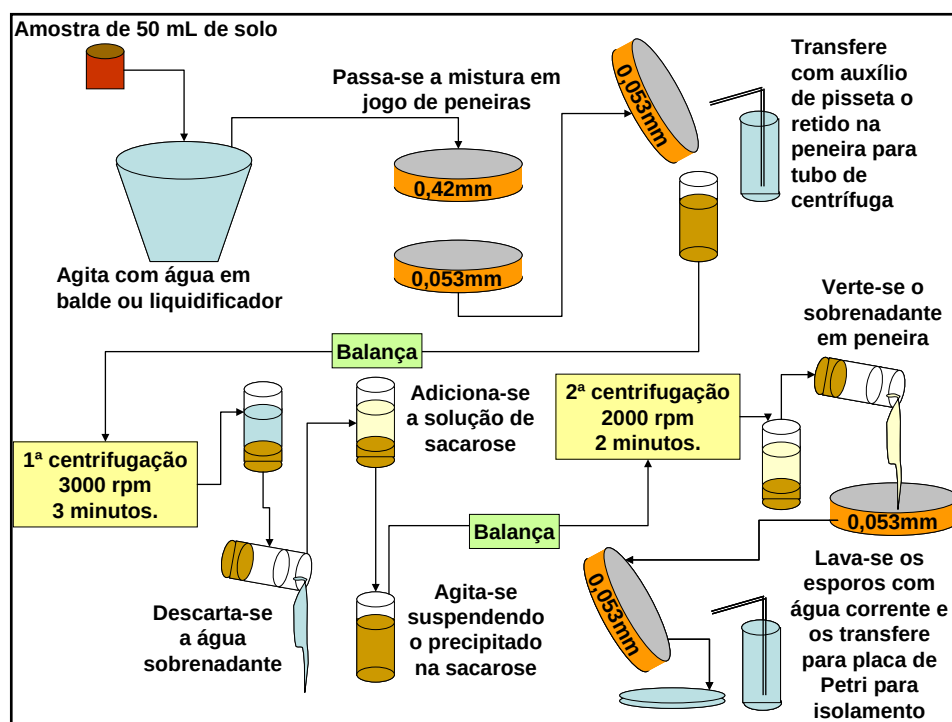


Figura 2. Ilustração dos passos a serem seguidos para a extração de esporos de uma amostra de solo. (Esquema de Orivaldo José Saggin Júnior).

A quantidade de esporos isolados para serem inoculados nas culturas monoespecíficas varia de acordo com a disponibilidade deles no solo ou no substrato, podendo variar de 1 a 100 esporos. Utiliza-se um esporo quando a espécie é rara ou se deseja alta pureza genética do isolado, obtendo-se cultura monospórica (Figura 3). No caso de coleção de germoplasma, é desejável inocular mais esporos para manter a variabilidade genética da população original coletada. Quando o número de esporos não é limitante, pode-se utilizar até 50 esporos para os gêneros *Glomus*, *Gigaspora* e *Scutellospora*, e entre 50 e 100 para os outros gêneros que podem apresentar problemas de dormência dos esporos.

Os esporos isolados nos vidros de relógio devem ser transferidos para vasos com substrato autoclavado, preferencialmente já contendo uma planta hospedeira crescendo. Para isso, cerca de 10 dias antes das culturas de isolamento monoespecíficas serem estabelecidas, é aconselhável que se coloque a planta hospedeira para germinar nos vasos. Os vasos podem ter capacidade variável de substrato. Quando se estabelecem isolamentos monospóricos (apenas um esporo), geralmente utiliza-se grande número de repetições, devido ao pouco sucesso alcançado. Neste caso, utilizam-se copos plásticos com capacidade de 100 mL de substrato como vasos. Quando for observado o sucesso da cultura monospórica, todo o volume de 100 mL de substrato pode ser transferido para um vaso de maior volume. Recomenda-se nos demais casos utilizar vasos de volume de substrato de 500 mL, o que é suficiente para se estabelecer boa cultura em coleções sem ocupar demasiado espaço e com menos trabalho.

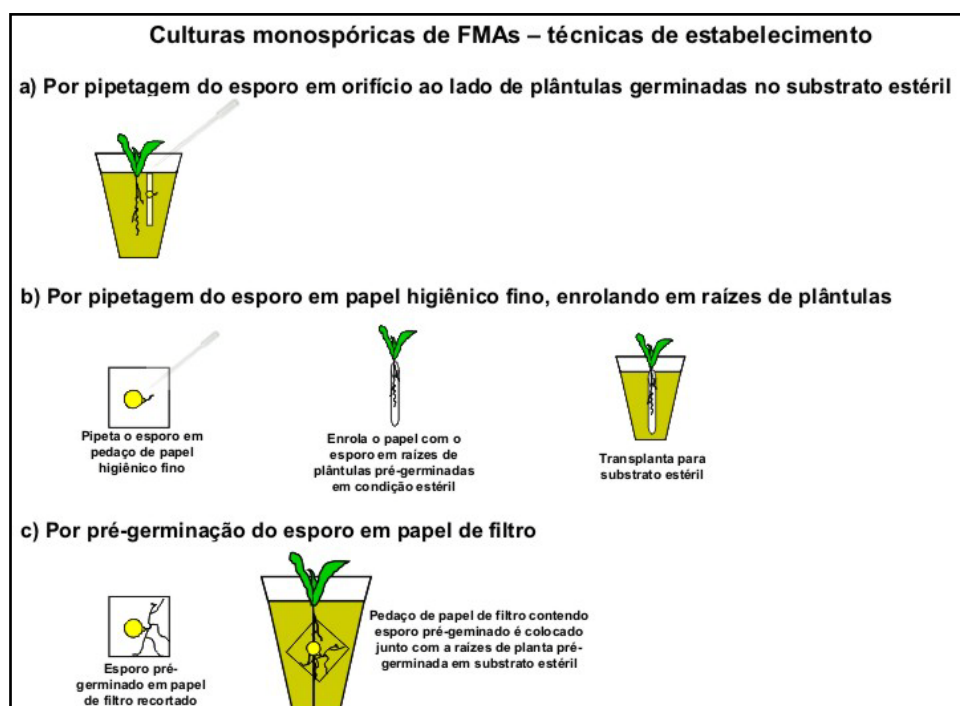


Figura 3. Algumas técnicas de estabelecimento de culturas monospóricas de fungos micorrízicos arbusculares – FMAs. (Esquema de Orivaldo José Saggin Júnior).

A planta hospedeira e o substrato podem ser diversos, adaptados regionalmente, sendo utilizado geralmente capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) e a mistura de solo argiloso: solo arenoso:solo orgânico (1:1:1), com ajuste do pH para aproximadamente 6,5, dependendo da espécie de fungo. É importante o registro da análise de cada lote do substrato como parte do controle de qualidade das atividades da coleção.

A partir de quatro meses de cultivo, deve-se iniciar a avaliação das culturas de isolamento para verificar o sucesso da multiplicação. Se não ocorrer a esporulação, mas houver a colonização das raízes, ciclos de estresse hídrico ou de poda da planta hospedeira são realizados para estimular a esporulação. Quando a esporulação for obtida, devem ser extraídos esporos do solo e montados em lâminas para microscopia (Figura 4), a fim de verificar a pureza da espécie isolada e fazer a caracterização e identificação com base na morfologia do esporo. Caso a cultura não esteja pura, pode-se fazer uma nova tentativa de isolamento dos esporos, separando novamente os esporos e começando novas culturas monoespecíficas.

Caso a cultura de isolamento esteja pura, ela é submetida a uma primeira repicagem, isto é, seus esporos são colocados para mais um ciclo de multiplicação em planta hospedeira em casa de vegetação. Caso o fungo isolado puro continue multiplicando-se nessa primeira repicagem, deposita-se o isolado na coleção de FMAs como uma nova linhagem.

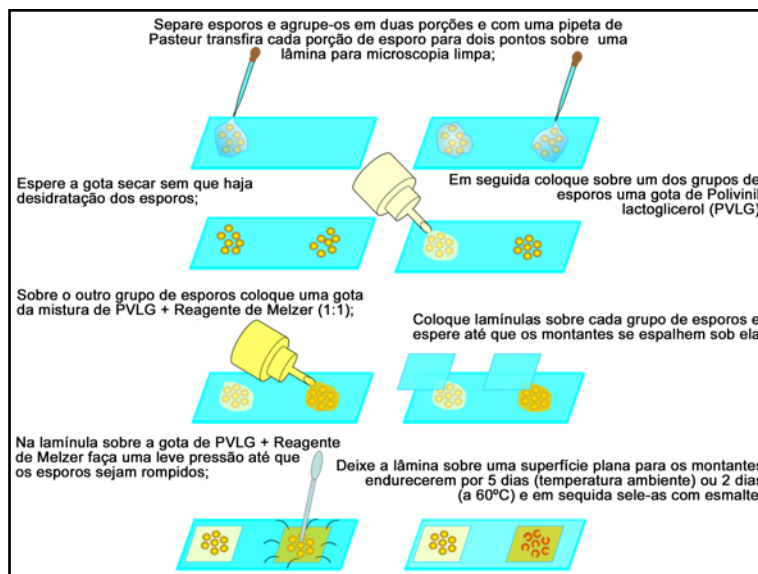


Figura 4. Montagem de lâminas para microscopia com esporos de fungos micorrízicos arbusculares, conforme Morton (1988). Fonte: NOVAIS *et al.*, 2010.

Identificação e caracterização

Como a maioria das descrições de espécies de FMAs foram feitas com base na morfologia dos esporos e somente recentemente começam a ser descritos com base molecular (SCHÜBLER; WALKER, 2010), a identificação das espécies com base no fenótipo dos esporos ainda é essencial para uma coleção desses fungos, apesar dos esporos sofrerem consideráveis alterações com o meio ambiente e das características como cor, tamanho e forma diferirem em cada tipo de solo.

Para a identificação de uma linhagem de FMA, seus esporos são montados em lâminas para microscopia (Figura 4) e as características morfológicas de seus esporos são confrontadas com as descrições de espécies de FMAs disponíveis em literatura ou na internet. Existe disparidade entre as informações disponíveis e muitas espécies não são claramente identificadas pela morfologia dos esporos. Na atual fase de conhecimento da taxonomia desses fungos, as espécies com duvidosas características morfológicas do esporo são identificadas apenas até o nível de gênero.

Caracterização genotípica

A caracterização genotípica de FMAs tem sido desenvolvida com base no gene que codifica a subunidade menor (*small subunit* — SSU) do ribossomo, o gene 18S rDNA. Este gene é um dos mais frequentemente utilizados em FMAs em estudos filogenéticos com o emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* — PCR). Em FMAs, o gene 18S rDNA permite identificar fungos dentro e fora das raízes e

também distinguir isolados de uma mesma espécie (AVIO *et al.*, 2009). Além desse gene, podem ser utilizados dados da sequência gênica da subunidade maior (*large subunit* – LSU) do gene rDNA e da região espaçadora interna transcrita (*transcribed spacer internal* – ITS), que é a sequência espaçadora intergênica.

A variabilidade no gene 18S rDNA pode ser observada por diversas técnicas, entre elas DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), clonagem e sequenciamento. Desse modo, sequências do gene 18S rRNA podem ser utilizadas em estudos de caracterização de linhagens em coleções por comparação com sequências gênicas depositadas em base de dados como a do “SILVA ribossomal RNA database project” (SILVA, 2011). Esses métodos de identificação genética podem ser utilizados como uma forma mais segura para se obter a caracterização genotípica de FMAs em coleções de culturas.

Em estudos de caracterização molecular de FMAs, pode ser necessária a realização de várias reações de PCR com diferentes pares de iniciadores (NOVAIS *et al.*, 2010), o que permite a obtenção do gene 18S rDNA completo. Entretanto, os avanços nesse campo estão sendo constantes, e outros genes possíveis de serem utilizados como marcadores filogenéticos alternativos em FMAs podem ser ainda estudados, como outros genes ribossomais, utilização do espaço intergênico (IGS) ou o sequenciamento de lócus múltiplos de vários genes constitutivos em sequência, denominados de “housekeeping”.

Realiza-se a caracterização genotípica de linhagens de FMAs por meio da observação de polimorfismo com o emprego das seguintes técnicas: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição – PCR-RFLP (MERGULHÃO *et al.*, 2008; AVIO *et al.*, 2009); eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE (SANTOS, 2008; NOVAIS *et al.*, 2010); e sequenciamento. Para isso, são amplificadas sequências dos genes ribossomais que codificam a subunidade menor (18S) e maior (25S), bem como sequências das regiões espaçadoras (ITS). A combinação dessas ferramentas permite a identificação de polimorfismo dentro e entre as diferentes espécies e a geração de um grupo de sequências de genes que codificam os RNAs ribossomais, proporcionando incremento no conhecimento da ecologia desse grupo de micro-organismos.

Para a realização das análises, os esporos são extraídos do solo por meio de peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguido de centrifugação em água e sacarose (JENKINS, 1964), conforme representado na Figura 2. Os esporos são limpos mediante sessões de sonicagem por 15 segundos, intercaladas por lavagens em água destilada estéril, e selecionados em microscópio estereoscópico. Cerca de 100 esporos são utilizados para a extração do DNA total. O DNA é extraído por meio de um protocolo modificado no laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia (Figura 5), o qual combina a maceração em nitrogênio líquido com resina Chelex e o método CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio).

Inicialmente, o DNA das linhagens de FMAs é amplificado com a utilização dos iniciadores NS1-ITS4, conforme descrito em Novais *et al.* (2010). Para a análise de PCR-RFLP, o produto da reação de PCR, com aproximadamente 2300 pb, é utilizado para a restrição com 5 endonucleases de restrição (Hinfl, MspI, TaqI, Ddel e HpaII). Para a análise de DGGE, um fragmento de aproximadamente 600 pb é amplificado com o emprego dos iniciadores NS31 contendo grampo de GC e AM1 (SIMON *et al.*, 1992; KOWALCHUK *et al.*, 2002; HELGASON *et al.*, 1998). Para essa reação, utiliza-se como DNA molde uma diluição do produto com os iniciadores NS1-ITS4. A reação de PCR e a eletroforese

contendo gradiente desnaturante, composto por formamida e ureia, são realizadas conforme descrito em Santos (2008).

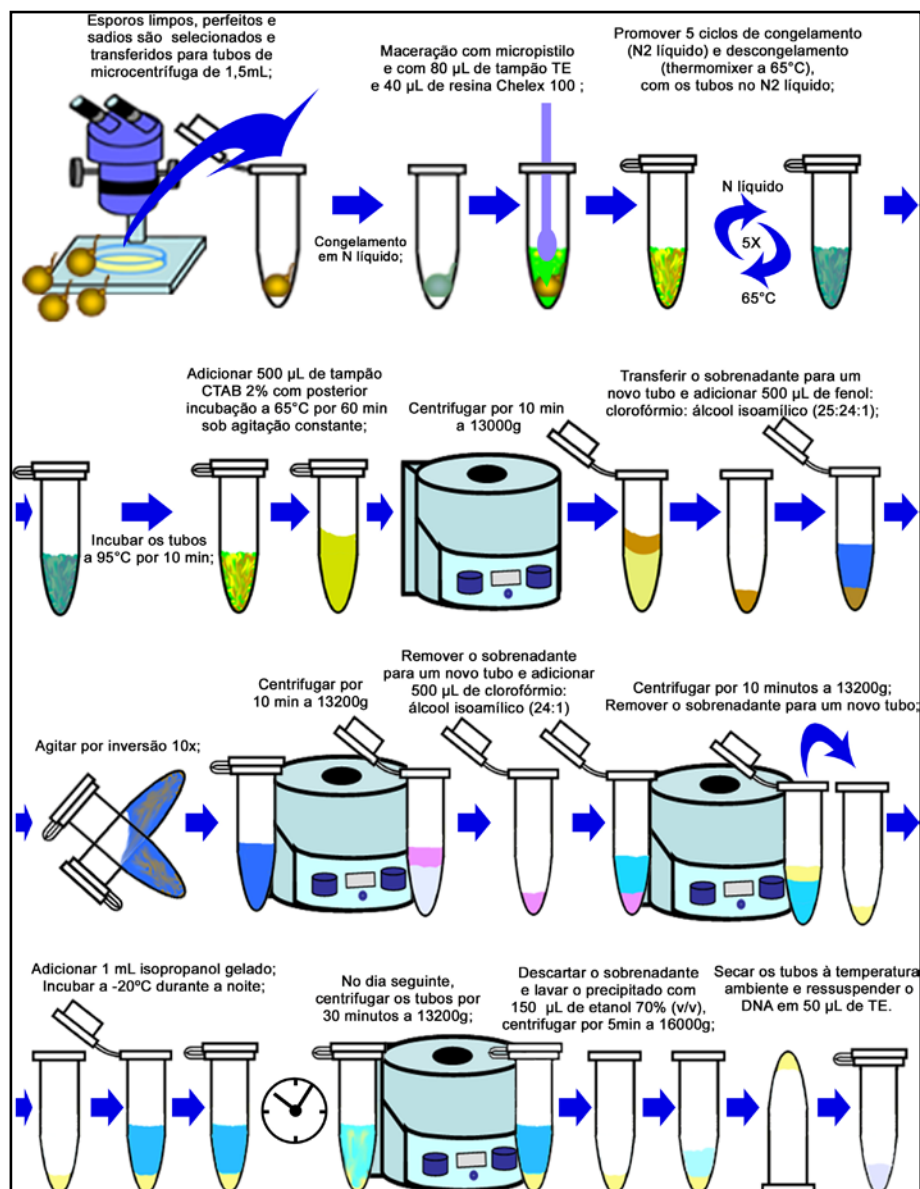


Figura 5. Protocolo de extração de DNA de esporos de fungos micorrízicos arbusculares, modificado pela combinação da maceração em N líquido com resina Chelex e o método CTAB. Fonte: NOVAIS *et al.*, 2010.

Os géis gerados pelas análises de PCR-RFLP e DGGE são utilizados para a construção de dendrogramas de similaridade, com o emprego do coeficiente de Jaccard e do método de agrupamento UPGMA, disponíveis no programa GelComparII (Applied Maths).

Para o sequenciamento, o produto da PCR com os iniciadores NS1-ITS4 é purificado com a utilização do kit adequado para purificação do produto da PCR (marca Wizard), clonado em vetor apropriado (marca Promega) e células de *Escherichia coli* termocompetentes são utilizadas para a transformação. Os plasmídeos são extraídos e os insertos são sequenciados em sequenciador modelo Megabace. Para as reações de sequenciamento, são utilizados os iniciadores NS1, ITS4 e iniciadores intermediários.

As sequências obtidas são verificadas com relação à identidade por meio de comparações na ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e, caso necessário, editadas manualmente.

Posteriormente, as sequências são alinhadas com o emprego do algoritmo ClustalW, disponível no programa ClustalX, e árvores filogenéticas são construídas com a utilização do programa Mega v 3.0.

Preservação

Para que as linhagens de uma coleção de FMAs sejam preservadas, elas devem ser repicadas, no mínimo, a cada 24 meses em uma planta viva, a fim de garantir sua viabilidade. Para isso, utiliza-se inóculo proveniente de uma cultura de repicagem ou isolamento anterior (cultura-mãe). Os vasos são preenchidos com 2/3 do volume com substrato autoclavado, seguido de uma camada de inóculo da cultura-mãe, recoberto com mais uma camada de substrato autoclavado para completar o volume do vaso. Em seguida, faz-se a semeadura das plantas hospedeiras. Esse método é semelhante ao apresentado para a cultura-armadilha na Figura 1.

Algumas linhagens mais procuradas para estudos devem ser repicadas em maior quantidade para pronta prestação de serviço de intercâmbio de germoplasma. Outras linhagens menos procuradas para intercâmbio devem ser repicadas em maior quantidade somente por demanda, sendo que os prazos para seu fornecimento podem demorar entre 4 e 12 meses.

Armazenamento

Quando as culturas de repicagem são obtidas com sucesso (presença de abundante esporulação e monoespecíficas), a irrigação dos vasos é suspensa e estes são mantidos em casa de vegetação até a completa desidratação da planta hospedeira. Esse processo demora entre 7 e 14 dias, dependendo das condições climáticas. A parte aérea das plantas hospedeira é cortada com tesoura, rente ao solo, e os vasos são tampados, identificados e armazenados em sala sob temperatura de 23°C (Figura 6).

O armazenamento dos FMAs no próprio substrato de repicagem é a forma mais comum de preservação de uma coleção desses fungos. Quando esse armazenamento é feito conforme descrito acima, mantendo-se o torrão do vaso, os propágulos do fungo ficam menos expostos à atmosfera livre e à oxidação. Isso aumenta o tempo de preservação desses propágulos.

Foto: Orivaldo José Saggin Júnior



Figura 6. Vaso onde foi repicado a linhagem A87 (CNPAB 043) de fungo micorrízico arbuscular e que serve de recipiente para seu armazenamento e preservação no próprio substrato de multiplicação.

Criopreservação

Técnicas de criopreservação de FMAs a longo prazo são pouco desenvolvidas, mas devem ser estabelecidas em coleções desses fungos. Esporos no solo podem ser armazenados em geladeira. Isso conserva bem algumas espécies, como *Glomus intraradices*, mas não outras, como *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* e *Acaulospora longula* (INTERNATIONAL..., 2010).

Alguns crioprotetores, como dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, manitol e sacarose, mostraram-se ineficazes para preservar *G. margarita* congelada (DOUDS JR.; SCHENCK, 1990). Os melhores resultados de crioproteção foram obtidos com a incubação dos esporos por dois dias em trehalose 1 M. Isso permitiu a germinação de um sexto dos esporos congelados de *G. margarita*, em relação ao controle não congelado. Esses autores concluíram que o melhor método de crioproteção e criopreservação foi o de secagem lenta do vaso de cultivo e do congelamento dos esporos *in situ* (no substrato), sendo este método satisfatório para os cinco gêneros de FMAs avaliados.

Um outro estudo quantificou a habilidade de esporos de FMAs, produzidos axenicamente *in vitro* associados a raízes transformadas de cenoura, em germinarem após a criopreservação (DECLERCK; COPPENOLLE, 2000). Os autores não verificaram germinação alguma em esporos incubados com glicerol e manitol depois de congelados a -70°C, independente da concentração testada desses crioprotetores. Já a incubação por um dia em sacarose 0,5 M ou por 1 e 2 dias em trehalose 0,5 M permitiu a germinação de esporos após o congelamento a -70°C. Utilizando-se a incubação em trehalose 0,5 M por um dia e congelamento a -100°C, foram obtidos 95 e 100% de esporos potencialmente infectivos, germinados em meio ágar-água e meio Strullu-Romand, respectivamente. Entretanto, essa taxa de germinação decresceu rapidamente com temperaturas de congelamento de -140 e -180°C. Os autores ainda checaram que os esporos incubados por 1 dia em trehalose 0,5 M e congelados a -100°C conseguiram colonizar altamente raízes de cenoura transformadas *in vitro* e produzir abundante esporulação, demonstrando a habilidade dos esporos de se reproduzirem após o ciclo de criopreservação.

Dados, comprovantes e intercâmbio das linhagens

Dados das linhagens da Coleção

Os dados de cada linhagem de FMAs devem ser armazenados em planilhas e base de dados própria da Coleção, além da base de dados Infomicro, que é utilizada por todas as Coleções da Rede de Coleções de Micro-organismos da Embrapa. Em uma Coleção de FMAs, devem ser mantidas as seguintes informações:

Identidade

- Código de identificação na Coleção.
- Código original no isolamento ou em outra Coleção.
- Identificação complementar original (no isolamento ou em outra Coleção).
- Gênero.
- Espécie.

Depósito

- Nome do depositante.
- Endereço do depositante.
- *E-mail* do depositante.
- Nome do depositário.
- Data de depósito.

Isolamento

- Nome do responsável pelo isolamento.
- Instituição de origem.
- Data de isolamento.
- Número de esporos utilizados no isolamento.
- Referências bibliográficas sobre a linhagem.

Coleta

- Nome do responsável pela coleta.
- Planta de origem.
- País.
- Estado.
- Município.
- Localidade.
- Local detalhado da coleta.
- Histórico do local.
- Classificação do solo do local.
- Análise química e granulométrica do solo do local.
- Latitude.
- Longitude.
- Altitude.
- Clima (Köppen).
- Bioma do local de coleta.

Comprovantes físicos de cada repicagem das linhagens

As linhagens de uma coleção de FMAs devem ser repicadas periodicamente em plantas vivas para garantir sua viabilidade. Esse fato torna grande o risco de haver contaminação da linhagem com outras espécies de FMAs ou de haver uma alteração genética na linhagem por seleção ao hospedeiro/solo/ambiente utilizado na repicagem. Assim, a cada ciclo de repicagem, é necessário criar comprovantes físicos das linhagens para que dentro de um sistema de qualidade, no futuro, possa ser rastreada qualquer alteração genética ou fenotípica no acervo da coleção. Os comprovantes físicos mais utilizados são:

Lâminas permanentes para microscopia

A cada ciclo de repicagem da linhagem de um FMA na Coleção, seus esporos devem ser extraídos e montados em lâminas permanentes para microscopia (Figura 4), a fim de

permitir a caracterização de sua morfologia, a checagem da espécie e da pureza e servir como referência física de modificações morfológicas que a linhagem pode sofrer.

Depois de prontas, as lâminas permanentes devem ser submetidas à identificação morfológica da linhagem e ao controle da pureza da repicagem mediante verificação de FMAs contaminantes e registro fotográfico. As lâminas devem ser identificadas com uma etiqueta padronizada da Coleção e guardadas permanentemente.

Esporos de referência

A cada ciclo de repicagem da linhagem de um FMA na Coleção, seus esporos devem ser extraídos, separados, limpos e armazenados em glicerina 50%, formando uma referência genética do material repicado. Isso permite, no futuro, a caracterização molecular da linhagem e a verificação de alterações genotípicas com a repicagem. Esse armazenamento dos esporos deve ser realizado a cada ciclo de repicagem, de forma a garantir a possibilidade de rastreamento e a recuperação de linhagens alteradas.

Fotos digitais

A cada ciclo de repicagem da linhagem de um FMA na Coleção, seus esporos montados em lâminas para microscopia são fotografados sob microscópio óptico. Essas imagens podem ser montadas em um banco de imagens ou impressas num catálogo, como referência física da linhagem naquele ciclo de repicagem.

Intercâmbio das linhagens

Toda transferência de material genético de uma coleção de FMAs deve ser feita com base na legislação vigente. Atualmente, somente são efetuadas remessas entre instituições de pesquisa nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil, conforme a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, o Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, alterado pelo Decreto nº 4.946, de 31 de dezembro de 2003, e a Resolução nº 20, de 29 de junho de 2006, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Para isso, são firmados termos de transferência de material (TTM) genético entre as instituições que estão intercambiando as linhagens.

Referências

- AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 242-253, 2009.
- CAPRONI, A. L.; FRANCO, A. A.; BERBARA, R. L. L.; GRANHA, J. R. D. de O.; SILVA, E. M. R. da; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas após mineração de bauxita no Pará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 937-945, 2003.
- DECLERCK, S.; COPPENOLLE, M. G. A. V. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, [S. l.], v. 148 n. 1, p.169-176, 2000.
- DOUDS JR., D. D.; SCHENCK N. C. Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, [S. l.], v. 115, p. 667-674, 1990.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, U. K., v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.
- HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, p. 394-431, 1998.
- International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). **Freezing germplasm in liquid nitrogen**. Available in: < <http://invam.caf.wvu.edu/> > . Accessed 22 November 2010.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, [S. l.], v. 48, p. 692, 1964.
- 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**, [S. l.], v. 11, p. 571–581, 2002.
- MERGULHÃO, A. C. E. S.; SILVA, M. V.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MAIA, L. C. Characterisation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi species by PCR/RFLP analysis of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 341-344, 2008.
- MORTON, J. B. Taxonomy of VA Mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. **Mycotaxon**, [S. l.], v. 32, p. 267-324, 1988.
- MORTON, J. B.; BEVER, J. D.; PFLEGER, F. L. Taxonomy of *Acaulospora gerdemannii* and *Glomus leptotichum*, synanamorphs of an anamorphic fungus in Glomales. **Mycological Research**, [S. l.], v. 101, p. 625-631, 1997.

NOVAIS, C. B.; SOUZA, F. A.; SIQUEIRA, J. O. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 45, n. 8, p. 806-896, 2010.

REDECKER, D.; MORTON, J. B.; BRUNS, T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 14, p. 276-284, 2000.

SANTOS, J. G. D. **Riqueza de fungos micorrízicos arbusculares no solo e crescimento inicial de espécies arbóreas nativas**. 80 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2008.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, [S. l.], v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. The Glomeromycota. **A species list with new families and new genera**. Available in: < http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/species_infos/higher_taxa/funneliformis_claroideo_glomus_rhizophagus_redeckera.pdf >. Accessed 11 March 2011. (Effectively Published 16 December 2010 in Gloucester, England).

SILVA comprehensive ribosomal RNA databases. **A comprehensive on-line resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data, free for academic use**.

Available in: < <http://www.arb-silva.de/> >. Accessed 11 March 2011.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 58, p. 291-295, 1992.

SYLVIA, D. M.; HUBBELL, D. H. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. **Symbiosis**, Rehovot, IL, v. 1, p. 259-267, 1986.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***