

DIVERSIDADE MICORRÍZICA NA RIZOSFERA DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE SORGO (PCR-DGGE) INFLUENCIADA PELO SUPRIMENTO DE FÓSFORO

MYCORRHIZAL DIVERSITY IN THE RHIZOSPHERE OF SORGHUM RECOMBINANT INBREEDS LINES (PCR-DGGE) AS INFLUENCED BY THE SUPPLY OF PHOSPHORUS

NEVES, A.A.O.¹; SILVA, J.A.A.¹; BORGES, A.L.¹; SCHAFFERT, R.E.¹; COELHO, A.M.¹; OLIVEIRA, A.C.¹; ALVES, V.M.C.¹; MARRIEL, I.E.¹

¹ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG
e-mail: imarriel@cnpms.embrapa.br.

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente o fósforo (P). O presente trabalho teve como objetivo analisar em gel de DGGE, a diversidade genética de FMA em amostras de solo provenientes de rizosfera de sete linhagens recombinantes de sorgo (RILs) em dois níveis de P, em solo de cerrado (LVdf). Os genótipos, provenientes do cruzamento dos parentais BR 007B*SC 283, foram dispostos em delineamento experimental de blocos incompletos (DBI), com três repetições. Amostras de DNA total foram extraídas do solo rizosférico de cada RILs e amplificadas com primers universais para fungos, primers universais para FMA e "nested" com primer específico da família Glomaceae. O perfil eletroforético de amplicons no DGGE mostrou diversidade elevada entre as amostras independente dos primers utilizados. O suprimento de P influenciou a diversidade micorrízica com maior número de amplicons na presença de baixo P, particularmente em uma das linhagens (377). Resultados similares foram observados quando se utilizou primers específicos para família Glomaceae exceto nas linhagens: 422, 442, 461. Concluiu-se que há elevada diversidade de FMA da família Glomaceae em genótipos de Sorgo, influenciada pelo suprimento de P.

Abstract

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have an important function in the acquisition and mobilization of nutrients of the soil, mainly P. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of AMF in soil samples of the rhizosphere of seven recombinant inbred lines (RILs) of sorghum in two levels of P, grown in an oxisol soil of the Brazilian Cerrado, using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The genotypes were derived from the cross between the parental lines BR 007B and SC283, and were planted in a randomized incomplete block design, with three repetitions. Samples of DNA were extracted from the soil rhizosphere of each RILs and amplified with universal primers for fungi, universal primers for FMA and "nested" with specific primer of the family Glomaceae. The electrophoretic profile in DGGE showed a high diversity among the samples independent of the primers used. The level of P influenced the diversity of mycorrhiza with a greater diversity in the treatments with low P particularly in one RIL (377). Similar results were observed when specific primers for the Glomaceae family were used, except for the RILs 422, 442, and 461. The conclusions from this study were that both the sorghum genotype and P availability in the soil influence the diversity of AMF of the family Glomaceae.

Introdução

Em ambientes naturais, as plantas terrestres são mantidas pela interação existente entre o sistema radicular e o ambiente do solo, compartilhando uma diversidade de processos biogeoquímicos que ocorrem com a comunidade microbiana. Estudos relacionados à vida microbiana na rizosfera de plantas e suas interações tem sido enfatizados atualmente.

A absorção de fósforo pelas plantas, em geral, é considerada como uma consequência direta da retirada do nutriente do solo, por meio das células das raízes. Entretanto, a grande maioria das plantas cultivadas apresenta associações simbióticas com fungos micorrízicos

arbusculares (FMA), as quais têm importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente o fósforo (P), (Siqueira, 2006).

A cultura de sorgo tem sido utilizada principalmente em ração animal e é bem adaptada às regiões quentes e secas, onde geralmente não se consegue boa produtividade de grãos e de forragem com outras espécies, como o milho (Embrapa, 2007). Possui frequentemente interação micotrófica se beneficiando de FMA, principalmente em solos com baixa fertilidade. As interações entre fungos e plantas são complexas, e em ambos, o desenvolvimento e fisiologia estão sob controle genético, sendo afetados pelo ambiente. A diversidade genética de micorrizas tem facilitado à identificação e caracterização em amostras de solo. A presença de diferentes espécies de plantas ou genótipos pode influenciar a composição da comunidade microbiana devido a respostas da população fúngica a diferentes padrões de exsudação da raiz, especialmente quando as plantas estão sob estresse ambiental. De acordo com Chellius e Eric (1999), é possível a amplificação do DNA extraído diretamente do solo por meio de primers específicos para endomicorrizas.

Métodos moleculares, baseados na amplificação do DNA de amostras de solo pela reação de polimerização em cadeia (PCR) (Smalla et al., 1993), e o DGGE, eletroforese em gel de gradiente desnaturante, tem sido empregados na caracterização de comunidades microbianas do solo.

O presente trabalho teve como objetivo analisar em gel de DGGE, a diversidade genética de FMA em amostras de solo provenientes de rizosfera de sete linhagens recombinantes de sorgo (RILs) em dois níveis de P, em solo de cerrado(LVdf).

Material e Métodos

Amostras de solo foram coletadas em um LATOSSOLO VERMELHO Distroférico (LVdf), fase cerrado, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Para análises moleculares, retiram-se amostras de solo rizosférico das RILs provenientes do cruzamento dos parentais BR 007B (sensível ao alumínio e responsivo à P) *SC 283 (tolerante ao alumínio e eficiente à P) do programa de melhoramento da referida instituição. As RILs foram dispostas em 14 tratamentos (7 RILs e 2 níveis de P).O delineamento experimental utilizado foi DBI (delineamento de blocos incompletos) com três repetições. Foram avaliadas as RILs: G1 (RILs 80), G2 (RILs 305), G3 (RILs 310), G4 (RILs 377), G5 (RILs 422), G6 (RILs 442) e G7 (RILs 461), em dois níveis de P (alto 20 ppm, AP e baixo 5 ppm,BP). A população total de FMA foi avaliada pela extração de DNA total de 500mg de solo rizosférico de cada RILs, utilizando-se o protocolo descrito pelo "Fast Kit DNA for soil" BIO 101. Os fragmentos foram amplificados primeiramente utilizando-se os primers universais para fungos, NS1e NS2. Em um segundo PCR ("nested" PCR), foram amplificados com os primers gerais para família de FMA AM1e NS31. Posteriormente, em novo procedimento os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando-se os primers universais para fungos, NS5 e ITS4, em um segundo PCR ("nested" PCR) utilizou-se o primer da região ITS específico da família Glomaceae, GLOM 1310 (Redecker et al., 2000) acrescido de uma seqüência de CG denominada "clamp" juntamente com o primer universal ITS2. A eletroforese foi realizada em uma unidade de DGGE da Biorad (Richmond, USA), sendo os produtos de PCR aplicados em gel contendo 6% de poliacrilamida. O gradiente de desnaturantes (uréia e formamida deionizada) foi de 25% a 50%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições da eletroforese foram de 16h a 60°C e 100V. Após a eletroforese os géis foram corados por Brometo de Etídio e fotografados em fotodocumentador Stratagene modelo Eagle Eye II. A comparação dos perfis das comunidades após o DGGE foi realizada com a obtenção dos padrões de amplicons obtidos através do software STATISTICA versão 5.0 (1995), utilizando-se UPGMA (" unweighted pair-group average") e o coeficiente de Dice.

Resultados e Discussão

O perfil eletroforético de amplicons no DGGE (figura 1) obtidos através da amplificação do DNA total extraído da rizosfera de RILs, em dois níveis de P, com os primers universais AM1 e NS31, evidenciam diferenças na composição de comunidades de FMA em função do suprimento de P. O número de amplicons total encontrados nos perfis das RILs com alto nível de P foi inferior ao encontrado nos perfis das RILs com baixo nível de P. Ressalta-se o perfil eletroforético de amplicons apresentado na RILs 377, onde está representada grande

diversidade de marcas em baixo nível de P, o que pode estar atribuído ao fato desta RILs ser caracterizada como sensível ao teor de alumínio, tendo então, recebido esta característica do parental sensível (BR007). Este parental apresentou também, em condições de baixa disponibilidade de P, 2,8 vezes maior quantidade de exsudatos totais em relação ao parental SC283. Análises de cromatografia líquida e gasosa destes exsudatos indicam a presença de compostos específicos para micorrização, denominados de estrigolactonas (Embrapa, 2008 dados não publicados). Akiyama et al. (2005) identificaram em exsudatos de leguminosas, o componente estrigolactonas considerado como um estimulador da germinação de esporos de FMA principalmente em solo com baixa disponibilidade de P.

O perfil eletroforético de amplicons no DGGE, quando se utilizou o primer específico para a família Glomaceae, GLOM1310 juntamente com o primer universal ITS2 (figura 2), apresentou, também, diferenças nas comunidades de FMA com alto polimorfismo. Na presença de baixo P observou-se maior número de amplicons total em relação ao observado na de alto P., com exceção das RILs: RILs 422, RILs 442, RILs 461. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato destas RILs serem caracterizadas como tolerantes ao teor de alumínio e terem recebido uma maior contribuição genética do parental tolerante (SC283), que em condições de baixa disponibilidade de P apresentou menor exsudação de compostos específicos para micorrização (Embrapa, 2008 dados não publicados). Os resultados encontrados no presente trabalho indicam alta diversidade de membros da família Glomaceae, analisados com os primers GLOM 1310 e ITS2. De acordo com Marschener, (1998) para a maior eficiência na aquisição de nutrientes, as raízes induzem mudanças na rizosfera favorecendo uma comunidade específica de microrganismos que irão atuar melhorando a nutrição mineral das plantas.

Conclusões

Concluiu-se que há elevada diversidade de FMA da família Glomaceae em genótipos de sorgo, influenciada pelo suprimento de P.

Na presença de baixa disponibilidade de P observou-se maior diversidade na comunidade de FMA da família Glomaceae na rizosfera de sorgo.

Genótipo de sorgo influenciou a composição de FMA independente do suprimento de P.

Referências

AKIYAMA, K. ; MATSUZAKI, K. ; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. v.435/9, june 2005/doid :10.1038. **Nature** 03608.

ARAÚJO, C. V. M.; SANTOS O. M.; ALVES, L. J.; MUNIZ C. R. R. Fungos micorrízicos arbusculares em espécies de Melastomataceae no Parque Metropolitano de Pituaçu Salvador – BA Brasil. **Sitientibus**, Série Ciências Biológicas, n.3, p. 115-119 2003.

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

EMPRAPIA MILHO E SORGO. Sistemas de Produção, 2. ISSN 1679-012X. **Versão eletrônica**, 3ª edição, set/2007.

MARSCHENER, H. Role of root growth, arbuscula mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, v.56, p.203-207, 1998.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

SMALLA, K.; CRESWELL, L.C.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; WOLTERS, A.; VAN ELSAS, J.D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal Applied Bacteriology**, v. 74, p. 78-85, 1993.

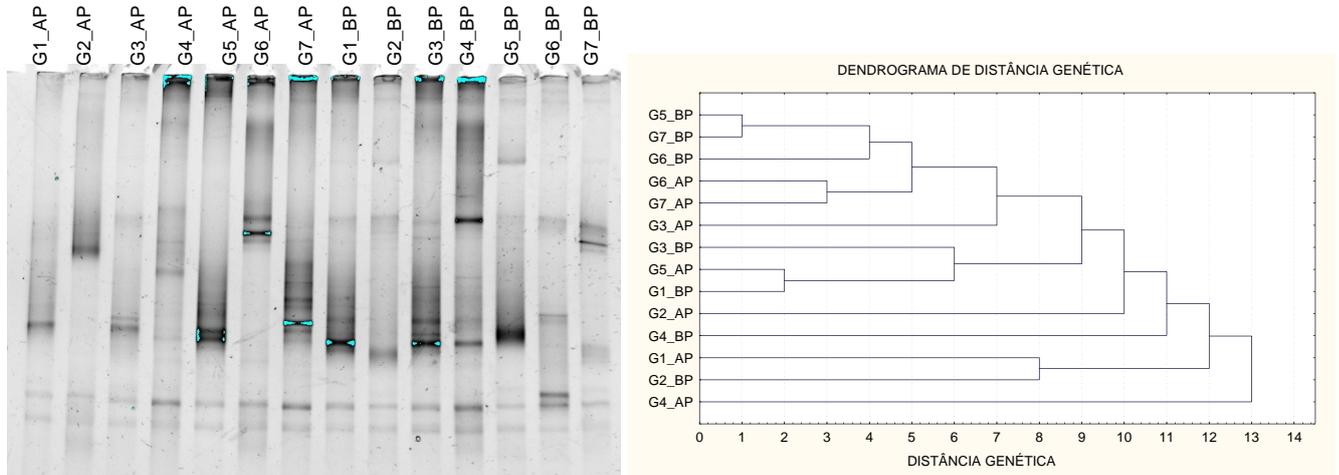


Figura 1. Amplicons específicos de DGGE e dendrograma representando a distância genética da árvore obtidos com os primers gerais AM1 e NS31 para família de FMA em amostras de solo rizosférico de RILs em dois níveis de P (alto e baixo P).

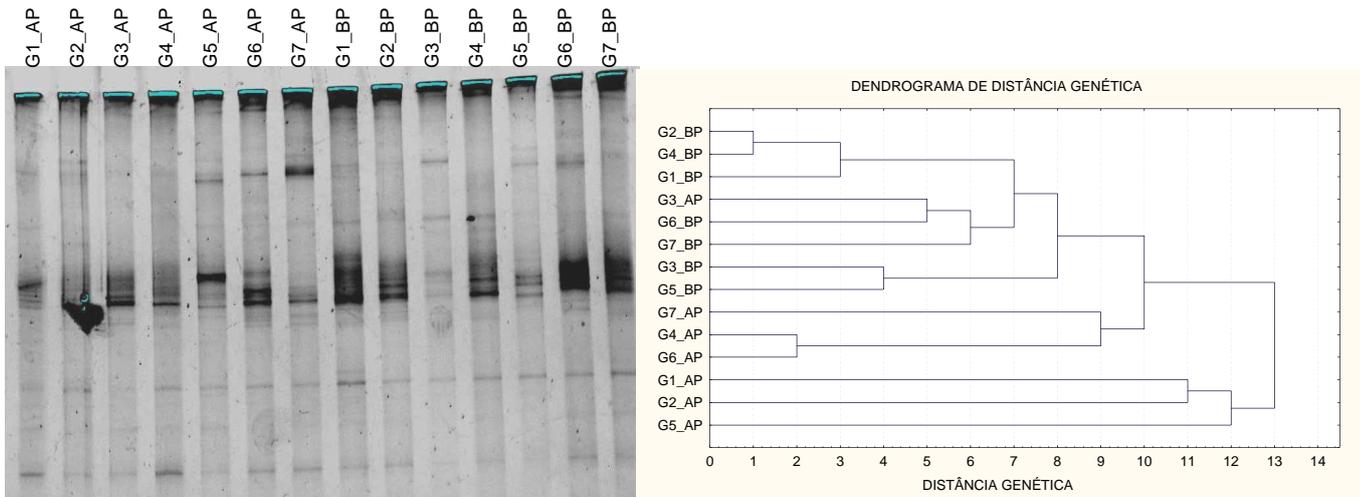


Figura 2. Amplicons específicos de DGGE e dendrograma representando a distância genética da árvore da família Glomaceae obtidos com os primers específicos GLOM1310 e ITS2 em amostras de solo rizosférico de RILs em dois níveis de P (alto e baixo P).