

Diversidade Micorrízica na Rizosfera de Genótipos de Milho Contrastantes no Uso de Fósforo Através de um PCR-DGGE Específico da Região Ribossomal ITS/Acaulosporacea

[Previous](#)
[Top](#) [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato G

CHRISTIANE A. OLIVEIRA¹, VERA M. C. ALVES², ELIANE A. GOMES²,
IVANILDO E. MARRIEL², RUI RAPOSEIRAS², UBIRACI G. P. LANA², EDILSON
PAIVA², ANDREA A. CARNEIRO², CLAUDIA T. GUIMARÃES², MARIA R. S.
MUZZI¹ E NADJA M. H. DE SÁ¹

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, E-mail: chrisabreu@terra.com.br, ² Embrapa Milho e Sorgo. Trabalho parcialmente financiado pela Mcknight Foundation/Embrapa Milho e Sorgo.

Palavras-chave: *Zea mays*, endomicorrizas, estresse de fósforo, diversidade genética.

INTRODUÇÃO

Em ambientes naturais, as plantas terrestres são mantidas pela interação existente entre o sistema radicular e o ambiente do solo, compartilhando uma variedade de processos biogeoquímicos que ocorrem com a comunidade microbiana. A existência de vida microbiana na rizosfera, e de suas interações com as plantas, têm sido tema de vários estudos sobre o papel desta interação no desenvolvimento da planta (Goodman et al., 1997). A planta de milho possui elevada taxa de crescimento e grande demanda por nutrientes, possuindo freqüentemente interação micotrófica e se beneficiando dos fungos micorrízicos arbusculares, principalmente em solos pouco férteis (Bressan e Vasconcellos, 2002). As interações entre fungos e plantas são, contudo, complexas, e em ambos, o desenvolvimento e fisiologia estão sob controle genético, sendo afetados pelo ambiente. Características do genótipo da planta, que influenciam o tipo e a morfologia do sistema radicular, têm sido relacionadas como responsáveis por diferenças na dependência micorrízica e respostas à inoculação de várias espécies vegetais (Smith et al., 1993). A diversidade genética de endomicorrizas, investigada por diversos autores (Redecker et al., 1997; Simon et al., 1992), tem facilitado a identificação e caracterização de espécies em amostras de solo. Entretanto, nenhum estudo relata a análise do DNA de fungos micorrízicos extraídos diretamente do solo utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) para formação de um perfil genético para micorrizas em rizosferas de plantas. Chellius e Eric (1999), verificaram que é possível a amplificação do DNA extraído diretamente do solo por meio de "primers" específicos para endomicorrizas, porém não foram analisadas diferenças de diversidade nas amostras de solo coletadas. Atualmente, para este tipo de avaliação da população microbiana, existem diversas técnicas para extração do DNA total de microrganismos a partir de amostras ambientais tão complexas como o solo (Akkermans et al., 1995; Van Elsas et al., 1997). Métodos moleculares, baseados na amplificação do DNA de amostras de solo pela reação de polimerização em cadeia (PCR) (Smalla et al., 1993), reação de polimerização em

cadeia, e o DGGE, eletroforese em gel de gradiente desnaturante, têm sido empregados na caracterização de comunidades microbianas do solo. Neste estudo, propõe-se analisar, em gel de DGGE, as diferenças genéticas entre populações de micorrizas em amostras de solo provenientes de rizosferas distintas de genótipos de milho. Esta análise permitirá a obtenção de informações importantes para o estudo de genótipos com maior ou menor eficiência no uso de P e também a identificação filogenética dos membros em destaque na comunidade microbiana da rizosfera de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo rizosférico foram coletadas em um latossolo vermelho-escuro fase cerrado, aos 30 dias após o plantio e durante o início da fase de florescimento do milho. Os experimentos de campo foram instalados em outubro de 2001 e outubro de 2002, na Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas, MG. O solo rizosférico foi retirado da porção aderida à raiz de híbridos e linhagens provenientes do Programa de Melhoramento da referida instituição, previamente caracterizados como eficientes (E) e ineficientes (I) para fósforo, em locais de plantio convencional cujo teor de fósforo no solo foi de 15mg.dm⁻³ (Mehlich-1) de P (alto P) e 2mg.dm⁻³ (Mehlich-1) de P (baixo P). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições sendo os tratamentos dispostos em fatorial 5x2 (5 híbridos e 2 doses de P) ou 3x2 (3 linhagens e 2 doses de P). Foram avaliados os seguintes híbridos: HT, HS1, HS2, eficientes e HS3, HS4, ineficientes; as linhagens: L3 e L228, eficientes e L22, ineficiente. Coletou-se também as seguintes amostras como testemunhas: solo não rizosférico em baixo fósforo (NR) e em alto fósforo (NRP), solo da rizosfera do híbrido triplo eficiente em plantio direto (HTPD), solo não rizosférico do plantio direto (NRD) e solo de cerrado natural (Mata). A população total de fungos micorrízicos foi avaliada pela extração de DNA total de 500mg de solo rizosférico de cada genótipo, utilizando-se o protocolo descrito pelo "Fast Kit DNA for soil", BIO101. 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 Acaulosporaceae, ACAU1660 (Redecker, 2000) acrescido de uma seqüência de CG denominada seqüência "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 45% a 70%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições de eletroforese foram de 16h a 60°C e 100V. Após a eletroforese os géis foram corados por 30min com SYBER GREEN I (Molecular Probes) ou prata e fotografados em câmara digital para análise das bandas. As bandas importantes foram eluídas do gel de DGGE e amplificadas via PCR para posterior identificação de espécies. O produto de PCR foi extraído do gel e purificado utilizando-se o Kit Qiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit "Big Dye Terminator" v. 3.1 (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações dos fabricantes e analisadas no seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As seqüências de DNA obtidas foram determinadas pelo programa Blast N (Altschul et al., 1997) e comparadas com o GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético das bandas no DGGE (Figura 1) sugere diferenças na comunidade micorrízica da família Acaulosporaceae da rizosfera de genótipos de milho eficientes e ineficientes para P. Algumas bandas estavam presentes somente em genótipos eficientes (Figura1-1 e Figura1-2, vide setas), indicando que alguns grupos de microrganismos estão sendo favorecidos na rizosfera destes genótipos de milho. Para uma 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 (Marchener, 1998). Verificou-se uma maior variabilidade genética em amostras de solo dos genótipos cultivados sob estresse de P, sugerindo o efeito do teor de P no solo sobre a população destes fungos. Algumas bandas ocorreram em genótipos em alto P e não ocorreram em genótipos sob baixo P.

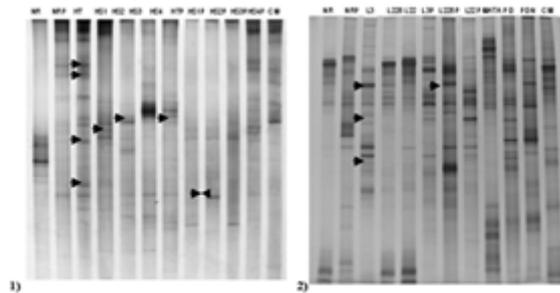


Figura 1. Perfil de um PCR-DOGE de micorrizas da família Acaulosporaceae ("primer" ACAU 1660T3) em solo micorrízico de tuberosos (1) e linhagens (2) de milho eficientes para P cultivados em baixo P. As colunas, HT, HT1, HT2, L3, L22F contém o perfil genético das raízes micorrízicas de genótipos eficientes em baixo P. As colunas, HT3, HT4 e L22, contém dos genótipos ineficientes em baixo P. As colunas HT5, HT6, HT7, HT8, HT9, HT10, L3F, L221F, L22F contém o perfil do solo micorrízico dos genótipos em alto P. A coluna CM contém os controles de esporos puros de micorrizas; NR, NP contém o perfil do solo não micorrízico do baixo P e não micorrízico do alto P respectivamente; MATA, PD e PDN contém o perfil de amostras de solo de mata de cerrado, solo micorrízico de planta de milho e de solo não micorrízico de planta de milho. As setas indicam os microrganismos de solo ou bandas que diferem entre os tratamentos.

A diversidade genética encontrada demonstrou o potencial do DGGE baseado na amplificação de fragmentos de DNA da região ITS específica de fungos da família Acaulosporaceae para caracterizar a população destes microrganismos na rizosfera de alguns genótipos de milho. A identificação de espécies de fungos micorrízicos pelas características morfológicas de esporos e células em raízes é extremamente complexa e trabalhosa, principalmente porque estes fungos são hospedeiros obrigatórios e difíceis de serem cultivados *in vitro*. Muitos estudos de comunidade micorrízica em raízes de plantas têm sido prejudicados pela dificuldade em se identificar espécies. A maior parte do conhecimento sobre fungos micorrízicos no ambiente baseia-se em contagens de esporos e hifas, porém, a população de esporos no solo pode não refletir a composição de espécies presentes na rizosfera (Husband et al., 2002). Os "primers" usados neste estudo e o DGGE podem ser utilizados para estudos de estrutura e dinâmica da população de fungos dos gêneros *Acaulospora* e *Entrophospora*. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar elementos filogeneticamente distintos e próximos pela seqüência do rDNA. Estudos sobre a ecologia das micorrizas devem ser incentivados para obter-se um inventário mais completo de sua diversidade taxonômica, fisiológica e genética. Essas informações poderiam ser utilizadas para a seleção de isolados eficientes para a aplicação em processos biotecnológicos de interesse agrícola ou ambiental ou para a detecção de determinados genes de interesse que poderão ser introduzidos em microrganismos que serão liberados no ambiente (Van Elsas et al., 1997). Sua exploração é viabilizada pelo aumento da taxa de micorrização das plantas, que pode ser conseguido: a) pela inoculação com isolados fúngicos selecionados; b) por práticas de manejo seletivo da população fúngica indígena dos solos agrícolas e; c) mais recentemente, pela aplicação de compostos estimulantes da micorrização (Siqueira et al., 2002).

LITERATURA CITADA

- ABBOT, A.D. ROBSON Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Agriculture, Ecosystems & Environmet**, 35, 121-150, 1991.
- AKKERMANS, A.D.L., VAN ELSAS, J.D.; BRUIJN, F.J. (eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Reseach**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C.A. 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.
- 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.
- CLARK, R.B., ZETO, R.B.S.K.. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. **Soil Biology Biochemistry**, 28, 1505-1511, 1996.
- GOODMAN, R.M.; BINTRIM, J.H.; QUIRINO, B.F.; ROSAS, J.C.; SIMON, H.M.; SMITH, K. **A dirty look: Soil Microflora and Rhizosphere Microbiology**. In: FLORES, H.E.; LYNCH, J.P.; EISSENSTAT, D. (eds.). *Radical Biology: Advances and Prespectives on the function of Plant Roots: American Society of Plant physiologists*, p.219-231, 1997.
- MARSCHENER, H. Role of root growth, arbuscular 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**, 10,73-80, 2000.
- SIMON L., LALONDE M., BRUNS T.D. Specific Amplification of 18S fungal ribossomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**. 54, 2908-2915, 1992.
- SIQUEIRA, J.O., LAMBAIS, M. R., STURNER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares. *Biotecnologia*, **Ciência e desenvolvimento**, n.25, p. 12-21, 2002.
- SMALLA, K.; CRESWELL, L.C.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; WOLTERS, A.; VAN ELSAS, J.D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase hain reaction-mediated amplification. **Journal Applied Bacteriology**, v.74, p.78-85, 1993.
- SMITH, S.E.; ROBSON, A.D. ABBOTT, L.K. **The involvement of mycorrhizas in assesment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use**. In: RANDALL, P.J.; DELHAIZE, E.; RICHARDS, R.A.; MUNNS, R., eds. *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.221-231. (Developments in Plant and Soil science, 50).
- VAN ELSAS, J.D.; MANTYNEN, V.; WOLTERS, A.C. Soil DNA extraction and assesment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. v.24, p.188-195, 1997.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
