



ELIANE A. GOMES^{1*}, CHRISTIANE A. OLIVEIRA², UBIRACI G.P. LANA¹,
NEWTON P. CARNEIRO¹, NADJA M. H. SÁ², CLAUDIA T. GUIMARÃES¹,
IVANILDO E. MARRIEL¹ E VERA M.C. ALVES¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG. ²Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica, CP 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG.
*eliane@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: Fungos micorrízicos, rizosfera, DNA ribossômico, fósforo, *Zea mays*.

Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm uma importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente o fósforo (P). Os fungos micorrízicos absorvem compostos de carbono das plantas hospedeiras e, em contrapartida, conferem um aumento na absorção de nutrientes imóveis pelas plantas, principalmente o fósforo (Goodman et al., 1997). Os estudos indicam que 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 (Abbot e Robson, 1991). As plantas de milho têm uma alta taxa de crescimento e uma alta demanda por nutrientes, apresentando freqüentes interações micotróficas (Clark e Zeto, 1996). A tolerância das plantas a estresses abióticos pode influenciar essa relação simbiótica e a absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (Marchener, 1998). No entanto, pouca informação está disponível sobre os efeitos de genótipos de milho eficientes na absorção de P, na dinâmica do desenvolvimento de FMA. O reconhecimento, identificação e quantificação dos FMAs envolvidos é uma etapa difícil porque esses fungos não crescem em meio de cultura, requerendo vários meses de crescimento em cultura-armadilha, junto com as plantas, sob condições de casa-de-vegetação. Estas diferem das condições do campo e podem interferir com a sobrevivência do fungo (Simon et al., 1992). Como resultado, a distribuição da população no campo pode ser interpretada erroneamente. O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises do DNA permitiu a utilização de diferentes abordagens, favorecendo a análise do perfil e estudos ecológicos da comunidade fúngica de solos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a comunidade de fungos micorrízicos presentes na rizosfera e na raiz de genótipos de milho contrastantes quanto à eficiência na absorção de fósforo. Fragmentos amplificados dos genes 18S ribossomais foram clonados e seqüenciados para a identificação das espécies presentes na rizosfera e na raiz desses genótipos.

Material e Métodos

Foram utilizadas as linhagens L3 e L22, respectivamente eficiente e ineficiente para a absorção de fósforo desenvolvidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. O experimento foi conduzido em um latossolo vermelho-escuro, fase cerrado, com baixo nível de P. Foram coletadas amostras de solo rizosférico e da parte mediana das raízes de linhagens de milho contrastantes para eficiência na absorção de fósforo, durante o florescimento. A avaliação do potencial de micorrização foi feita pela contagem de esporos e identificação de hifas, nos diferentes tratamentos. As raízes foram cuidadosamente separadas do solo e secas rapidamente ao ar. O solo aderido às raízes foi considerado como rizosférico. Quarenta gramas de solo rizosférico foram agitados em um béquer com água e visualizado em lupa para a contagem de esporos. Para a avaliação visual da porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, estas foram lavadas com água, cortadas em fragmentos de 1,0 cm e fixadas em etanol (50% v/v). As raízes fixadas foram clarificadas em solução de KOH 10% (m/v), coradas com azul de trypan (0,01% m/v em lactoglicerol) e espalhadas uniformemente numa placa de Petri com grade milimetrada. A porcentagem de comprimento de raízes com infecção micorrízica foi determinada utilizando-se o método de interseção, conforme descrito por Giovanetti e Mosse (1980). Os dados de contagem de esporos e porcentagem de colonização foram submetidos à análise estatística onde se calculou o erro padrão das médias e o desvio padrão. O DNA total foi extraído de 500 mg de solo rizosférico, utilizando-se o kit FastDNA® spin kit for Soil Protocol (BIO 101) e o DNA das raízes foi extraído utilizando-se o kit DNeasy Plant (Qiagen). Fragmentos do gene 18S dos fungos presentes na rizosfera e nas raízes foi amplificado por uma reação de "nested" PCR, utilizando-se o par de "primers" universais NS1/NS6 e os "primers" NS21/VANS1 (Simon et al., 1992). O produto de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose, purificado utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e clonado no pGEM-T Easy Vector (Promega). Bibliotecas contendo os fragmentos de genes ribossômicos dos fungos micorrízicos foram geradas em células competentes de *E. coli* DH5 α . O DNA plasmidial das colônias com insertos foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989) e seqüenciado utilizando-se o "primer" M13 direto. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit "Big Dye Terminator" v. 3.1 (Applied Biosystems) de acordo com recomendações do fabricante e analisadas no seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As seqüências de DNA foram devidamente processadas e comparadas com as informações de seqüência disponíveis no "GenBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> por meio do programa BlastN (Altschul et al., 1997).

Resultados e Discussão

As duas linhagens de milho estudadas apresentaram diferenças significativas na colonização das raízes por fungos micorrízicos. A linhagem L3, sob condições de estresse de P, apresentou aproximadamente 95% de colonização da raiz, enquanto que a linhagem L22 não apresentou colonização micorrízica quando crescida nessas mesmas condições (Figura 1). No entanto, não foi observada uma diferença significativa no número de esporos presentes no solo rizosférico entre ambas as linhagens. A linhagem L3 apresentou 19 esporos por 40 g de solo distribuídos em quatro gêneros (*Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora*), enquanto que a linhagem L22 apresentou 13 esporos de três gêneros diferentes (*Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora*). A amplificação por PCR de fragmentos do DNA dos fungos da rizosfera e das raízes de ambas as linhagens utilizando os pares de "primers" NS1 e NS6 resultou em fragmentos de 1.450 pares de bases (pb) (Figura 2A) e em fragmentos de 550 pb com os "primers" NS21 e VANS1 (Figura 2B).

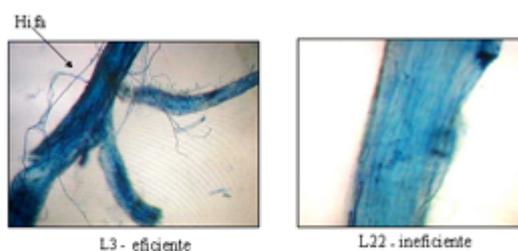


Figura 1. Presença de hifas de fungos micorrízicos na raiz da linhagem L3 e ausência das mesmas na linhagem L22.

A especificidade do par de "primer" NS21 e VANS1 para fungos micorrízicos foi confirmada, uma vez que todos os clones da raiz, 81,6% e 92,2 % dos clones da rizosfera da L3 e L22, respectivamente, pertencem a esse grupo. No entanto, não foi observada diferença na diversidade das espécies de fungos endomicorrízicos coletadas no solo rizosférico de ambas as linhagens. O gênero *Scutelospora* (família Gigasporaceae) correspondeu a 71,2% e 80,4% dos clones seqüenciados das linhagens L3 e L22, respectivamente, predominando a espécie *S. dipapillosa*, presente em 35,2% dos clones da L3 e 42,5% da L22. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos na contagem de esporos do solo rizosférico, onde a família Gigasporacea foi também predominante.

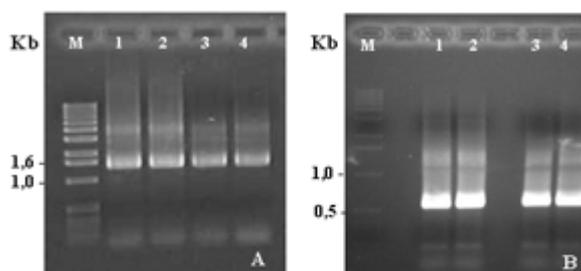


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando os "primers" NS1 e NS6 (A) e NS21 e VANS1 (B). M: 1 Kb ladder, 1: rizosfera da linhagem L3, 2: rizosfera de L22, 3: raiz de L3 e 4: raiz de L22.

Silva et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes analisando espécies de *Paenobacillus* coletadas na rizosfera de quatro cultivares diferentes de milho plantados em dois tipos de solos. Esses autores observaram que o tipo de solo influenciou a estrutura da população de *Paenobacillus* mais drasticamente que os cultivares de milho. Em relação à biblioteca construída a partir da comunidade micorrízica presente na raiz, verificou-se que o número de espécies presentes foi menor quando comparada com o solo rizosférico (Figura 3). Além disso, as espécies *S. pellucida* e *S. weresubiae* foram predominantes na raiz da linhagem eficiente-L3, correspondendo a 44,7% e 39,5% das seqüências válidas, enquanto na linhagem ineficiente-L21 corresponderam a 8,1% e 3,2%, respectivamente.

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 Perspectives 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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. n.p.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F. ; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE methods and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 213-231, 2003

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots.

Applied Environmental Microbiology, v. 54, p. 2908-2915,



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