

Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma

Cândido Barreto de Novais⁽¹⁾, Francisco Adriano de Souza⁽²⁾ e José Oswaldo Siqueira⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: candidobnn@yahoo.com.br, siqueira@cnpq.br ⁽²⁾Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 45, Caixa Postal 285, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: francisco.adriano@cnpms.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) mantidos em cultura pura e avaliar a aplicabilidade da técnica PCR-DGGE desenvolvida para *Gigaspora*, na identificação molecular de espécies de FMA pertencentes a outros gêneros. A caracterização fenotípica das espécies foi realizada de acordo com critérios morfológicos, descritos pela taxonomia, e com uso de descrições originais das espécies presentes na literatura especializada. A análise genotípica foi feita com base na discriminação específica da região V9 do 18S rDNA, que permitiu a diferenciação das espécies e não revelou qualquer diferença entre os isolados geográficos de *Glomus clarum*, e entre os de *Glomus etunicatum*. Isto indica a aplicabilidade da técnica para a avaliação da pureza genética e discriminação de espécies de FMA.

Termos para indexação: caracterização morfológica, identificação molecular, iniciadores, Glomeromycota, taxonomia.

Phenotypic and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal spores from cultures maintained in germplasm collection

Abstract – The objective of this work was to characterize phenotypically and genotypically isolates of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) maintained in pure culture and to evaluate the applicability of PCR-DGGE analysis, developed for *Gigaspora*, for molecular identification of AMF species belonging to other genres. The species phenotypic characterization was done according to morphological criteria, as described by taxonomy, and according to original descriptions of species published in the specialized literature. The genotypic analysis was made through specific discrimination of the V9 region in the 18S rDNA, which allowed the distinction of species and showed no difference among geographical isolates of *Glomus clarum*, and among those of *Glomus etunicatum*. This indicates the applicability of this technique for assessment of genetic purity and discrimination of AMF species.

Index terms: morphological characterization, molecular identification, primers, Glomeromycota, taxonomy.

Introdução

A definição e a identificação taxonômica de espécies em fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são baseadas quase exclusivamente em caracteres morfológicos dos esporos, e pouco tem-se avançado na taxonomia molecular desse grupo de fungos. Apesar de as espécies de FMA apresentarem variações fenotípicas, como cor, forma, dimensão do esporo e detalhes da parede e espessura das camadas dos esporos (Walker & Vestberg, 1998), essas diferenças não são sempre evidentes, o que demanda tempo e experiência em taxonomia para a identificação. Além disso, algumas espécies apresentam dimorfismo, ou

seja, a formação de dois tipos diferentes de esporos, usualmente globoide e acaulosporoide, e nem sempre os esporos obtidos de uma cultura apresentam todas as características necessárias para sua identificação morfológica.

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a pesquisa com FMA, têm permitido identificá-los dentro e fora das raízes, distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie (Avio et al., 2009) e perceber as relações entre espécies e populações, num grau de confiança que usualmente os estudos fenotípicos clássicos não permitem (Stukenbrock & Rosendahl, 2005a, 2005b).

Os métodos diagnósticos com base em PCR abrem a possibilidade de utilizar essas técnicas de maneira rápida, segura e reproduzível, para identificação e controle de qualidade de coleções de FMA, conforme demonstrado com *Gigaspora* (De Souza et al., 2004). A técnica de PCR pode amplificar sequências específicas do DNA, como por exemplo os genes ribossomais (rRNA). A variação dessas sequências pode ser observada por meio de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), que pode gerar perfis de rDNA específicos de espécie para a identificação e detecção de FMA (De Souza et al., 2004). Pela técnica DGGE, os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas de sequências diferentes, podem ser separados (Muyzer & Smalla, 1998).

Assim, a análise por PCR-DGGE é conveniente para a caracterização de FMA, pois evita ou reduz a necessidade de sequenciamento de DNA, que demanda tempo e onera o processo.

O uso de técnicas moleculares, principalmente as baseadas em PCR, como PCR-RFLP – "Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism" (Mergulhão et al., 2008; Avio et al., 2009) –, indicou que essa técnica tem potencial para diferenciar espécies filogeneticamente próximas (Mergulhão et al., 2008). Entretanto, o RFLP separa somente sequências que apresentam polimorfismo nos sítios de restrição reconhecidos pela enzima de restrição utilizada, portanto, é necessária a escolha prévia das enzimas de restrição, para se obter boa resolução com essa técnica. O DGGE/TGGE

("denaturin gradient gel electrophoresis/temperature gradient gel electrophoresis") pode, em alguns casos, separar sequências que apresentam mutações pontuais individuais, ou seja, essa técnica tem maior potencial do que o RFLP para discriminar o polimorfismo entre sequências.

A vantagem da utilização da PCR-DGGE para a caracterização de FMA é que esse grupo de fungos, em geral, tem alto grau de polimorfismo entre as cópias de um mesmo gene no genoma. Por meio do PCR-DGGE, o polimorfismo inter e intraespecífico das sequências gênicas pode ser utilizado para discriminar espécies estreitamente relacionadas (De Souza et al., 2004). A análise PCR-DGGE, aplicada a regiões polimórficas do genoma, pode fornecer impressão digital molecular detalhada e adequada para a identificação e avaliação da pureza de espécies de FMA em coleções de cultura, e é útil também na avaliação da diversidade em amostras ambientais (Opik et al., 2003; De Souza et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente, por meio de análise PCR-DGGE, isolados de FMA mantidos em coleção de cultura e avaliar a aplicabilidade dessa técnica, desenvolvida para *Gigaspora*, para a identificação molecular de espécies de FMA pertencentes a outros gêneros.

Material e Métodos

Os isolados utilizados neste estudo encontram-se listados na Tabela 1. Esporos de FMA foram obtidos de culturas puras, estabelecidas em vasos de 500 g, com

Tabela 1. Espécies, código dos isolados e origem geográfica das espécies utilizadas.

Espécie	Código de acesso	Origem
<i>Glomus clarum</i> (Nicolson & Schenck)	DCS 09	Universidade da Flórida
<i>Glomus clarum</i> (Nicolson & Schenck)	DCS 10	Três Marias, MG/cafeeiro
<i>Glomus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann)	DCS 12	São Sebastião do Paraíso, MG/cafeeiro
<i>Glomus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann)	DCS 13	Três Pontas, MG/cafeeiro
<i>Glomus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann)	DCS 11	Patrocínio, MG/cafeeiro
<i>Acaulospora delicata</i> (Walker, Pfeiffer & Bloss)	DCS 02	Poços de Caldas, MG/áreas de mineração
<i>Paraglomus occultum</i> (Walker) Morton & Redecker	DCS 31	Amazonas/floresta
<i>Kuklospora colombiana</i> (Spain & Schenck) Oehl & Sieverd. (= <i>Entrophospora colombiana</i>)	DCS 03	Cerrado natural
<i>Fuscutata heterogama</i> Oehl, F.A. Souza, L.C. Maia & Sieverd.	DCS 19	Universidade da Flórida
<i>Racocetra gregaria</i> (Schenck & Nicolson; Walker & Sanders) Oehl et al., 2008 (= <i>Scutellospora gregaria</i>)	DCS 18	Universidade da Flórida/ algodão
<i>Fuscutata rubra</i> (Stürmer & J.B. Morton) Oehl et al., 2008 (= <i>Scutellospora rubra</i>)	DCS 27	Três Marias, MG/gramíneas
<i>Gigaspora albida</i> (Schenck & Smith)	DCS 22	Três Marias, MG/gramíneas
<i>Gigaspora gigantea</i> (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe.	DCS 05	Brachiaria decumbens
<i>Gigaspora margarita</i> (Becker & Hall)	DCS 08	Milho

Urochloa decumbens (syn. *Brachiaria decumbens*), em mistura desinfestada de solo Latossolo Vermelho e areia lavada na proporção 2:1, em casa de vegetação, por um período de cinco meses. Esses fungos provieram de cultura mantida por vários anos na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo, da Universidade Federal de Lavras, MG.

Os esporos foram extraídos de 25 mL de solo, por meio da técnica de peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963), seguida de centrifugação em água e, posteriormente, em sacarose (Jenkins, 1964). Após a extração, os esporos foram transferidos para placas de petri e selecionados sob microscópio estereoscópico; em seguida, foram fixados com PVLG (álcool polivinílico, ácido láctico e glicerol) e PVLG + reagente de Melzer (1:1), em lâminas para microscopia. A caracterização das espécies foi feita com base em critérios morfológicos, descritos nas páginas do Invam (2010) e na página do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Agricultura de Szczecin, na Polônia (Blaskowski, 2010), e com utilização das descrições originais das espécies, publicadas na literatura especializada (Nicolson & Gerdemann, 1968; Becker & Hall, 1976; Becker & Gerdemann, 1977; Nicolson & Schenck, 1979; Schenck & Smith, 1982; Koske & Walker, 1985; Walker & Sanders, 1986; Walker et al., 1986; Spain, 1992; Blaszkowski, 1994; Bentivenga & Morton, 1995; Stürmer & Morton, 1999; Morton & Redecker, 2001; Sieverding & Oehl, 2006; Oehl et al., 2008). As imagens foram capturadas com câmera Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China) e, por meio do programa fornecido pelo fabricante, foram determinadas as dimensões dos esporos de FMA. Os esporos foram colocados em água destilada, em contraste com um fundo preto, e as cores foram visualizadas através de microscópio estereoscópico com iluminação de fibra óptica, na temperatura de cor de 3.200 K, com uso do transiluminador KL 1500 LCD/ KL 2500 LCD Light Sources (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Thornwood, EUA). As imagens dos esporos foram comparadas com a carta de cores do Invam, que representa a maior parte das cores dos esporos e suas estruturas, após terem sido montados em PVLG ou reagente PVLG + Melzer. Isto fornece valores de percentagem da fórmula CMYK para que eles sejam comparados com os obtidos por outros pesquisadores.

Os esporos, obtidos em uma nova extração, foram cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico e submetidos a quatro sessões de ultrassom por 15 s, intercaladas por lavagens em água destilada estéril, para eliminar partículas de solo e possíveis microrganismos aderidos superficialmente. Os esporos limpos, aparentemente perfeitos e saudáveis, foram selecionados e transferidos, individualmente ou em grupos de 80 a 100 esporos, para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL; em seguida, os tubos foram armazenados à -20°C. A extração do DNA foi realizada conforme De Souza et al. (2004). Primeiramente, foram utilizados os tubos com esporos individuais e, em seguida, em razão da dificuldade na obtenção de DNA de algumas espécies em quantidade e qualidade suficientes para amplificação por PCR, foram utilizados os tubos com múltiplos esporos. Os esporos individuais também foram usados para avaliar a pureza das culturas das espécies da família Gigasporaceae, em razão da sobreposição de caracteres e difícil separação sob microscópio estereoscópico. As análises moleculares foram realizadas nos Laboratórios de Micologia, Ecologia Microbiana e Multiusuário da Embrapa Agrobiologia.

Para a análise de PCR-DGGE, inicialmente, o DNA dos esporos foi amplificado com o par de iniciadores, NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), (White et al., 1990), que permitem amplificar o DNA ribossomal (rDNA) do início do gene 18S até o início do 25S, que abrangem as duas regiões intergênicas e o gene 5,8S. Para a realização das reações, utilizou-se o volume final de 50 µL, dos quais 3 µL do DNA molde. A mistura do PCR foi composta de 200 µmol L⁻¹ de cada um dos quatro deoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs), 1,5 mol L⁻¹ de MgCl₂, 0,28 µmol L⁻¹ de cada iniciador e 3,5 unidades de polimerase Expand High Fidelity, (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), com a programação: 30 ciclos a 94°C por 60 s, 55°C por 60 s, 72°C por 160 s; e extensão a 72°C por 5 min. Conforme descrito em De Souza et al. (2004), para a obtenção de produtos específicos das espécies da família Gigasporaceae, o DNA dos esporos foi amplificado, inicialmente, com o par de iniciadores, como segue: FM6- 5'-ACCTGCTAAATAGTCAGGCTA-3' e GIGA5.8R- 5'-ACTGACCCTCAAGCAKGTG-3', de, De Souza et al., 2004 e Redecker, 2000, respectivamente. Para as reações, utilizaram-se 25 µL,

dos quais 2 μL do DNA molde. A mistura do PCR foi composta de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada um dos quatro deoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs), 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MgCl_2 , 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada iniciador e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen Carlsbad, EUA), com programação de 30 ciclos a 94°C por 60 s, 60°C por 28 s, e 72°C por 50 s. O produto desse primeiro ciclo de amplificações (NS1-ITS4 ou FM6-GIGA5.8) foi diluído de acordo com a intensidade das bandas visualizadas em eletroforese, após coloração com brometo de etídio. As amostras que não apresentaram bandas ou que tiveram bandas de intensidade fraca não foram diluídas. Quando as bandas apresentaram intensidade forte, a diluição foi de 1:500 e, quando foram bandas extremamente fortes, foram diluídas de 1:1.000. Em seguida, foi realizado um segundo ciclo de amplificações (“nested”), tendo-se utilizado 4 μL dessas diluições como DNA molde. Utilizaram-se, também, diluições dos produtos de PCR realizados com os iniciadores NS1 e ITS4. Nessa segunda amplificação, foi utilizado o iniciador senso NS7- 5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3 (White et al., 1990), que continha um grampo GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGG-3'), em combinação com o anti-senso F1Ra- 5'-CTTTTACTTCCTCTAAATGACC-3' (De Souza et al., 2004). A reação foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente para a enzima Taq DNA polimerase recombinante, tendo diferido apenas no volume final da reação (50 μL), com a programação: 94°C por 2 min; 34 ciclos a 94°C por 45 s; 62°C por 1 min; 72°C por 28 s; e extensão a 72°C por 5 min. Todas as reações foram feitas com o tampão de reação, segundo recomendações do fabricante, em termocicladores PCT-1148 MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad, Hercules, EUA).

A análise por DGGE foi realizada conforme De Souza et al. (2004), com as seguintes modificações: géis com 7% de acrilamida/bis-acrilamida 37:1 e eletroforese a 75 V por 15 horas. Foram aplicados 20 μL do produto de PCR obtido com os iniciadores NS7-GC e F1Ra. Os géis foram corados com brometo de etídio a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 min e descorado em água MilliQ por 15 min, antes da exposição dos géis à luz ultravioleta. As imagens dos géis foram capturadas digitalmente com uso do sistema Gel Logic 100 Imaging System Kodak Software: Kodak1D 3.6, Camera: GL100 (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA). Os perfis de bandas obtidos foram

submetidos à análise de similaridade pelo programa Gelcompar II (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) e o coeficiente de Jaccard com índice de tolerância fixada em 1%.

Resultados e Discussão

As cores dos esporos dos isolados analisados estão de acordo com as descritas nos trabalhos originais e nos sites do Invam (2010) e de Blaskowski (2010) (Tabela 2), tendo havido apenas uma ligeira variação na tonalidade, que pode ter sido resultante de diferenças de percepção entre observadores, de alterações causadas pela idade da cultura, de modificações ocorridas em consequência das condições de cultivo ou, ainda, da combinação desses fatores.

Os isolados tiveram pouca variação no diâmetro dos esporos (Tabela 2), cujas variações de tamanho foram maiores nos isolados de gênero *Gigaspora*, dos quais DCS 08 (*G. margarita*) e DCS 05 (*G. gigantea*) foram os que mais variaram. Os isolados DCS 13 (*Glomus etunicatum*), DCS 31 (*Paraglomus occultum*) e DCS 03 (*Kuklospora colombiana*) foram os que menos variaram. Os diferentes isolados geográficos de *G. clarum* tiveram pouca variação no diâmetro de seus esporos e apresentaram distribuições semelhantes no tamanho. O maior número de esporos desses isolados foi encontrado na faixa de 120 a 160 μm , com tamanho máximo de 202 μm (DCS 09). O Invam apresenta uma distribuição do tamanho de esporos de *G. clarum* com maior ocorrência na faixa de 140 a 220 μm , que pode atingir 260 μm em *G. clarum*-FL979A, entretanto, os esporos desse isolado têm tamanho maior do que o encontrado para a maioria das espécies de *Glomus*. Segundo Blaskowski (1994), esporos globosos e subglobosos de *G. clarum* têm de 70 a 150 μm (média de 106 μm) de diâmetro. Bentivenga et al. (1997) encontraram variação no tamanho e na cor em uma população dessa espécie. Os três isolados geográficos de *G. etunicatum* tiveram diâmetros médios bastante próximos, entre 99 e 104 μm , o que indica uniformidade nessa característica. Os isolados de *G. etunicatum* que tiveram as maiores variações foram DCS 12 e DCS 11. O isolado DCS 13 apresentou a variação de 75 a 118 μm , com erro-padrão de $\pm 1,19$, a qual foi a menor de todas. Esses três isolados tiveram maior número de esporos na faixa de 80 a 100 μm de diâmetro, no entanto, a maior

ocorrência foi encontrada no intervalo de 120 a 140 μm (Invam, 2010) do isolado *G. etunicatum*-NE108A.

O acesso *Racocetra gregaria*, utilizado neste estudo, é originário da Flórida e teve a menor amplitude de variação no tamanho e no diâmetro dos esporos, em comparação aos dados disponíveis no Invam para o isolado BR239, que é originário do Brasil. Os demais isolados também tiveram uma ligeira diferença no tamanho dos esporos, em comparação aos tamanhos das respectivas espécies relatados nos trabalhos originais. No entanto, apesar da variação, o diâmetro dos isolados enquadra-se nos limites estabelecidos nas descrições sobre essas espécies. Além disso, assim como a cor, a dimensão dos esporos também é uma variável contínua e, apesar das medições serem efetuadas em processo mecânico, ela é mais precisa do que a avaliação da cor. O tamanho do esporo é relatado como característica taxonômica estável, assim, se a dimensão dos esporos é válida como característica taxonômica, deve ser consistente e permanecer inalterada por influências externas, embora Bentivenga et al. (1997) tenham sugerido que variações no tamanho e na cor dos esporos podem ocorrer em razão de condições ambientais.

A organização subcelular dos esporos ocorreu de forma similar às descrições originais e às informações compiladas nos sites do Invam 2010 e de Blaskowski (2010) (Figura 1). Mais detalhes da morfologia dos isolados podem ser verificados em Universidade Federal de Lavras (2010).

Os diferentes isolados de *G. clarum*, assim como os isolados de *G. etunicatum*, não tiveram diferenças em seus caracteres morfológicos, o que confirma a identidade taxonômica dessas espécies.

O DNA extraído dos esporos individuais, das espécies dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* sensu stricto, apresentou quantidade e pureza suficiente para amplificação em PCR. No entanto, a amplificação dos demais gêneros só foi possível com a utilização do DNA extraído de múltiplos esporos. Isso ocorreu, possivelmente, em razão das diferenças no número de núcleos e de cópias do gene-alvo no genoma dessas espécies. As amplificações resultaram em produtos de tamanho esperado, quando visualizados em gel de agarose: NS1-ITS4 = 2.300 pb; FM6-GIGA5, 8R = 700 pb, e NS7 GC-F1Ra = 400 pb. Os perfis de DGGE da região V9, da subunidade menor do gene ribossomal (18S rDNA), estão mostrados na Figura 2. Os fragmentos dos 14 isolados migraram em posições diferentes entre 32 e 42% de concentração de desnaturante no DGGE. Em contraste com as demais espécies, o perfil de DGGE de *K. colombiana*, *P. occultum* e *G. etunicatum* tiveram bandas na região com maior concentração de desnaturantes (sequências com maior teor de GC). Os 14 isolados tiveram bandas múltiplas, e os isolados *K. colombiana*, *P. occultum*, *G. etunicatum*, um dos esporos de *Fuscutata rubra* e os esporos de *R. gregaria* tiveram uma única banda

Tabela 2. Distribuição do tamanho, média \pm erro-padrão do diâmetro de 50 esporos e cores dos isolados de FMA, da coleção da Universidade Federal de Lavras (Ufla) e de suas respectivas espécies de referência em Invam (2010) e Blaskowski (2010) e em suas descrições originais.

Isolado	Distribuição do tamanho (μm)				Coloração dos esporos em água ⁽¹⁾			
	Ufla	Invam	Blaskowski	Descrição original	Ufla		Invam	
<i>Glomus clarum</i> - 09		100–260(182)	70–150(106)	68–290	0/10/20/0	0/10/60/0	0/10/20/0	0/10/60/0
<i>Glomus clarum</i> -10	100–198(147 \pm 3,30)	100–260(182)	70–150(106)	68–290	0/10/20/0	0/10/60/0	0/10/20/0	0/10/60/0
<i>Glomus etunicatum</i> -11	82–145(103 \pm 2,08)	60–160(129)	75–135(95)	68–162	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>Glomus etunicatum</i> -12	77–198(104 \pm 3,21)	60–160(129)	75–135(95)	68–162	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>Glomus etunicatum</i> -13	75–118(99 \pm 1,19)	60–160(129)	75–135(95)	68–162	0/40/100/0	0/60/100/0	0/10/90/5	0/60/100/0
<i>Paraglomus occultum</i> - 31	63–100(78 \pm 1,22)	60–120(93)	50–130(90)	39–121(74)	Hialino	Hialino	Hialino	Branco
<i>Acaulospora delicata</i> - 02	63–100(95 \pm 1,80)	80–120(99)	-	80–150	0/0/20/0	0/0/30/0	0/5/10/0	0/5/20/0
<i>Kuklospora colombiana</i> - 03	88–141(113 \pm 1,63)	100–140(121)	-	50–125(70)	0/20/60/10	0/40/60/10	0/20/60/0	0/10/60/0
<i>Fuscutata heterogama</i> - 19	149–204(182 \pm 1,84)	120–200(159)	-	160–260	0/60/100/10	40/80/100/0	0/60/100/10	40/80/100/10
<i>Racocetra gregaria</i> -18	289–368(334 \pm 3,04)	380–520(473)	-	250–448	40/80/80/0	80/80/100/10	20/80/100/10	40/80/80/0
<i>Fuscutata rubra</i> - 27	148–198(176 \pm 1,03)	140–220(180)	-	140–220(180)	40/80/80/0	40/80/100/10	0/60/100/0	20/80/100/0
<i>Gigaspora albida</i> - 22	194–273(241 \pm 3,66)	200–280(250)	-	143–350(265)	0/0/15/0	0/0/20/0	0/0/15/0	5/0/20/0
<i>Gigaspora gigantea</i> - 05	240–411(377 \pm 4,87)	240–400(324)	250–380(300)	345–398	0/10/40/0	10/0/100/0	10/0/100/0	20/0/100/0
<i>Gigaspora margarita</i> - 08	204–369(254 \pm 5,92)	260–400(321)	260–405(357)	260–480	0/0/5/0	0/10/40/0	0/5/30/0	0/10/40/0

⁽¹⁾Os valores representam os percentuais de ciano, magenta, amarelo, preto.

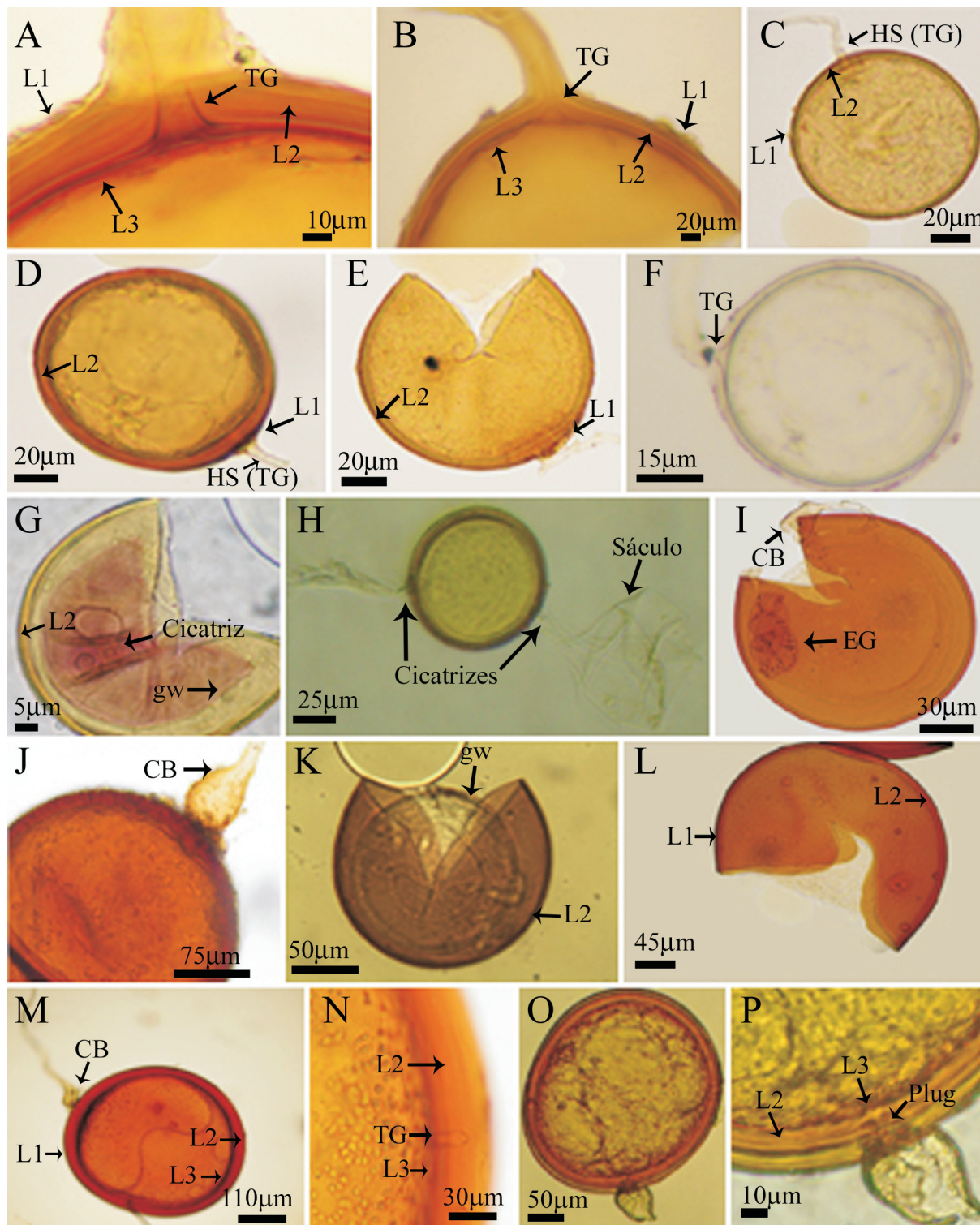


Figura 1. Caracterização morfológica de 14 isolados, da coleção de FMA utilizada: A, DCS09 - *G. clarum*; B, DCS10 - *G. clarum*; C, DCS11 - *G. etunicatum*; D, DCS12 - *G. etunicatum*; E, DCS13 - *G. etunicatum*; F, DCS31 - *P. occultum*; G, DCS02 - *A. delicata*; H, DCS03 - *K. colombiana*; I, DCS19 - *F. heterogama*; J, DCS18 - *R. gregaria*; K, DCS27 - *F. rubra*; L, DCS22 - *G. albida*; M e N, DCS05 - *G. gigantea*; O e P, DCS08 - *G. margarita*. L1, L2 e L3, camadas da parede do esporo; TG, tubo germinativo; HS (TG), hifa suspensora (tubo germinativo); gw, parede germinativa; CB, célula bulbo; EG, escudo germinativo.

intensa. As espécies tiveram diferenças nos perfis de DGGE.

Os diferentes isolados de *G. clarum* tiveram o mesmo padrão de bandas e não puderam ser discriminados entre si, mas puderam ser separados das outras espécies, inclusive as pertencentes ao mesmo gênero, tal como os isolados de *G. etunicatum*, que também tiveram padrão de similaridade de 100% (Figura 3 A). Os isolados de *G. clarum* e de *G. etunicatum* tiveram pouca variação morfológica. Portanto, não foi possível a discriminação entre os isolados geográficos de mesma espécie. Para esses isolados, a caracterização molecular com uso de perfis de DGGE da região V9 do 18S rDNA também indicou a similaridade entre os isolados e pode ser utilizada para identificação molecular dessas morfoespécies. Estudos sobre identificação molecular e variabilidade genética, em espécies reconhecidas morfológicamente, ainda são escassos para esse grupo de fungos. Recentemente, Avio et al. (2009) avaliaram a

diversidade genética e fenotípica de estirpes geográficas de *Glomus mosseae*. Dos isolados testados, todos apresentaram o mesmo perfil de restrição da região ITS para a enzima *Hinf*I. Com base nos resultados, esses autores sugeriram que essa metodologia poderia ser utilizada para identificação dessa morfoespécie. A diversidade genética avaliada por inter-repetições de sequência simples (ISSR, “Inter Simple Sequence Repeats”) indicou níveis de variabilidade genética superiores a 50%, e essa variação foi consistente com estudos anteriores sobre compatibilidade vegetativa e diversidade funcional dos isolados avaliados.

Os diferentes esporos obtidos na mesma cultura do isolado DCS 05 - *Gigaspora gigantea* tiveram, entre si, o mesmo comportamento migratório, com 100% de similaridade para os padrões de bandas obtidos (Figura 3 B). O mesmo resultado foi obtido entre os diferentes esporos de cada isolado de DCS 08 - *G. margarita* e DCS 22-*G. albida*. No entanto, o padrão

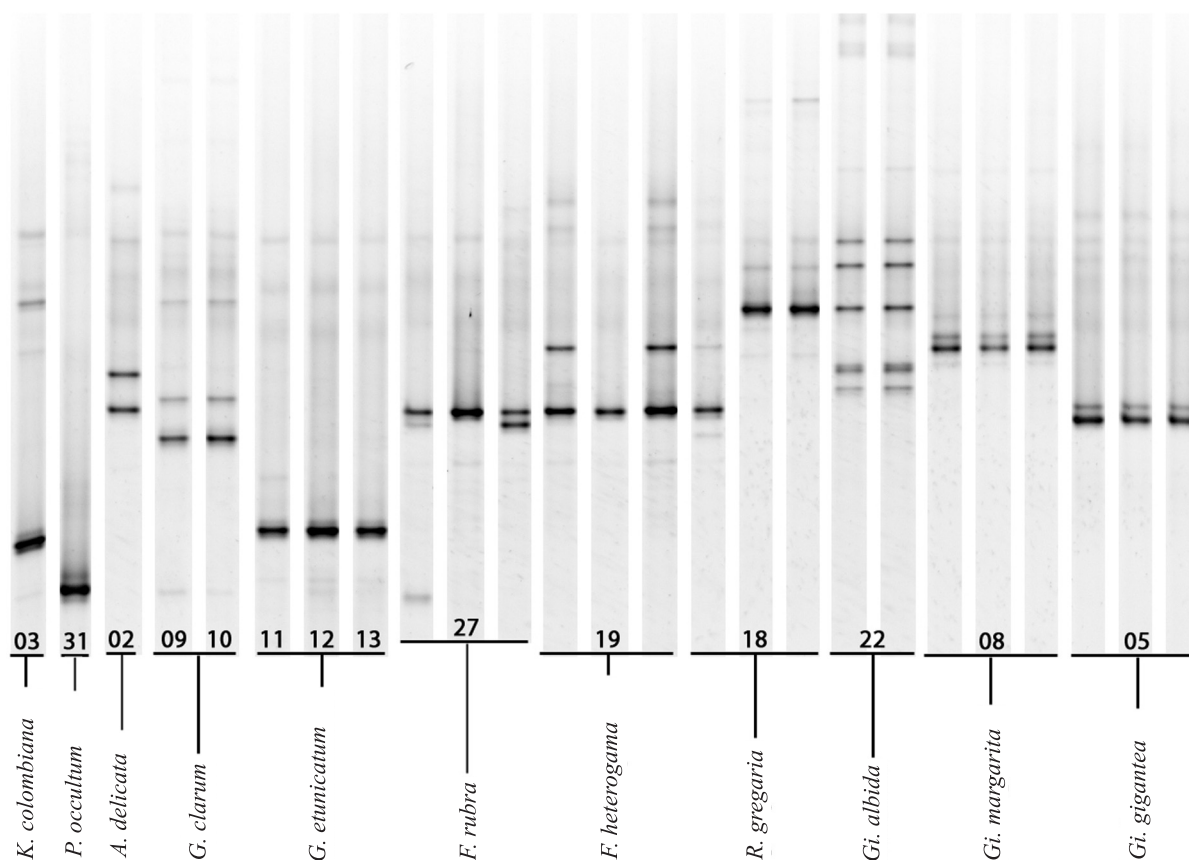


Figura 2. Perfis de DGGE da região V9 da subunidade menor do gene ribossômico (18S rRNA), dos 14 isolados da coleção de FMA utilizada.

de banda obtido por um dos esporos (DCS18R3) do isolado DCS18 - *R. gregaria* (Figura 3 C) diferiu completamente dos padrões obtidos pelos outros esporos deste isolado (DCS18R1 e DCS18R2). O esporo DCS18R3 apresentou maior similaridade com esporos do isolado DCS19 de *F. heterogama* (DCS19E1 e DCS19E3). Resultado similar ocorreu

com o padrão obtido por um dos esporos do isolado DCS19 de *F. heterogama* (DCS19E2), que diferiu do padrão obtido pelos demais esporos desse isolado. Em *F. rubra*, os esporos obtidos do mesmo vaso tiveram padrões de bandas diferentes, apesar de não haver diferenças fenotípicas. Esses resultados evidenciam a capacidade da técnica de PCR-DGGE

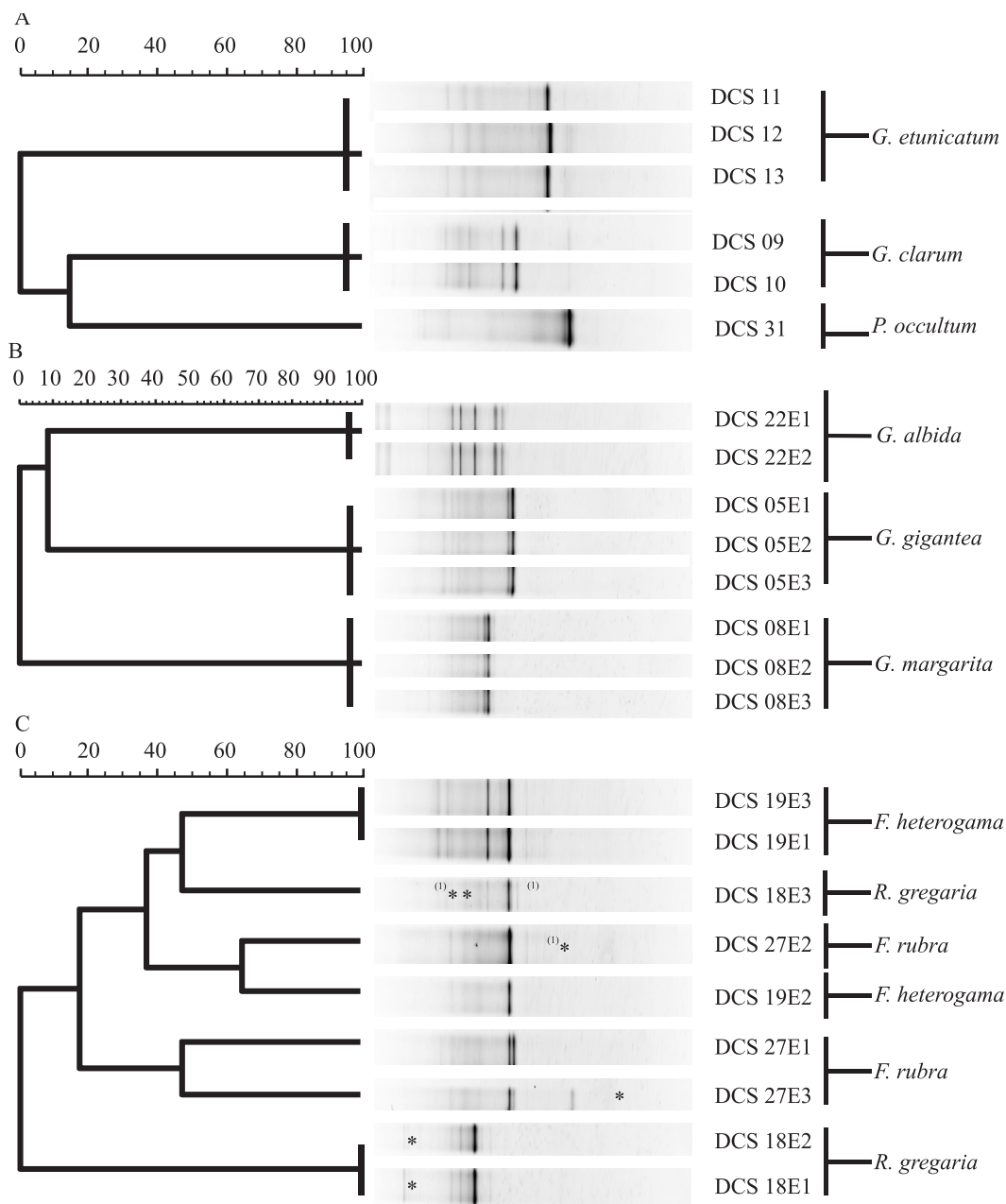


Figura 3. Dendrograma da similaridade entre perfis de bandas de PCR-DGGE de: A, seis estirpes de *Glomus*; B, três estirpes de *Gigaspora*; e C, duas estirpes de *Fucostata* e uma de *Racocetra*. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas por meio do coeficiente de Jaccard. (¹)Bandas muito fracas que foram utilizadas na análise.

de ser utilizada para a diagnose da pureza genética e para a discriminação de espécies ou subespécies geneticamente distintas. Assim, considere-se que os vasos de cultivo dos isolados DCS 05, DCS 08 e DCS 22 estavam puros, no entanto, constatou-se que as culturas dos isolados DCS18, DCS19 e DCS27 podem representar populações de espécies ou subespécies geneticamente distintas não detectadas na caracterização morfológica. Os padrões de bandas relatados sobre os esporos de *R. gregaria* (DCS18 R1 e DCS18 R2) e *F. heterogama* (DCS19 E1 e DCS19 E3) foram semelhantes aos relatados por De Souza et al. (2005).

Os padrões de bandas obtidos para os diferentes isolados geográficos de *G. clarum* e *G. etunicatum* são uma indicação de que o polimorfismo presente na região gênica analisada não permitiu a diferenciação dos isolados, e eles não apresentaram variação, o que é indicação de que as culturas apresentam padrão genético similar. No entanto, nas culturas dos isolados de *R. gregaria*, *F. rubra* e *F. heterogama* houve variação entre os padrões de bandas de esporos obtidos do mesmo vaso, o que é indicação de que as culturas têm variação no padrão genético. Para as espécies de *Glomus*, os perfis obtidos foram gerados a partir de múltiplos esporos e, a partir deles, é possível deduzir somente que os esporos analisados dessas culturas apresentam o mesmo padrão nas diferentes estirpes avaliadas. As análises realizadas com espécies de *Fuscutata* e *Racocetra* foram conduzidas com esporos individualizados e podem indicar contaminação e segregação genética entre os esporos das culturas avaliadas.

A variabilidade genética entre diferentes indivíduos (esporos) de um mesmo isolado foi relatada recentemente em *Glomus intraradices* (Angelard et al., 2010); até então, culturas desses fungos eram consideradas linhagens clonais. Evidências de recombinação e também da coexistência de linhagens clonais, entre *Glomus intraradices* originários de uma mesma área experimental, foram relatadas por Croll & Sanders (2009). Esses autores determinaram a variabilidade genética pelo emprego de múltiplos marcadores moleculares. No caso dos perfis de DGGE, obtidos a partir da análise de uma região específica do 18S rDNA, espera-se uma menor capacidade de discriminação entre estirpes geneticamente próximas. Como exemplo, temos os resultados obtidos por Avio et al. (2009), discutidos anteriormente.

Para *Gigaspora*, *Racocetra* e *Fuscutata*, não há evidência direta de troca de material genético, somente evidência molecular de recombinação (De Souza, 2005). Variação genética no perfil de PCR-DGGE da região V9 do 18S rDNA de esporos individualizados de duas entre 48 culturas de *Gigaspora* foram relatadas por De Souza et al. (2004). Esses autores sugeriram que as diferenças eram provenientes do coisolamento de morfoespécies geneticamente distintas, pois, à época, não havia evidência de recombinação. Porém, essa questão pode ser avaliada por meio de análise de culturas monoespóricas.

Assim, os resultados obtidos para os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* sensu stricto são evidência da necessidade de obtenção de culturas monoespóricas para elucidar esses resultados. No entanto, esse é um procedimento laborioso e difícil de ser obtido com algumas espécies de FMA.

A coleção de FMA utilizada foi estabelecida com uso de culturas armadilha, que constituem a forma mais comum de isolamento de FMA de amostras de campo. Esse sistema de isolamento tem como característica a possibilidade de se isolar, simultaneamente, mais de uma espécie morfológicamente similar, na mesma cultura, cujas diferenças só podem ser verificadas mediante a montagem de lâmina e análise minuciosa ao microscópio. Nos casos em que isso ocorre, a diferenciação posterior dessas espécies com base na morfologia dos esporos pode ser difícil, principalmente entre espécies em que há sobreposição de caracteres morfológicos, o que torna necessário fazer purificações adicionais, por meio da obtenção de culturas monoespóricas. Sequências obtidas a partir de isolados indevidamente identificados podem resultar em falsas identificações, como foi relatado sobre diversos isolados de *Gigaspora* (Lanfranco et al., 2001; De Souza et al., 2004). Por exemplo, o isolado DAOM197198, tido como modelo para pesquisas na área de genética e biologia molecular de FMA, referido como *Glomus intraradices*, não é *G. intraradices* (Stockinger et al., 2009). Esses relatos confirmam a sobreposição de algumas características morfológicas, entre algumas espécies de FMA, e são indicativos da necessidade de complementação da identificação ou caracterização com dados moleculares.

A técnica de PCR-DGGE foi capaz de discriminar o polimorfismo inter e intraespecífico da região V9 do 18S rDNA dos fungos estudados, e confirmou resultados anteriores obtidos com espécies do gênero *Gigaspora* (De Souza et al., 2004).

Conclusões

1. Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares avaliados têm características morfológicas similares às encontradas nas espécies descritas pela taxonomia convencional.

2. A discriminação dos produtos da amplificação obtidos da região V9 do 18S rDNA permite a discriminação de todas as espécies estudadas pela técnica do PCR-DGGE e é consistente com a identificação taxonômica.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa; e à Dra. Fernanda Covacevich, pela valiosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

ANGELARD, C.; COLARD, A.; NICULITA-HIRZEL, H.; CROLL, D.; SANDERS, I.R. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. **Current Biology**, v.20, p.1216-1221, 2010.

AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p.242-253, 2009.

BECKER, W.N.; GERDEMANN, J.W. *Glomus etunicatus* sp. nov. **Mycotaxon**, v.6, p.29-32, 1977.

BECKER, W.N.; HALL, I.R. *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. **Mycotaxon**, v.4, p.155-160, 1976.

BENTIVENGA, S.P.; BEVER, J.D.; MORTON, J.B. Genetic variation of morphological characters within a single isolate of the endomycorrhizal fungus *Glomus clarum* (Glomaceae). **American Journal of Botany**, v.84, p.1211-1216, 1997.

BENTIVENGA, S.P.; MORTON, J.B. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia**, v.87, p.719-731, 1995.

BLASZKOWSKI, J. **Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), *Endogone* and *Complexipes* species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland**. Disponível em: <<http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>>. Acesso em: 23 ago. 2010.

BLASZKOWSKI, J. *Glomus clarum* (Glomales, Zygomycetes), a new vesicular-arbuscular fungus to Poland. **Mycotaxon**, v.52, p.99-107, 1994.

CROLL, D.; SANDERS, I.R. Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. **BMC Evolutionary Biology**, v.9, n.13, 2009. Doi:10.1186/1471-2148-9-13.

DE SOUZA, F.A. **Biology, ecology and evolution of the family Gigasporaceae, arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)**. 2005. 51p. Thesis (Doctor) - University of Leiden, Leiden.

DE SOUZA, F.A.; DECLERCK, S.; SMIT, E.; KOWALCHUK, G.A.; Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). **Mycological Research**, v.109, p.697-706, 2005.

DE SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; VEEN, J.A. van; SMITH, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity in an arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.1413-1424, 2004.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.

INVAM. **International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi**: species description. Morgantown: West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station, 2000. Disponível em: <<http://www.invam.caf.wvu.edu/>>. Acesso em: 23 ago. 2010.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, p.692, 1964.

KOSKE, R.E.; WALKER, C. Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls. **Mycologia**, v.77, p.702-720, 1985.

LANFRANCO, L.; BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; SOUZA, M.; MORTON, J.B.; BONFANTE, P. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytologist**, v.179, p.169-179, 2001.

MERGULHÃO, A.C.D.S.; SILVA, M.V. da; FIGUEIREDO, M.D.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**, v.58, p.341-344, 2008.

MORTON, J.B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, v.93, p.181-195, 2001.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.

NICOLSON, T.H.; GERDEMANN, J.W. Mycorrhizal *Endogone* species. **Mycologia**, v.60, p.313-325, 1968.

NICOLSON, T.H.; SCHENCK N.C. Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. **Mycologia**, v.71, p.178-198, 1979.

- OEHL, F.; DE SOUZA, F.A.; SIEVERDING, E. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhizal-forming Glomeromycetes. **Mycotaxon**, v.106, p.311-360, 2008.
- OPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; KOLJALG, U.; ZOBEL, M.; SEM, R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. **New Phytologist**, v.160, p.581-593, 2003.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, v.10, p.73-80, 2000.
- SCHENCK, N.C.; SMITH, G.S. Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. **Mycologia**, v.74, p.77-92, 1982.
- SIEVERDING, E.; OEHL, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.80, p.69-81, 2006.
- SPAIN, J.L. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). **Mycotaxon**, v.43, p.331-339, 1992.
- STOCKINGER, H.; WALKER, C.; SCHÜSSLER, A. 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v.183, p.1179-1187, 2009.
- STUKENBROCK, E.H.; ROSENDAHL, S. Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. **Molecular Ecology**, v.14, p.743-752, 2005a.
- STUKENBROCK, E.H.; ROSENDAHL, S. Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coastal grassland. **Mycorrhiza**, v.15, p.497-503, 2005b.
- STÜRMER, S.L.; MORTON, J.B. *Scutellospora rubra*, a new arbuscular mycorrhizal species from Brazil. **Mycological Research**, v.103, p.949-954, 1999.
- WALKER, C.; PFEIFFER, C.M.; BLOSS, H.E. *Acaulospora delicata* sp. nov. - an endomycorrhizal fungus from Arizona. **Mycotaxon**, v.25, p.621-628, 1986.
- WALKER, C.; SANDERS, F.E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. **Mycotaxon**, v.27, p.169-182, 1986.
- WALKER, C.; VESTBERG, M. Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstansum* and *G. fistulosum*. **Annals of Botany**, v.82, p.601-624, 1998.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 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, 1990. p.315-322.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Fungos micorrízicos arbusculares-FMAs**. Disponível em: < <http://www.dcs.ufla.br/micorriza/>>. Acesso em: 24 ago. 2010.

Recebido em 26 de abril de 2010 e aprovado em 20 de julho de 2010