



CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS

**ANASTOMOSE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E FUNCIONAL DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

LAVRAS – MG

2012

CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS

**ANASTOMOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. José Oswaldo Siqueira

Coorientadores

Dr. Orivaldo José Saggin Júnior

Dra. Manuela Giovannetti

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Novais, Cândido Barreto de.

Anastomose e caracterização molecular e funcional de fungos micorrízicos arbusculares / Cândido Barreto de Novais. – Lavras : UFLA, 2012.

161 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José Oswaldo de Siqueira.

Bibliografia.

1. Isolados geográficos de FMAs. 2. RFLP. 3. *Glomus*. 4. *Gigaspora*. 5. *Acaulospora*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.20452482

CÂNDIDO BARRETO DE NOVAIS

**ANASTOMOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de maio de 2012.

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA
Dra. Fernanda Covacevich	CONICET - Argentina
Dr. Orivaldo J. Saggin Júnior	Embrapa Agrobiologia
Dra. Manuela Giovannetti	Universidade de Pisa-Itália

José Oswaldo Siqueira
Orientador

LAVRAS - MG

2012

*Aos meus pais **Clodoaldo**[†] e **Maria** que mesmo sem entender bem o porquê de tantos anos de estudo, contribuíram para que tudo transcorresse da melhor forma; à minha irmã **Jackelyne** pelo apoio e incentivo constantes.*

OFEREÇO

*Aos meus grandes amigo(a)s **Amanda Neves, Cristiane, Evandro, Gabriela Pinheiro, Gláucia, Guilherme Angelini, Krisle, Renata, Renato Valadares, Silvia, Wardsson e Wilmar**, por todo apoio, carinho, respeito e cumplicidade.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG: PROCESSO CAG 20008-09), pela concessão de bolsa de estudos;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto;

Ao professor José Oswaldo Siqueira, pela orientação, apoio, confiança e por seu incansável trabalho de tornar minhas idéias mais claras e objetivas;

A Manuela Giovannetti pela orientação e por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Pisa.

Aos pesquisadores da Universidade de Pisa, Luciano Avio, Alessandra Turrini em especial a Cristiana Sbrana, por todo apoio e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo;

A professora Fátima Maria de Souza Moreira pela colaboração e cordialidade durante todos esses anos e principalmente por ter possibilitado o estágio sanduíche na Universidade de Pisa, intervindo e agilizando a documentação;

Ao pesquisador Orivaldo J. Saggin Júnior pela coorientação, pelo direcionamento, apoio, e principalmente pela amizade, oportunidades, confiança e consideração e, por ter possibilitado o suporte para as realizações dos trabalhos na Embrapa Agrobiologia;

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, e Dirce por toda amizade e colaboração;

A pesquisadora Eliane Maria Ribeiro por todo apoio e carinho;

Ao técnico Itamar Garcia por toda amizade e colaboração;

Aos amigos da Embrapa Agrobiologia: Paulo, Leona, Veralú, Emerson,

A Fernanda Covacevich por estar sempre disposta a me ajudar;

Aos amigos Diego Brasileiro e Rossi, companheiros de república, por toda convivência e amizade;

Aos amigos adquiridos durante o curso, Amanda, Analuiza, Bruno, Cleide, Fernanda, Jerusa, Jessé, Kátia, Leandro, Ligiane, Márcia, Maryeimy, Michele Rocha, Michele Silva, Noelly, Paula Jaramillo, Paulo, Pedro Martins, Plínio, Rogério, Romildo, Sílvia, Teotônio, Thiago, Silvio, José Geraldo, Éderson, Yvonei, Bruno Dias, Évio, Euzelina, Ênio, Valdete, Vitória, Maurício, Josinaldo, Geila, Letuzia, Gabriela, Carla, Daniela e demais colegas do DCS pela convivência, amizade e colaboração.

Agradecimento especial aos amigos do alojamento da Embrapa Agrobiologia por toda convivência e amizade;

Aos grandes amigos e amigas, Carlos, Jaciane, Paulo, Wallace, Ronan, Priscila, Fábio, Cássia, Lú, Keila, Leona, Vívian ;

Agradecimento especial aos meus amigos Juliana, Guilherme e Eduardo por todos os momentos de felicidade que têm me proporcionado.

Aos meus pais, Clodoaldo[†] e Maria, e aos meus irmãos, Jackelyne, Karina, Cida, Célia, Neidelene, Reinaldo, Luiz e Renan por todo apoio, carinho, amo vocês.

A minha irmã Jackelyne, por sempre acreditar em mim, me apoiando e dando suporte para cada etapa da minha vida, por proporcionar-me entusiasmo e confiança. Com certeza irei compartilhar contigo cada conquista, amo você.

A Deus por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho e por todas as oportunidades de minha vida;

MUITO OBRIGADO POR TUDO

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o!

Nietzsche

RESUMO GERAL

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) estão associados com a maioria das espécies de plantas e desempenham um papel importante na nutrição, crescimento e ecologia das plantas. Os FMAs apresentam grande variabilidade genética e funcional entre diferentes linhagens, inclusive aquelas que pertencem à mesma espécie, contudo, muito pouco se conhece a este respeito e sobre a compatibilidade vegetativa e formação de anastomose nestes fungos, principalmente em linhagens tropicais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a compatibilidade genética e formação de anastomose entre hifas provenientes de esporos individualmente germinados de 36 linhagens tropicais de FMAs. Assim como combinar os métodos taxonômicos baseados nos caracteres morfológicos com aqueles baseados na biologia molecular por meio de PCR-RFLP para caracterizar 58 linhagens e investigar possíveis variações genéticas, fenotípicas e funcionais entre as diferentes linhagens de diferentes Gêneros e de mesma espécie. As análises de compatibilidade e ocorrência de anastomose detectaram a fusão entre hifas pertencentes ao mesmo e de diferentes esporos do mesmo isolado em quatro espécies do gênero *Glomus* e duas de *Acaulospora*, mas não foram observadas anastomoses entre hifas dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*. A frequência de anastomose foi consideravelmente observada em *Glomus* e *Acaulospora*, essa capacidade de esporos de alguns Gêneros de FMAs germinarem e crescerem pré-simbioticamente e ao se encontrarem formarem anastomoses viáveis, perfeitas é importante para que eles possam acessar os recursos de nutrientes que fluem na rede micorrízica e aumentar as chances de sobrevivência na ausência de um hospedeiro. Os estudos sobre a caracterização molecular dos genes 18S e 5.8S rDNA e regiões intergênicas obtidas por meio de PCR-(TaqI, MspI, HinfI)-RFLP permitiram estabelecer um conjunto de comparações entre os perfis de bandas obtidos, que diferiram entre linhagens pertencentes ao Gênero *Glomus* e da família *Gigasporaceae* e revelaram a possibilidade de variabilidade genética entre linhagens de *G. etunicatum*, *E. colombiana*, *A. morrowiae* e *S. heterogama*. A avaliação da variabilidade funcional revelou que as linhagens analisadas são agrupadas em eficientes e não eficientes em estimular o crescimento do milho. Todas as linhagens colonizaram abundantemente o milho, proporcionando efeitos diferenciados no crescimento e teor de P nas folhas. Há diferenças marcantes entre as linhagens, mas estas podem ser maiores entre linhagens da mesma espécie do que entre espécies distintas definidas com base fenotípica. Nossos resultados relatam pela primeira vez, um robusto conjunto de informações biológicas, moleculares, morfológicas e funcionais de linhagens tropicais de FMAs.

Palavras-chave: RFLP. Isolados geográficos. *Glomus*. *Gigaspora*. *Acaulospora*.

GENERAL ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are associated with most of the plant species and play an important role in the nutrition of plant growth and ecology. The AMF present great genetic and functional variability among different lineages, including those belonging to the same species, however, a little is known about this and about the formation and vegetative compatibility of anastomosis in these fungi, especially in tropical lineages. This study had as objective to evaluate the genetic compatibility and formation of anastomosis between hyphae derived from individually germinated spores of 36 tropical lineages of AMF. So how to combine the taxonomic methods based on morphological characters with those based on molecular biology by PCR-RFLP to characterize 58 lineages and to investigate possible genetic variations, phenotypic and functional between the different lineages of different genus and the same species. The compatibility analysis and anastomosis occurrence detected the fusion between hyphae belonging to the same and different spores of the same isolated in four species of the *Glomus* and two of *Acaulospora* genus, but were not observed anastomosis between hyphae of the *Gigaspora* and *Scutellospora* genus. The anastomosis frequency was significantly observed in *Glomus* and *Acaulospora*, this spores ability of AMF genus, germinate and grow pre-symbiotically and when meet form viable anastomosis, perfect and important for they can access the nutrients resources that flow into mycorrhizal network and increase the opportunities of survival in the absence of a host. Studies on the molecular characterization of the 18S and 5.8S rDNA genes and intergenic regions obtained by PCR-(TaqI, MspI, HinfI)-RFLP allowed to establish a set of comparisons between the profiles of bands obtained, which differ between lineages belonging to the *Glomus* genus and *Gigasporaceae* family and revealed the possibility of genetic variability among *G. etunicatum*, *E. colombiana*, *A. morrowiae* and *S. heterogama* lineages. The assessment of functional variability revealed that the lineages analyzed are grouped into efficient and inefficient in stimulating the corn growth. All lineages colonized abundantly the corn, providing different effects on growth and P content in the leaves. There are marked differences between lineages, but these may be higher between lineages of the same species than between different species defined with phenotypic base. The results report for the first time, a robust set of biological information, molecular, morphological and functional of tropical lineages from AMF.

Keywords: RFLP. Geographical isolates. *Glomus*. *Gigaspora*. *Acaulospora*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1	As Micorrizas Arbusculares 17
2.2	Germinação de esporos e desenvolvimento do micélio pré-simbiótico22
2.3	Anastomose em FMAs 26
2.4	Identificação de FMAs 28
2.5	Classificação dos FMAs 31
2.6	Diversidade genética e funcional de FMAs 34
3	MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1	A multiplicação dos FMAs 37
3.2	Caracterização morfológica 40
3.3	Caracterização molecular 43
3.4	Variabilidade funcional das linhagens de FMAs 46
3.5	Ocorrência e frequência de anastomoses 52
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS 56
	REFERÊNCIAS 60
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 68	
ARTIGO 1	Vegetative compatibility and anastomosis formation within and among individual germings of tropical isolates of acaulospora and glomus (<i>Glomeromycota</i>) 68
ARTIGO 2	Caracterização molecular de linhagens tropicais de fungos <i>Micorrizicos arbusculares</i> 100
ARTIGO 3	Genetic and functional inter and intraspecific variability of tropical isolates of <i>Arbuscular mycorrhizal fungi</i> 133

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pertencem ao Filo *Glomeromycota* (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001) e são simbiontes radiculares de extrema importância para o funcionamento da maioria dos ecossistemas terrestres e formam as micorrizas arbusculares (MA) que são simbioses mutualistas com as raízes da maioria das plantas. Essa associação é provavelmente a simbiose terrestre mais difundida que se conhece, sendo caracterizada pela penetração inter e intracelularmente do micélio fúngico nas raízes do hospedeiro sem causar alterações visíveis. Os efeitos benéficos dessa associação para as plantas são bem documentados e geralmente atribuídos, principalmente, à melhora da capacidade de absorção de nutrientes. Esse efeito é particularmente observado com aqueles nutrientes de baixa mobilidade no solo, como P, Zn e Cu (SMITH; READ, 2008). Além do efeito nutricional, é atribuído a essa simbiose a capacidade de reduzir danos causados por patógenos nas raízes (PENA et al., 2006) e de aumentar a tolerância das plantas a vários tipos de estresses (AROCA; PORCEL; RUIZ-LOZANO, 2007).

Os FMAs são biotróficos obrigatórios, cujo crescimento e desenvolvimento das hifas dependem da associação simbiótica com as raízes vivas, o que é a maior limitação para o avanço no conhecimento sobre esses fungos. Além disso, o caráter biotrófico obrigatório associado à ausência de fase sexuada conhecida, faz com que a identificação e classificação desses fungos sejam baseadas quase que exclusivamente nas características fenotípicas de seus esporos. Os esporos mostram diferenças em muitos caracteres morfológicos e estruturais como forma, cor, tamanho, ontogênese, paredes, estrutura da hifa de sustentação e modo de germinação, que formam a base da taxonomia clássica

desses fungos. No entanto, a evolução dos estudos tem mostrado que essas diferenças não são sempre evidentes, demandando tempo e muita experiência taxonômica na identificação. Além disso, algumas espécies apresentam dimorfismo e nem sempre os esporos obtidos de uma cultura apresentam todas as características necessárias para sua identificação ao nível de espécie. A caracterização fenotípica não possibilita uma fácil distinção das diferentes espécies de FMAs durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares e ainda pode ser influenciada por condições locais e pela diferença de maturidade dos esporos introduzindo problemas para identificação precisa de FMAs.

Como consequência dessas limitações para a identificação, vários estudos apresentam descrições inadequadas de espécies e identificações erradas. Adicionalmente algumas espécies têm sido descritas como sendo sinônimas a espécies previamente descritas, como exemplo tem-se *Gi. ramisporophora* e *Gi. candida*, consideradas pela análise morfológica como sinônimas, respectivamente, de *Gi. margarita* e *Gi. rosea* (BENTIVENGA; MORTON, 1995). Souza et al. (2004), estudando um método de identificação de espécies do gênero *Gigaspora* baseado na discriminação do polimorfismo inter e intraespecífico da região V9 do 18S rDNA técnica de *PCR-DGGE* (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) verificou que essas espécies se diferenciam claramente daquelas com as quais foram sinonimizadas. Baseado nessa análise, a espécie *Gi. ramisporophora* apresenta maior semelhança com *Gi. albida* do que com a *Gi. margarita*, apesar da análise fenotípica não revelar essas diferenças. Dessa forma, o uso de técnicas moleculares tem contribuído para aprimorar a taxonomia dos FMAs, permitindo a identificação de vários táxons através do uso de iniciadores específicos, o que possibilita a diferenciação entre glomerosporos.

Entretanto, apesar dos métodos moleculares mostrarem-se adequados para solucionar algumas limitações da identificação morfológica de espécies (WALKER et al., 2007) a adequação dos marcadores genéticos moleculares para

abranger todas as comunidades naturais amostradas têm falhado por apresentar resolução inadequada de táxons. Isso é consequência de regiões conservadas da sequência de DNA ou da incapacidade de detectar linhagens, ou ainda da falta de seletividade dos iniciadores da *PCR* (reação em cadeia da polimerase) (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001; WALKER et al., 2007), agravado pela incapacidade de crescer a maioria das espécies desse fungo biotrófico obrigatório em culturas axênicas puras. Para contornar esses problemas, é necessário que a obtenção de sequências de DNA de organismos rigorosamente identificados com base em sua morfologia de esporos (NILSSON et al., 2008; SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2003).

É importante salientar que uma correta identificação dos isolados de FMAs é um requisito fundamental para o avanço da micorrizologia. Assim, isolados depositados em coleções de cultura responsáveis pela preservação da biodiversidade de fungos e distribuição de isolados de referência devem ser bem caracterizados e identificados corretamente. As caracterizações e descrições das espécies de FMAs são limitadas pelo estado do conhecimento e pela disponibilidade de material de referência, pois a maioria das descrições das espécies foi feita com base em esporos não isolados e tampouco disponíveis na forma de coleção para outros estudos. Ademais, a identificação de espécies fundamentada apenas na morfologia pode também ser impossível, como ocorre em *Diversisporales* e *Archaeosporales* (WALKER et al., 2007).

Dessa maneira, o acúmulo e disponibilização de informações genéticas, como de sequenciamento de genes são essenciais para a descrição e caracterização correta das espécies de FMAs. A evolução desses estudos certamente desvendará uma ampla diversidade de fungos ao descobrir novas espécies através da caracterização dos diferentes isolados geográficos, hoje ainda considerados como sendo de mesma espécie. Diferenças morfológicas e genéticas entre diferentes isolados geográficos de FMAs têm sido descobertas

(AVIO et al., 2009) e detectada também uma grande diversidade funcional (AVIO et al., 2006). A qual tem sido frequentemente definida em termos de respostas no crescimento das plantas, e pode ser medida através da taxa de colonização micorrízica, absorção de nutrientes como P e os efeitos no crescimento das plantas. Isso sugere a ocorrência de mais de um táxon dentro das espécies (HEIJDEN; SCHEUBLIN; BRADER, 2004). O milho que tem alta taxa de crescimento e demanda fluxo constante e alto de absorção de nutrientes e elevado grau de micotrofia, pode ser hospedeiros ideais para estudos visando à avaliação da variabilidade funcional dos FMAs.

Outras técnicas que podem auxiliar a taxonomia, como aquelas que avaliam a capacidade de formação de anastomose (GIOVANNETTI; AZZOLINI; CITERNESI, 1999), têm sido vistas como promissoras para facilitar o entendimento da compatibilidade genética e da biologia evolutiva dos FMAs, e principalmente, como uma maneira de avançar o conceito de espécie em *Glomeromycota*. Existe pouca informação sobre a capacidade de formação de anastomose em *Glomeromycota*, pois poucos isolados foram avaliados até o momento, sendo este trabalho o primeiro a estudar a compatibilidade vegetativa e a fusão de hifas de FMAs tropicais.

A combinação de caracterização morfológica, associadas a técnicas baseadas em biologia molecular e a capacidade de formação de anastomose permite a obtenção de informações que podem ser usadas para compreender mais concretamente a especificidade ecológica e as diferenças na eficiência da simbiose micorrízica. Isso poderá ser extrapolado para ecossistemas agrícolas e naturais, portanto de grande importância para dar sustentáculo às pesquisas de FMAs no país.

Nesse sentido, o presente trabalho, organizado na forma de artigos, teve como hipótese geral que a variabilidade funcional pode ser uma consequência da

variabilidade genética e da compatibilidade vegetativa das linhagens de FMAs. Nesse sentido, teve-se como objetivos:

- a) avaliar a compatibilidade genética através da ocorrência de anastomose;
- b) caracterizar geneticamente as linhagens de FMAs;
- c) avaliar a variabilidade funcional tanto entre espécies de diferentes gêneros quanto entre diferentes linhagens de mesma espécie de FMAs;
- d) procurar estabelecer se existe relação entre a variabilidade genética e funcional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As Micorrizas Arbusculares

Os FMAs são importantes fungos do solo que pertencem ao Filo *Glomeromycota* (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001), são simbioses de raízes de extrema importância para o funcionamento da maioria dos ecossistemas terrestres e formam associações mutualistas, micorrizas arbusculares, com as raízes da maioria das plantas. Essa associação é provavelmente a simbiose terrestre mais difundida (WANG; QIU, 2006) e a mais importante entre microrganismos e plantas (SMITH; READ, 2008). Os FMAs ocorrem em muitas espécies de grande valor econômico, e em praticamente todos os ecossistemas terrestres, desde os polares até os tropicais úmidos ou desérticos (SMITH; READ, 2008; WANG; QIU, 2006). A maioria das angiospermas, pteridófitas e numerosas briófitas formam micorrizas arbusculares. Isso se deve ao fato da evolução dos FMAs ter ocorrido conjuntamente com as plantas e o estabelecimento das plantas no ambiente terrestre há pelo menos 460 milhões de anos ter promovido a origem das MA (REDECKER, 2000).

Esses fungos são biotróficos obrigatórios e dependem de raízes metabolicamente ativas para completarem seu ciclo de vida. De acordo com Smith e Read (2008), o ciclo de vida dos FMA é iniciado pelo crescimento de hifas a partir de um dos três tipos de propágulos (segmento de raiz infectado, hifas ou micélio e de, especialmente esporos) e é concluído com a produção de novos esporos que garantem a sobrevivência do fungo (Figura 1).

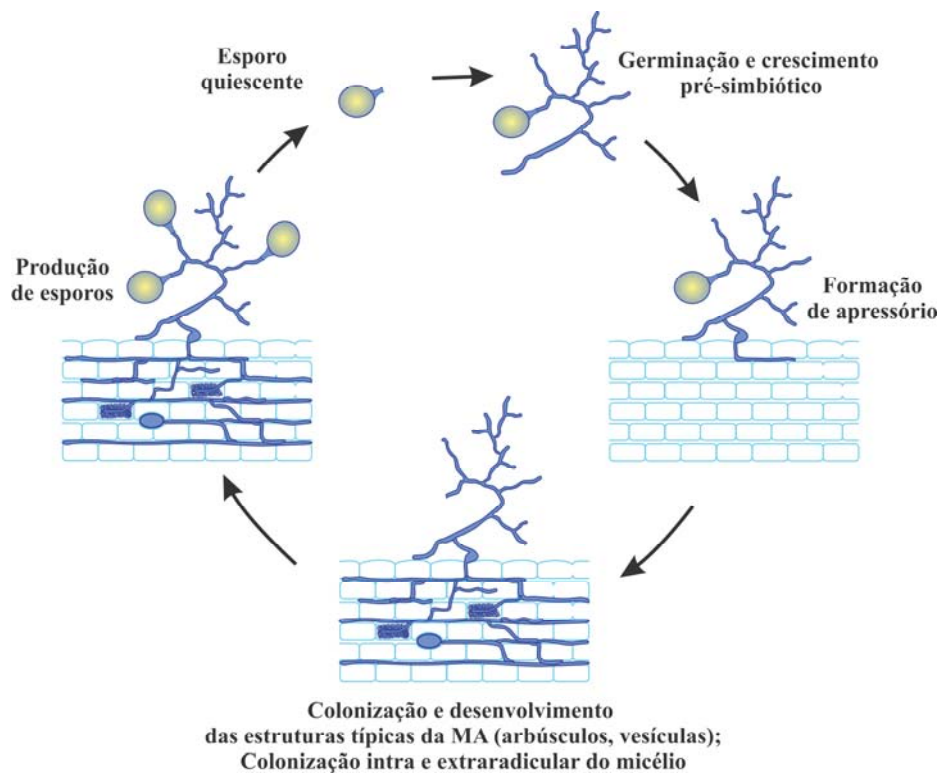


Figura 1 Ciclo de vida de fungos micorrízicos arbusculares

Fonte: Modificado de Giovannetti (2000)

O processo de infecção inicia quando uma hifa infectiva, proveniente de uma das formas de propágulos, entra em contato com as raízes, estas hifas formam uma estrutura especial de penetração conhecida como apressório (Figura 2), o qual se trata de uma modificação na parte apical da hifa que se dilata ficando com aspecto de inchado, resultado de eventos de reconhecimento pré-simbióticos. As hifas do apressório penetram as células epidérmicas e atravessam a hipoderme através de células de passagem, em seguida forma um enovelamento simples de hifas inter e intracelulares e coloniza o apoplasto e as células do córtex, sem penetrar o protoplasma, formando os arbusculos (Figura

2). Através destes o fungo tem acesso ao suprimento de carbono da planta, no entanto, os arbúsculos são estruturas efêmeras, de ciclo curto, e desaparecem em alguns dias deixando as células do córtex intactas e livres para serem anfitriãs de outros arbúsculos (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). Em associações com espécies dos gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Entrophospora*, as hifas intraradiculares se diferenciam ainda em estruturas globosas, ricas em lipídios, chamadas vesículas (Figura 2), que aparentemente possuem função de reserva, assim como importantes propágulos (ISAAC, 1992; SMITH; READ, 2008).

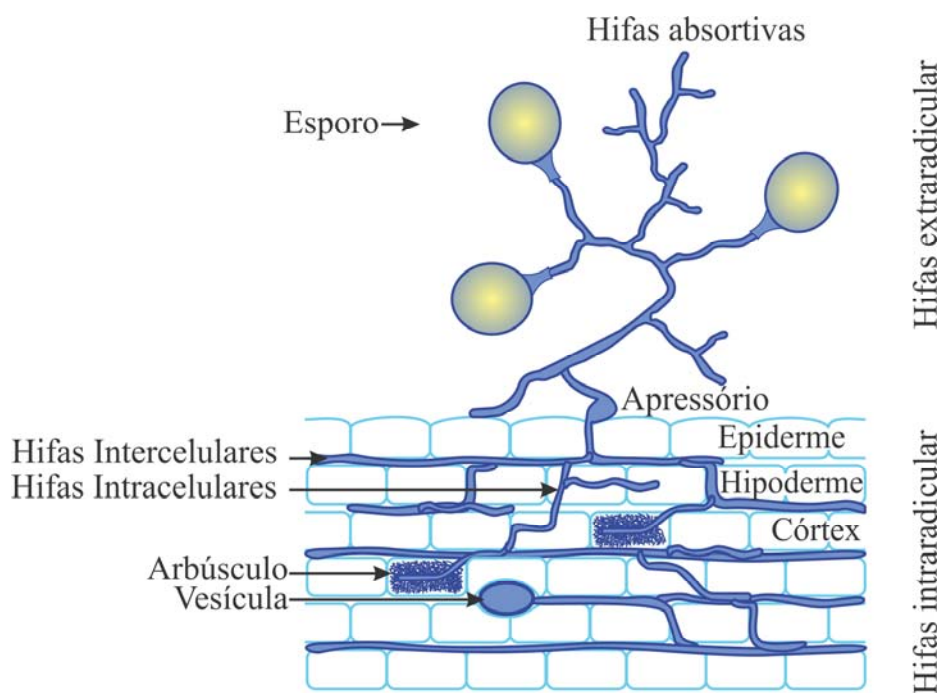


Figura 2 Representação esquemática das estruturas características da simbiose micorrízica arbuscular como identificadas nas células das raízes de uma planta hospedeira quando visualizada ao microscópio

Fonte: Modificado de Isaac (1992)

Outras estruturas importantes também estão envolvidas na MA, tais como hifas intrarradiculares e extrarradiculares. As hifas intrarradiculares permitem que o fungo explore as células corticais da raiz e posteriormente desenvolva suas estruturas (arbúsculos e em certos grupos vesículas) (MORTON; BENNY, 1990). As hifas extrarradiculares, por outro lado, colonizam a rizosfera em busca de nutrientes. Através das estruturas internas a planta supre o fungo com fotoassimilados necessários para completar seu ciclo de vida, e este por sua vez através do micélio externo aumenta a capacidade da planta em explorar o solo (Figura 3), tanto em área de superfície de contato quanto em volume (SMITH; READ, 2008), aumentando assim o suprimento de água e nutrientes, principalmente fósforo que possui baixa mobilidade no solo. As hifas possuem pequeno diâmetro e assim pode ter acesso a poros do solo que são inacessíveis às raízes. Como decorrência da imensa quantidade de hifas extrarradiculares produzidas pelos FMAs, existe significativa contribuição sobre a estruturação e estabilidade de agregados nos solos. Essa função é significativa por que a estruturação do solo modifica a capacidade de mobilização de nutrientes, o conteúdo de água, a penetração de raízes e o potencial erosivo dos solos (SMITH; READ, 2008).

Os FMAs podem aumentar o crescimento das plantas, sua capacidade de reprodução, bem como uma maior tolerância a estresse hídrico e aumento da resistência a infecção de doenças e competição pelos locais de colonização (SMITH; READ, 2008). No entanto, o benefício principal para a planta hospedeira nessa simbiose é o aumento da absorção de nutrientes. Existem evidências que os FMAs também colaboram no aumento do dreno de carbono da atmosfera para o solo, sendo estimado que cerca de 5 bilhões de toneladas de carbono por ano são consumidos pelos FMAs (BAGO; PFEFFER; SHACHAR-HILL, 2000), nesse sentido a simbiose MA contribui significativamente para a

ciclagem global de fósforo e carbono e influencia a produtividade em ecossistemas terrestres (FITTER, 2005).

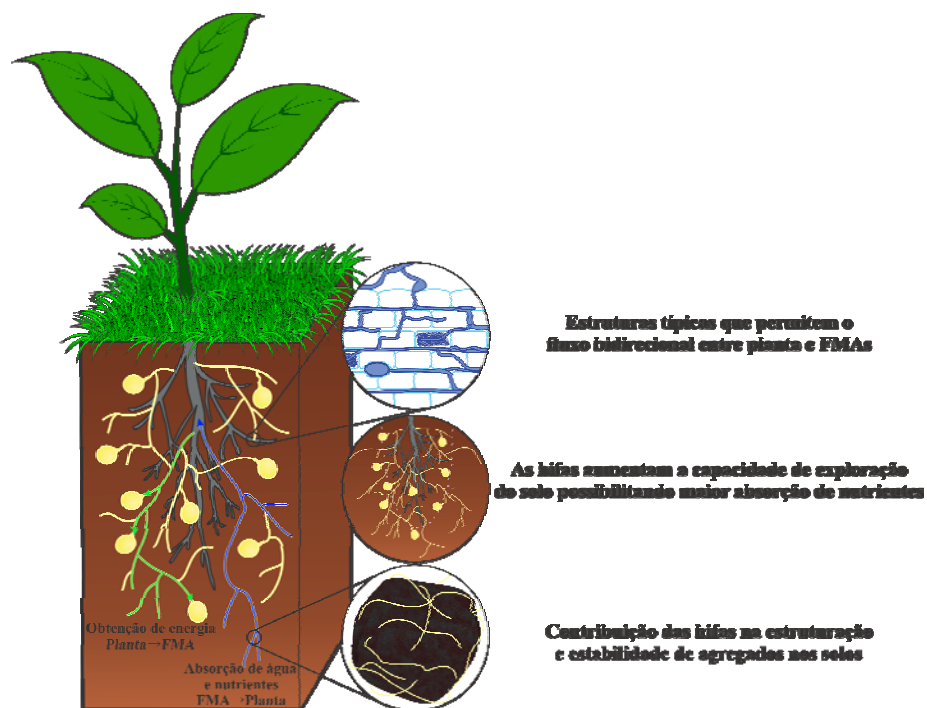


Figura 3 Representação esquemática da simbiose entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e seus principais benefícios. O mais evidente está representado pelas setas azuis, consiste na absorção de água e nutrientes obtidos através do micélio externo, o qual amplia a zona de absorção das raízes (linha pontilhada em cinza) e em troca os fungos recebem os carboidratos necessários para completarem seu ciclo de vida (representado por setas verdes)

O micélio externo também é responsável pela exsudação (ou pela decomposição de suas paredes celulares e de esporos) de glicoproteínas hidrofóbicas chamadas glomalinas. Essas proteínas provavelmente são produzidas somente por FMAs uma vez que em sua ausência, glomalinas não

são encontradas (RILLIG et al., 2001). Esses fungos também interagem com outros organismos do solo envolvidos em importantes ciclos de nutrientes, dessa forma a fixação biológica de nitrogênio por rizóbios em leguminosas pode ser aumentada ou até mesmo dependente (FOUGNIES et al., 2006) da coinfeção com FMAs.

O micélio dos FMAs tem ainda a capacidade de interconectar o sistema radicular de plantas vizinhas, de mesma espécie ou de espécies distintas, fazendo com que a maioria das plantas esteja interligada por uma rede de hifas micorrízicas comum (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Isso deve ser particularmente importante em florestas tropicais e culturas consorciadas.

Dessa forma, é evidente a amplitude de efeitos benéficos promovidos pelos FMAs, o que torna a simbiose micorrízica arbuscular um imenso potencial biotecnológico e ecológico ainda a ser explorado.

2.2 Germinação de esporos e desenvolvimento do micélio pré-simbiótico

Os esporos de FMAs são capazes de germinar na ausência da planta hospedeira, mas são incapazes de produzir micélio extenso e completar seu ciclo de vida sem estabelecer uma simbiose funcional com raiz metabolicamente ativa. Eles persistem no solo e germinam espontaneamente usando suas próprias reservas. Alguns autores sugerem que o crescimento da hifa é limitado pelos baixos teores de carbono armazenado nessas reservas (BAGO et al., 2000). Assim, após certo período de crescimento, começam a formar septos na hifa a partir do ápice, o citoplasma recua e o esporo entra em dormência novamente, evidenciando sua necessidade obrigatória às células vivas do hospedeiro. Contudo, em algumas espécies, o esporo contém reservas suficientes para realizar múltiplas germinações aumentando as chances de encontrar um hospedeiro apropriado (KOSKE, 1981). Não se conhece o mecanismo exato pelo

qual esses esporos são ativados a germinar. No entanto, já se tem evidências de que antes da colonização ocorre uma troca de sinais moleculares, o fungo reconhece seu hospedeiro, e lhe responde de modo positivo, produzindo e diferenciando seu micélio assimbiótico, mesmo sem o contato físico com o hospedeiro (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Os esporos dos FMAs são capazes de germinar e crescer sob diferentes condições ambientais e os principais fatores físicos, químicos e microbiológicos que influenciam a germinação têm sido estudados em diferentes gêneros e espécies de FMAs (GIOVANNETTI, 2000). Assim, foi relatado que a germinação dos esporos pode ser afetada pela necessidade de período de dormência; exudatos de raiz; umidade do solo; temperatura; pH; luz ou escuro; CO₂; flavonoides, bem como presença de bactérias, e que sua germinação é independente da presença de uma planta hospedeira (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Quando esporos aparentemente perfeitos e sadios não germinam em condições físicas e químicas consideradas como adequadas à germinação e são identificados como esporos dormentes, por outro lado, os esporos aptos a germinarem em condições idênticas são considerados como quiescentes (TOMMERUP, 1983a, 1983b). Foi relatada a presença de dormência de esporos nos gêneros *Glomus* (*G. intraradices*, *G. clarum*, *G. caledonium*, *G. monosporum* e *G. mosseae*) e *Acaulospora* (*A. laevis* e *A. longula*) conforme documentado por Giovannetti, Avio e Sbrana (2010). Entretanto, ainda não foi observado presença de dormência nos esporos nos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Os sinais moleculares que aliviam a dormência dos esporos e ativam o ciclo celular ainda permanecem desconhecidos, apesar de algumas substâncias, tais como formononetina, provocarem o início da germinação de esporos de FMAs. Existem também evidências do efeito do armazenamento de esporos em solo

sobre o alívio da dormência e de maneira geral tem sido observada acentuada diferença na germinação entre esporos recém-produzidos e aqueles que foram armazenados a frio (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Os relatos experimentais sobre a dormência de esporos de FMAs são importantes para compreensão de o porquê esporos aparentemente perfeitos e sadios não germinam, mesmo em condições favoráveis a sua germinação. No entanto, um entendimento completo do fenômeno ainda não foi obtido. É necessário a realização de experimentos que possam avaliar a relação da dormência dos esporos, bem como de seu alívio promovido pelo armazenamento a frio, com diferentes isolados de FMA, e verificar se existe relação e se esta é maior entre gêneros, espécies ou isolados de mesma espécies. Também é preciso estender o conhecimento sobre quais danos os processos de extração de esporos e desinfecção superficial afetam os esporos, bem como, a necessidade de simbioses específicas entre FMAs-microrganismos necessárias para a germinação.

Os esporos de FMAs germinam de maneira diferente dependendo do gênero. Os esporos da maioria das espécies de *Glomus* geralmente germinam por surgimento de tubos germinativos únicos ou múltiplos a partir de rebrota da hifa sustentação. Múltiplos tubos germinativos podem surgir a partir da hifa de sustentação, como em *G. clarum*, ou um único tubo germinativo, como em *G. mosseae* e *G. caledonium* (WALKER et al., 1995). Algumas espécies de *Glomus*, como *Glomus viscosum*, germinam após a formação de um inchaço em forma de balão na extremidade quebrada da hifa de sustentação (WALKER et al., 1995). Por outro lado, os tubos germinativos de espécies dos gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* emergem diretamente através da parede de esporos. Porém, diferentes estruturas de germinação podem ser formadas de acordo com o gênero. A estrutura mais simples é produzida por esporos de *Gigaspora*, que germinam após formação de uma camada de papilas

na parte interna da parede dos esporos (BECKER; HALL, 1976). Nos demais gêneros paredes germinativas estão envolvidas na germinação, com a formação de estruturas especializadas geralmente na superfície externa da parede interna.

Espécies de *Scutellospora* germinam após o desenvolvimento de um escudo de germinação dentro das camadas internas da parede dos esporos (WALKER; SANDERS, 1986), cuja morfologia foi recentemente utilizada para revisar taxonomicamente a família *Gigasporaceae* (OEHL; SOUZA; SIEVERDING, 2008). Uma estrutura diferente, descrita em algumas espécies de *Acaulospora* e *Kuklospora*, foi chamada de orbe de germinação (SPAIN, 1992). Algumas espécies do gênero *Pacispora* desenvolvem esporos semelhantes aos do gênero *Glomus* com estruturas morfológicamente semelhantes ao escudo de germinação de *Scutellospora*, porém mais delicados, se deteriorando ao longo do tempo e difícil de serem visualizados (WALKER; SCHÜBLER, 2004). Estruturas de germinação mais simples ocorrem em esporos de *Archaeospora trappei* e algumas espécies de *Ambispora* (GOTO; MAIA; OEHL, 2008).

Após a germinação, as hifas geralmente seguem um crescimento linear para frente, com uma forte dominância apical e com ramificações em ângulo reto, dando origem a um micélio cenocítico, onde um fluxo ativo e bidirecional de núcleos, mitocôndrias, gotículas de lipídios, vacúolos e organelas pode ser detectados (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). As hifas são asseptadas e com paredes espessas (cerca de 5-10 μ M de largura), possuem baixa taxa de crescimento e formam uma rede micelial com extensão altamente variável entre os indivíduos, sendo relatado que geralmente não são capazes de estender-se mais que 50-200 mm (GIOVANNETTI et al., 2003; LOGI; SBRANA; GIOVANNETTI, 1998).

2.3 Anastomose em FMAs

A anastomose consiste na união ocasional de hifas do micélio primário ou de ramificações secundárias, que quando em expansão, se encontram com frequência e muitas vezes se fundem ou ligam-se entre si por uma espécie de ponte. A anastomose pode ocorrer entre fungos geneticamente distintos, mas que apresentam compatibilidade vegetativa. A anastomose foi estudada e caracterizada extensivamente em *Ascomycetes* (SAUPE; CLAVE; BEGUERET, 2000). Entretanto, a compreensão da fusão de hifas em populações de FMAs ainda é bastante rudimentar havendo necessidade de mais estudo nessa área, principalmente utilizando-se isolados de outras regiões.

Os primeiros relatos da ocorrência de anastomose em FMAs não informaram todos os dados quantitativos sobre a frequência de fusões de hifas nas diferentes espécies ou sobre os eventos citológicos envolvidos (GODFREY, 1957) o que só foi realizado por Giovannetti, Azzolini e Citernesi (1999) monitorando a dinâmica, ocorrência e frequência de formação de anastomose entre hifas de esporos de FMAs individualmente germinados. Esses autores relataram que a anastomose é bastante frequente e espontânea em espécies do gênero *Glomus* variando de 35% a 69% em hifas pertencentes ao mesmo esporo e de 34% a 90% entre hifas de esporos diferentes do mesmo isolado e raras ou inexistentes em espécies dos gêneros *Gigaspora* e *Scutelospora*. O que foi posteriormente confirmado em outros estudos (GIOVANNETTI et al., 2004; PURIN; MORTON, 2011; SOUZA; DECLERCK, 2003).

A fusão completa das paredes das hifas e o estabelecimento de fluxo citoplasmático em pontes de fusão são observados através da visualização da deposição de sais de formazano, que evidencia a atividade da enzima succinato desidrogenase, e pela presença de núcleos no meio das pontes de fusão (GIOVANNETTI; AZZOLINI; CITERNESI, 1999). A migração nuclear através

das pontes de fusão sugeriu que troca genética poderia ocorrer por meio de anastomoses entre hifas derivadas de indivíduos geneticamente diferentes. Assim, Croll et al. (2009) relataram a ocorrência de anastomose e troca de material genético entre isolados geneticamente distintos de *Glomus intraradices*. Entretanto estudos anteriores demonstraram que diferentes isolados geográficos de *G. mosseae* foram incapazes de formarem anastomose (GIOVANNETTI et al., 2003). Troca nuclear pode representar um mecanismo fundamental que permite a manutenção da diversidade genética em FMAs, uma vez que não possuem evidências de reprodução sexuada para esse grupo de fungos.

Em FMAs que formam anastomose espontânea é possível observar o fluxo ativo e bidirecional de núcleos, mitocôndrias, gotículas de lipídios, vacúolos e organelas nas pontes de fusão (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010; LOGI; SBRANA; GIOVANNETTI, 1998) o que permite facilmente caracterizar as interações como compatíveis ou incompatíveis. Por outro lado, em espécies que não formam anastomose espontânea, como é o caso da família *Gigasporaceae* a visualização dessa compatibilidade vegetativa é difícil ou impossível uma vez que a anastomose é rara ou inexistente. Nesse caso, é necessário a utilização de outros métodos como o desenvolvido pela Dra. N. Sejalon-Delmas, o qual baseia-se no mecanismo de reparo de hifas e permite avaliar a compatibilidade vegetativa na família *Gigasporaceae* (SOUZA et al., 2005).

Recentemente, Purin e Morton (2011) também desenvolveram um sistema para a análise *in situ* de micélio externo de FMAs. Esse sistema foi denominado de *rhizohyphatron*. Através do qual, esses autores não observaram fusão de hifas de isolados de *Ambispora leptoticha*, *Gigaspora gigantea*, *Paraglomus occultum* e *Scutellospora heterogama*. Os resultados deste estudo apoiam as conclusões anteriormente obtidas por Giovannetti, Azzolini e Citeresi (1999) que pressupõem ausência de anastomose nas espécies da

família *Gigasporaceae*. Por outro lado, esses autores encontraram frequência de compatibilidade de fusão de hifas de 6,7% em *Glomus clarum* e de 13,9% em *Glomus intraradices*. A frequência de fusão de hifas observada neste trabalho para *Glomus clarum* foi muito baixa quando comparada aos resultados de frequência de anastomose em outras espécies de *Glomus* grupo A, como o *Glomus hoi*, *Glomus mosseae* e *Glomus proliferum* cuja frequência de anastomose varia de 44% a 100% (GIOVANNETTI et al., 2004). Essas diferenças podem ter ocorrido em função das diferenças no sistema de cultivo que pode influenciar processos fisiológicos e/ou a expressão gênica. Por outro lado, isso pode ser um indício de que a frequência de anastomose em FMAs pode variar muito entre populações diferentes, assim como ocorre em basidiomicetos (SBRANA; NUTI; GIOVANNETTI, 2007). A ocorrência regular de fusões de hifas no micélio sugere que a anastomose pode desempenhar um papel importante na manutenção da continuidade fisiológica de cada micélio. Entretanto, a ocorrência de anastomose e seu significado funcional devem ser mais estudados, uma vez que fusões de hifas em FMAs representam um meio para a troca de material genético, particularmente em anastomoses entre hifas derivadas de esporos geneticamente diferentes.

2.4 Identificação de FMAs

A identificação das espécies de FMAs tem sido tradicionalmente baseada na morfologia de seus esporos (MORTON; BENNY, 1990) que possuem os caracteres que definem as espécies, tais como cor, forma, estruturas e ornamentações de paredes (SCHENCK; PEREZ, 1988). Entretanto, a caracterização fenotípica pode ser influenciada por condições locais e maturidade dos esporos. Dificuldade é somada ainda pela ausência de informações detalhadas sobre as espécies e poucas fotos disponíveis, sendo os

morfotipos disponíveis em fotos diferentes aos observados em condições tropicais ou àqueles coletados diretamente do campo, os quais normalmente estão em baixa quantidade, parasitados e, em muitos casos, não possuem todas as estruturas subcelulares intactas que permitem uma identificação precisa da espécie. Além disso, pela morfologia de esporos, hifas e outras estruturas é muito difícil distinguir os fungos durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares (GIANINAZZI-PEARSON et al., 2001).

Embora as espécies de FMAs apresentem diferenças morfológicas, essas diferenças não são sempre evidentes, necessitando de grande experiência para interpretar as características fenotípicas dos esporos, tais como: tamanho, forma, cor e aparência, forma e comprimento da hifa de sustentação, ornamentação, estrutura e espessura da parede. A caracterização das paredes dos esporos é geralmente muito difícil, pois se enrugam, dobram ou sobrepõem-se, separam-se facilmente, ou permanecem aderidas entre si (SILVA; COLOZZI FILHO, 2007). Além disso, algumas espécies apresentam dimorfismo, o qual se refere à formação de dois tipos diferentes de esporos (glomoides e acaulosporoides). Dificuldades são maiores nos gêneros onde ocorre sobreposição de caracteres, como na família *Gigasporaceae*. Nesse sentido, Khade (2011) sugeriu o estabelecimento de novos caracteres morfológicos, tais como variações na forma de bulbo suspensor, presença ou ausência “*connecticle*”, a serem incorporadas para facilitar a tradicional taxonomia morfológica das espécies do gênero *Gigaspora*.

Como consequência das limitações na identificação com base nos caracteres morfológicos, vários estudos incluem descrições de espécies inadequadas, identificação errônea, com contaminação e especiação. Além disso, em muitos casos algumas espécies têm sido descritas como sendo sinônimas a espécies previamente descritas, como exemplo têm-se *Gi. ramisporophora* e *Gi. candida*, consideradas pela análise morfológica como sinônimas,

respectivamente, a *Gi. margarita* e *Gi. rosea* (BENTIVENGA; MORTON, 1995). No entanto, Souza et al. (2004) estudando um método de identificação de espécies do gênero *Gigaspora*, baseando-se na discriminação do polimorfismo inter e intraespecífico da região V9 do 18S rDNA técnica do *PCR-DGGE* (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) verificou que essas espécies apresentam polimorfismo que as diferenciam claramente daquelas com as quais foram sinonimizadas. Baseado nessa análise, a espécie *Gi. ramisporophora* apresenta maior semelhança com *Gi. albida* do que com a *Gi. margarita*, apesar da morfologia não indicar isso.

É importante salientar que, independentemente da pesquisa, básica ou aplicada, uma correta identificação dos isolados de FMAs é um requisito fundamental na micorrizologia. Assim, isolados depositados em coleções de cultura, que são responsáveis pela preservação da biodiversidade de fungos e distribuição de isolados de referência (DODD et al., 1994), devem ser identificados e caracterizados corretamente. As caracterizações e descrições das espécies são limitadas pelo estado do conhecimento e pela disponibilidade de material de referência, pois a maioria das descrições das espécies foi feita com base em esporos de FMAs não isolados e muitos destes não estão disponíveis na forma de coleção para outros estudos. Adicionalmente, a identificação de espécies fundamentada apenas na morfologia pode ser impossível, como ocorre em Diversisporales e Archaeosporales (WALKER et al., 2007).

O desenvolvimento de técnicas moleculares, principalmente as baseadas em *PCR* (reação em cadeia da polimerase), tem sido um passo importante nos estudos de taxonomia de FMAs. Em alguns casos, uma única reação de *PCR* não produz amplificação de DNA suficiente para as análises e uma segunda amplificação a partir da primeira (*nested-PCR*) é necessária. O *nested-PCR* envolve dois conjuntos de iniciadores um para cada etapa de amplificação. É um procedimento comumente utilizado em pesquisas com FMAs para superar a

inibição da *PCR* e para aumentar a possibilidade de amplificar fragmentos de DNA mais difíceis de serem amplificados. O *nested-PCR* envolve uma primeira ampliação utilizando-se, em geral, os iniciadores universais para fungos e, em seguida, uma segunda ampliação utilizando-se como DNA molde diluições feitas com os produtos da primeira *PCR* e com iniciadores discriminatórios de táxon. Entretanto, para que os métodos moleculares sejam completamente adequados para a identificação é necessário que a obtenção de sequências de DNA seja baseada em organismos rigorosamente identificados com base em sua morfologia (NILSSON et al., 2008; SCHÜßLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2003).

A utilização dessas técnicas moleculares tem superado as dificuldades da identificação morfológica dos FMAs. Foram desenvolvidas várias estratégias baseadas em *PCR* que podem amplificar sequências específicas de DNA de FMAs, como por exemplo, os genes ribossomais-rRNA (SOUZA et al., 2004). Dentre essas técnicas pode-se destacar o uso da técnica *PCR-RFLP - Restriction Fragment Length Polymorfism* (AVIO et al., 2009; MERGULHÃO et al., 2008; REDECKER et al., 1997) que mostrou ter potencial para diferenciar espécies filogeneticamente próximas (MERGULHÃO et al., 2008). Para se obter uma boa resolução com essa técnica é necessária a escolha prévia das enzimas de restrição, pois o *RFLP* separa somente sequências que apresentem polimorfismo nos sítios de restrição reconhecidos pela enzima de restrição utilizada.

2.5 Classificação dos FMAs

As primeiras tentativas de classificar os FMAs foram feitas no final do século XIX e início do século XX, incluindo-os inicialmente na família *Endogonaceae*, dentro do Filo *Zigomycota*, devido à aparência de seus esporos com os de *Zigomycetos* (GERDEMANN; TRAPPE, 1974). Posteriormente,

estudos moleculares baseados no 18S rDNA permitiram a criação de um novo filo, o *Glomeromycota* (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001). Nos últimos anos a sistemática dos FMAs sofreu inúmeras modificações, devido principalmente à incorporação de estudos moleculares na filogenia desses fungos (STÜRMER, 2012). Assim, atualmente foi sugerida a inclusão de mais duas classes Archaeosporomycetes e Paraglomeromycetes, e uma nova ordem, Gigasporales, totalizando assim, três classes (Archaeosporomycetes, Glomeromycetes e Paraglomeromycetes), cinco ordens (Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales e Paraglomerales), 14 famílias, 29 gêneros (Tabela 1) e aproximadamente 230 espécies todas dentro do filo *Glomeromycota*.

Tabela 1 Classificação atual dos FMAs

Classe	Ordem	Família	Gêneros	
Glomeromycetes	Glomerales	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>	
			<i>Funneliformis</i>	
		<i>Simiglomus</i>		
		<i>Septoglomus</i>		
		<i>Claroideoglomeraceae</i> = <i>Entrophosporaceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>	
			<i>Viscospora</i>	
		<i>Entrophospora</i>		
		<i>Albahypha</i>		
		Diversisporales	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>
				<i>Redeckera</i>
	<i>Otophora</i>			
	<i>Tricispora</i>			
	<i>Acaulosporaceae</i>			
	Gigasporales	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	
			<i>Kuklospora</i>	
<i>Sacculosporaceae</i>		<i>Sacculospora</i>		
		<i>Pacisporaceae</i>		
Gigasporales		<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>	
		<i>Scutellosporaceae</i>	<i>Scutellospora</i>	
		<i>Orbispora</i>		
		<i>Racocetraceae</i>	<i>Racocetra</i>	
Gigasporales	<i>Dentiscutataceae</i>	<i>Cetraspora</i>		
		<i>Dentiscutata</i>		
		<i>Fuscutata</i>		
Archaeosporomycetes	Archaeosporales	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Quatunica</i>	
			<i>Archaeospora</i>	
		<i>Ambisporaceae</i>	<i>Intraspora</i>	
			<i>Ambispora</i>	
Paraglomeromycetes	Paraglomerales	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Geosiphon</i>	
			<i>Paraglomus</i>	

Fonte: Oehl et al. (2011a, 2011b)

As significativas alterações na taxonomia de FMAs evidenciam a necessidade de interação de ambas as técnicas, morfológicas e moleculares para uma identificação e classificação precisa. Nesse sentido, a maioria das mudanças propostas pela sistemática baseada nas análises moleculares tiveram o suporte da identificação com base em características morfológicas (STÜRMER, 2012), com exceção de *Diversispora* (*Diversisporaceae*).

2.6 Diversidade genética e funcional de FMAs

Cerca de 200 mil espécies de plantas são colonizadas por aproximadamente 230 espécies de FMAs, o que leva a considerar os FMAs como de baixa especificidade hospedeira, uma vez que, cada uma das espécies de FMAs pode colonizar diferentes espécies de plantas. Estudos moleculares revelaram que uma única planta pode ser colonizada por mais de 20 diferentes espécies de FMAs (FITTER, 2005). Essa situação induz considerar os FMAs como um grupo homogêneo de simbioses no qual todas as espécies desempenham funções biológicas idênticas no ecossistema (HUSBAND; HERRE; YOUNG, 2002). A ausência de especificidade hospedeira em FMAs foram apoiadas em estudos mais recentes, no entanto, não se pode excluir a possibilidade de que alguma especificidade existe em associações fungo/planta. Assim, pode haver a existência de seletividade e compatibilidade simbiótica diferenciada, havendo combinações preferenciais na formação da simbiose e respostas variáveis. Nesse sentido, há evidências de especificidade funcional quando se consideram os efeitos desses fungos sobre as plantas hospedeiras (POUYU-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006). Dessa forma, para uma mesma planta os efeitos e contribuição dos FMAs varia entre as linhagens dos FMAs, refletindo em diferenças de eficiência simbiótica do fungo (HEIJDEN; KUYPER, 2001). Essa variação é bem documentada, mas os mecanismos que regulam essas interações e efeitos são ainda pouco conhecidos. Isso traz inconsistências no papel dos FMAs na produção agrícola e reabilitação de ecossistemas degradados (SIQUEIRA et al., 2010), dificultando a definição de estratégias para a aplicação prática desses fungos.

Tem sido detectada uma grande variabilidade funcional dos FMAs, tanto entre espécies quanto entre isolados de uma mesma espécie com base na morfologia dos esporos (MUNKVOLD et al., 2004; SAGGIN JÚNIOR;

SIQUEIRA, 1995). Esta tem sido frequentemente definida em termos de respostas no crescimento das plantas, e pode ser medida pela taxa de colonização micorrízica, a absorção de nutrientes como P e os efeitos no crescimento das plantas. A variabilidade funcional leva a sugerir a ocorrência de mais de um *MOTU* – “*Molecular operational taxonomic unit*” (KRÜGER; WALKER; SCHÜBLER, 2011) dentro das espécies de FMAs (HEIJDEN; SCHEUBLIN; BRADER, 2004). Nesse sentido, uma mesma espécie definida com base na morfologia dos esporos pode representar uma variedade de táxons ecológico e funcionalmente distintos (SOUZA et al., 2010).

Estudos recentes, incluindo abordagens morfológicas e moleculares para identificação de linhagens de FMAs relatam também a existência de variabilidade genética entre linhagens pertencentes a mesma espécie de FMAs (CROLL et al., 2009; SOUZA et al., 2004), sendo que a maioria das variações genéticas inter e intraespecífica foram descritas usando sequências que cobrem os genes ribossomais 18S e 5.8S e as regiões intergênicas ITS1 e ITS2. Nesse sentido, estudos sobre a variação gênica de subunidades do gene 18S rDNA têm revelado que os FMAs formam um grupo diverso de fungos, em contradição à baixa riqueza de espécies conhecidas, tanto em termos de número de espécies como de suas função na relação simbiótica (SOUZA et al., 2010). O conceito biológico de espécie, o qual diz que dois organismos pertencem à mesma espécie, quando se cruzam e produzem descendentes férteis não é aplicável em FMAs, uma vez que estes não possuem fase sexual conhecida. Portanto é evidente a necessidade de avançar no conceito de espécies de FMAs, não somente para estabelecer a taxonomia e classificação, mas também para melhor compreender a variabilidade funcional entre esses indivíduos. Estudos de ocorrência e formação de anastomose em FMAs têm sido relatados como promissores para facilitar o entendimento da genética e da biologia evolutiva, e

principalmente, como uma maneira de avançar o conceito de espécie em *Glomeromycota*.

Quase todos os dados sobre a variabilidade funcional dos FMAs avaliaram um número reduzido de linhagens em um único gênero, *Glomus*. Nesse sentido, atualmente, o desafio tem sido avaliar um grande número de linhagens, englobando diversas espécies e gêneros tanto quanto a sua variabilidade genética quanto funcional avaliada em uma mesma planta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nessa sessão serão fornecidas informações mais detalhadas dos procedimentos adotados para realização desta tese, de forma que se possam reproduzir facilmente as metodologias usadas.

3.1 A multiplicação dos FMAs

Para aumentar o número de propágulos e reduzir os efeitos ambientais da origem dos isolados e para uniformizar a idade dos esporos, os isolados listados na tabela 2 foram multiplicados por seis meses em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, seguindo o procedimento de multiplicação (Figura 4) baseado nas práticas padrões da COFMEA (Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia). Utilizou-se como planta hospedeira *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (syn. *Brachiaria decumbens*), em vasos contendo 500 mL de substrato autoclavado. O substrato, preparado com solo superficial de mata, solo argiloso (Cambissolo Vermelho Amarelo) e solo arenoso (Planossolo) (1:1:1 v/v) foi autoclavado por dois dias consecutivos por 60 minutos a 120°C, 1,2 kgf/cm², e permaneceu por 15 dias em repouso para oxidação de possível manganês solúvel. A análise química revelou as seguintes características após a autoclavagem: pH em água = 4,8; Ca⁺²= 1,3 cmol_c dm⁻³; Mg⁺²= 0,9 cmol_c dm⁻³; Al⁺³= 0,3 cmol_c dm⁻³; P = 5,2 mg dm⁻³ e K = 32 mg dm⁻³ (Mehlich 1) e MO= 0,78 dag kg⁻¹.

Tabela 2 Listagem das linhagens de FMAs utilizadas neste trabalho

Espécie ⁽¹⁾	Código de origem ⁽²⁾	Região de origem	Bioma de origem	Origem ⁽³⁾
<i>Acaulospora morrowiae</i>	401-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Acaulospora morrowiae</i>	PRN108B	Paraíba	Mata Atlântica	FURB
<i>Acaulospora morrowiae</i>	SCT400B	Santa Catarina	Mata dos Pinhais	FURB
<i>Acaulospora morrowiae</i>	CNPAB 036	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Acaulospora morrowiae</i>	CNPAB 019	Rio de Janeiro	—	CNPAB
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	A38 (IES-33)	Cuba	—	CNPAB
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	ALCOA29	Minas Gerais	Mata Atlântica	UFLA
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	SPL104A	São Paulo	—	FURB
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	425-UFLA	Minas Gerais	—	UFLA
<i>Acaulospora spinosa</i>	95-UFLA	—	Cerrado	UFLA
<i>Acaulospora sp.</i>	A88 (CNPAB 044)	Minas Gerais	Cerrado	CNPAB
<i>Archaeospora leptoticha</i>	—	—	Mata dos Pinhais	ESALq
<i>Archaeospora leptoticha</i>	SCT 306B	Santa Catarina	Mata dos Pinhais	FURB
<i>Entrophospora colombiana</i>	A87 (CNPAB 043)	Minas Gerais	Cerrado	CNPAB
<i>Entrophospora colombiana</i>	A15 (CNPAB 015)	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Entrophospora colombiana</i>	ALCOA-CCB2	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Entrophospora colombiana</i>	06-UFLA	—	—	UFLA
<i>Entrophospora colombiana</i>	AMZ570A	Amazonas	Floresta Amazônica	FURB
<i>Gigaspora albida</i>	URM- FMA 01	—	—	UFPE
<i>Gigaspora albida</i>	03-UFLA MG	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Gigaspora cândida</i>	A36 (IES-29)	Cuba	—	CNPAB
<i>Gigaspora cândida</i>	BEG17	Taiwan	—	BEG
<i>Gigaspora margarita</i>	A49 (Inóculo 138)	Minas Gerais	Cerrado	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	A1 (CNPAB 001)	Flórida	—	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	A41 (IES-42)	Cuba	—	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	279-UFLA	—	—	UFLA
<i>Gigaspora margarita</i>	R1 UFLA	—	—	UFLA
<i>Gigaspora margarita</i>	A37 (IES-32)	Cuba	—	CNPAB
<i>Gigaspora rósea</i>	A35 (IES-19)	Cuba	—	CNPAB
<i>Gigaspora SP</i>	A81 (CNPAB 039)	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Glomus clarum</i>	A5 (CNPAB 005)	INVAM	—	CNPAB

Tabela 2, Conclusão

Espécie⁽¹⁾	Código de origem⁽²⁾	Região de origem	Bioma de origem	Origem⁽³⁾
<i>Glomus clarum</i>	URM - FMA 08	—	—	UFPE
<i>Glomus clarum</i>	CMM-306	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Glomus clarum</i>	—	Santa Catarina	—	ESALq
<i>Glomus clarum</i>	351-UFLA	Flórida	—	UFLA
<i>Glomus etunicatum</i>	365-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Glomus etunicatum</i>	URM-FMA 03	—	—	UFPE
<i>Glomus etunicatum</i>	—	Santa Catarina	—	ESALq
<i>Glomus etunicatum</i>	SCT101A	Santa Catarina	Mata dos Pinhais	FURB
<i>Glomus etunicatum</i>	221-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Glomus etunicatum</i>	Inóculo 122	Minas Gerais	Cerrado	CNPAB
<i>Glomus etunicatum</i>	CPATSA 31	Bahia	Caatinga	CNPAB
<i>Glomus etunicatum</i>	Inóculo 51	—	—	CNPAB
<i>Glomus formosanum</i>	A20 (CNPAB 020)	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Glomus manihotis</i>	A83 (CNPAB 041)	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Glomus manihotis</i>	864- UFLA	Minas Gerais	—	UFLA
<i>Glomus sp.</i>	A90 (CNPAB 046)	Pernambuco	Planície costeira	CNPAB
<i>Scutellospora calospora</i>	A80 (CNPAB 038)	Pará	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Scutellospora gregaria</i>	200-UFLA	Flórida	—	UFLA
<i>Scutellospora heterogama</i>	A34 (IES-16)	Cuba	—	CNPAB
<i>Scutellospora heterogama</i>	A2 (CNPAB 002)	São Paulo	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Scutellospora heterogama</i>	312-UFLA	Flórida	—	UFLA
<i>Scutellospora heterogama</i>	URM- FMA 05	—	—	UFPE
<i>Scutellospora heterogama</i>	—	—	—	ESALq
<i>Scutellospora heterogama</i>	PNB102A	Paraíba	—	FURB
<i>Scutellospora pellucida</i>	464-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Scutellospora pellucida</i>	A70 (CNPAB 029)	Rio de Janeiro	Mata Atlântica	CNPAB
<i>Scutellospora pellucida</i>	128-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	UFLA

⁽¹⁾: De acordo com a classificação com base na morfologia dos esporos (MORTON; BENNY, 1990);

⁽²⁾: Código das linhagens utilizadas na instituição de origem; ⁽³⁾: Instituições que cederam as linhagens, FURB = Universidade Regional de Blumenau; CNPAB = Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia; UFLA = Universidade Federal de Lavras; ESALQ = Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; UFPE = Universidade Federal de Pernambuco.



Aplicar a suspensão de esporos sobre as raízes de plântulas, previamente preparadas em mistura estéril de areia e vermiculita (1:1 v/v) no ato da transferência destas para os vasos. Irrigue periodicamente e avalie a multiplicação após 6 meses em casa de vegetação.

Figura 4 Esquema de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares

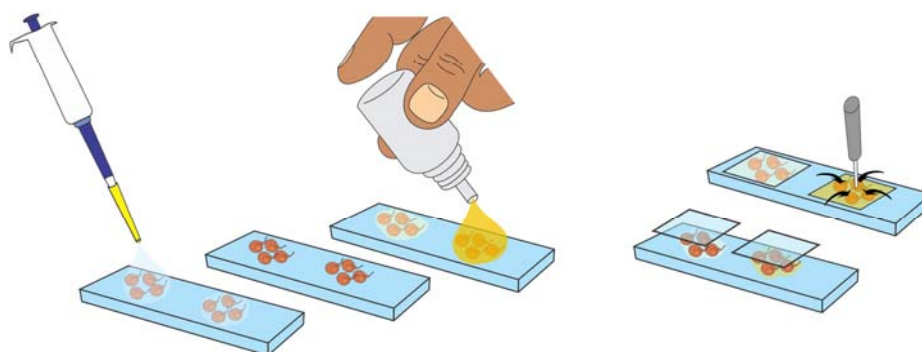
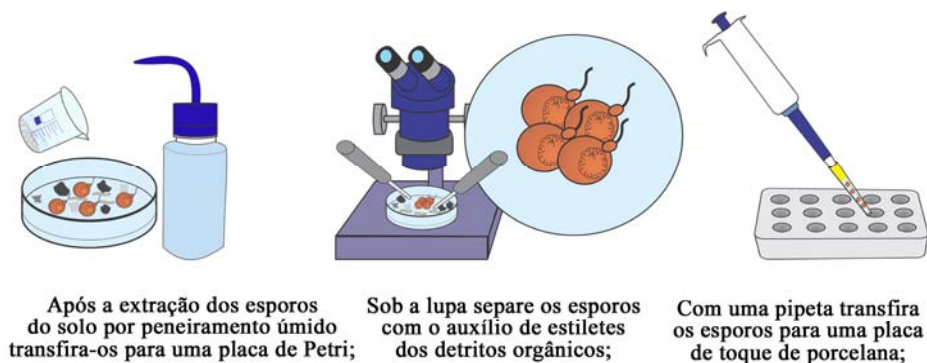
3.2 Caracterização morfológica

Após seis meses de multiplicação, os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugações em água e solução de sacarose (JENKINS, 1964), tal como ilustrado na Figura 5. Após a extração, os esporos foram selecionados sob microscópio estereoscópico e fixados em uma lâmina para microscopia com PVLG (polivinil lacto glicerol) e PVLG + reagente de Melzer (1:1). Cada lâmina possuiu duas lamínulas, uma com PVLG, na qual manteve-se os esporos inteiros, e outra com uma mistura de PVLG e reagente de Melzer (1:1), na qual rompeu-se os esporos mediante a aplicação de uma leve pressão sobre a lamínula (Figura 6). A confirmação da identidade de cada linhagem foi realizada com base em critérios morfológicos, descritos nos *sites* do INVAM (INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI, 2012), com utilização das descrições originais das espécies publicadas na literatura especializada

(BLASZKOWSKI, 2012). Imagens de cada linhagem foram capturadas utilizando-se a câmera *Motic Images Plus 2.0* acoplada ao microscópio.



Figura 5 Esquema dos passos a seguidos na extração de esporos



Após finalizada a separação dos esporos transfira-os para a lâmina. Espere a gota secar e em seguida coloque sobre um dos grupos de esporos uma gota de PVLG e sobre o outro grupo de esporos coloque uma gota da mistura de PVLG + Reagente de Melzer (1:1). Coloque a lamínula sobre a gota de PVLG e espere até que ele se espalhe. Coloque a lamínula sobre a gota de PVLG + Reagente de Melzer, em seguida, com o auxílio de um estilete faça uma leve pressão até que os esporos sejam rompidos. OBS: Cuidado com o tamanho da gota para que não transbordem, elas devem ser pequenas e dependem do tamanho dos esporos.

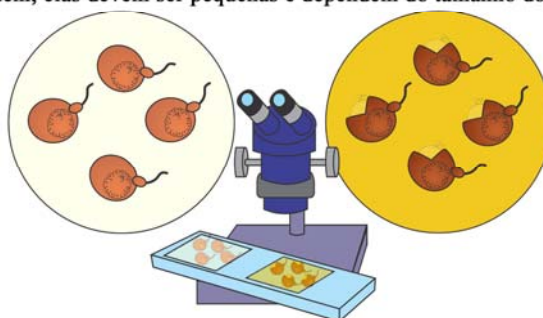


Figura 6 Esquema dos passos seguidos na montagem de lâminas para microscopia com esporos de FMAs

3.3 Caracterização molecular

Para a caracterização molecular os esporos foram cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico quanto à integridade, sanidade e pureza da linhagem. Foram submetidos a quatro sessões de ultrassom de 15 s, intercaladas por lavagens em água destilada estéril para eliminar partículas de solo e possíveis microrganismos superficialmente aderidos. Os esporos limpos, aparentemente perfeitos e sadios foram armazenados a -20°C dentro de frascos *ependorf* autoclavados.

A extração do DNA foi por meio de um protocolo modificado no laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia (Figura 7), o qual combina a maceração em nitrogênio líquido com resina *Chelex* descrito por Souza et al. (2004) e o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Após a secagem do pelete adicionou-se 50µL de solução de reidratação (que pode ser água ultrapura livre de DNAases ou solução de Tris-EDTA), os tubos foram incubados por 1 hora a 65°C, e o DNA foi quantificado em espectrofotômetro “*Nano-Drop*” e dividido em dois tubos *ependorf* de 1,5 ml e armazenado um a 4°C e o outro a -20°C.

O DNA obtido foi amplificado com o par de iniciadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de acordo com Novais, Souza e Siqueira (2010). Em seguida, uma segunda amplificação foi utilizada em reações diferentes com dois pares de iniciadores os NS31 - F1Ra e NS7- ITS4, utilizando-se 2 µL de uma diluição (1:1000) da primeira *PCR* como DNA molde, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 2,5 mM de MgCl₂, 0,28 µM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase – Promega, Madison, EUA). A reação foi realizada em termociclador marca *Eppendorff*® seguindo o programa: 2 min. a 93°C para desnaturação inicial; 30 ciclos 94°C por 60 s; 55°C

por 60 s; 72°C por 160 s; 72°C por 5 min. para final de extensão para o par de iniciadores NS31-F1Ra e 3 min. a 94°C para desnaturação inicial; 2 ciclos 94°C por 60 s; 60°C por 60 s; 72°C por 45 s; 32 ciclos 94°C por 60 s; 58°C por 60 s; 72°C por 45 s; 72°C por 10 min. para extensão final para o par de iniciadores NS7-ITS4.

Para análise de *RFLP* (definição) os fragmentos de DNA amplificados foram clivados com as endonucleases *Hinf*I, *Taq*I e *Msp*I utilizando 8 µL do produto da segunda *PCR*; 1,5 µL do tampão (10X) da enzima, 4 U da enzima em volume final de 15 µL. A clivagem foi realizada durante 240 min. a 37°C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (3% p/v) por 150 min. a 85 V. Os perfis de bandas obtidos foram submetidos à análise de similaridade, no programa Gelcompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgica), adotando o coeficiente de similaridade de Dice e o método de agrupamento UPGMA.

Após prévia análise dos géis de *RFLP*, os amplificados foram purificados para a eliminação dos iniciadores e foram clonados no vetor “pGEM-T *Easy*”, e utilizados para transformação de *Escherichia coli* DH5α conforme recomendações do fabricante (Promega). As bactérias contendo insertos estão sendo cultivadas, e os plasmídeos extraídos, e o DNA plasmidial obtido será utilizado, após diluição, como molde para ampliações de *PCR* e para reações de sequenciamento (portanto, ainda não apresentados no presente trabalho).

As sequências obtidas serão submetidas a um banco de dados *on-line* para determinação da taxonomia de fragmento individual. Os dados de sequências serão usados então para análise filogenética e para caracterização das linhagens sendo comparadas com sequências depositadas no *GenBank*.

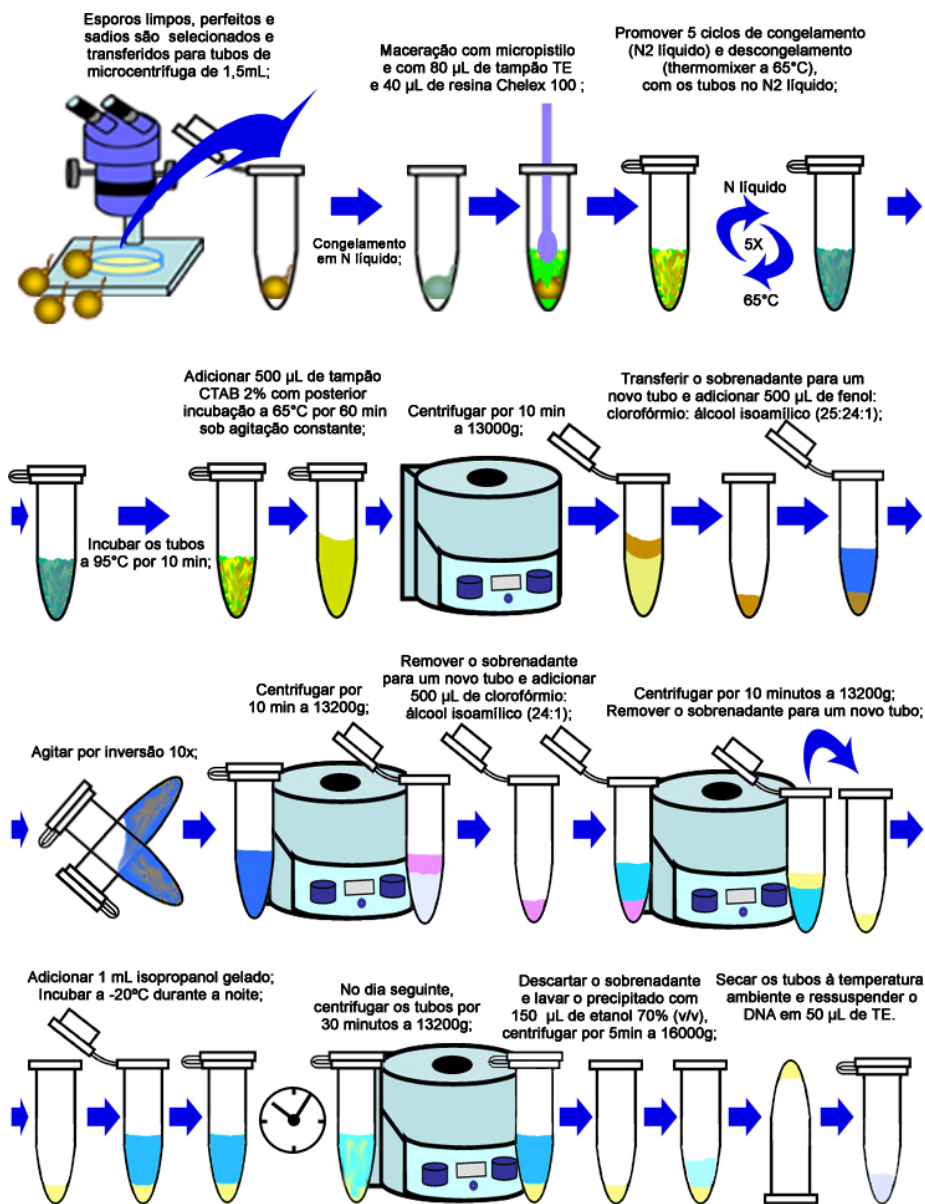
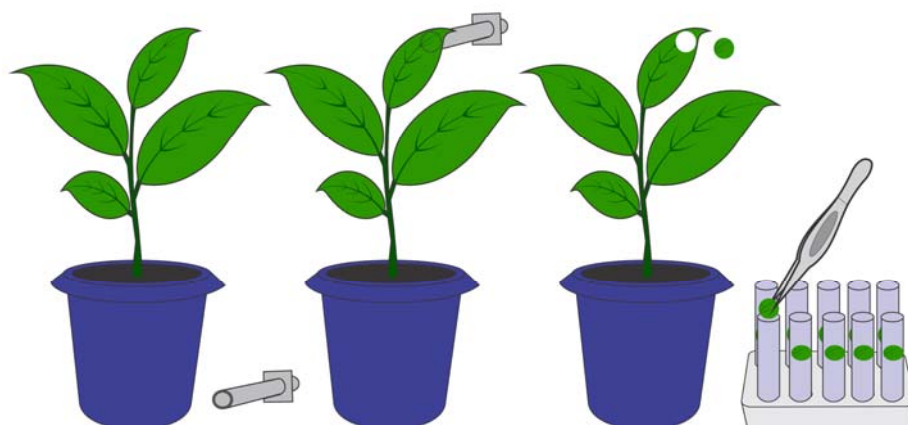


Figura 7 Protocolo de extração de DNA de esporos de fungos micorrízicos arbusculares modificado pela combinação da maceração em N líquido com resina *Chelex* e o método CTAB

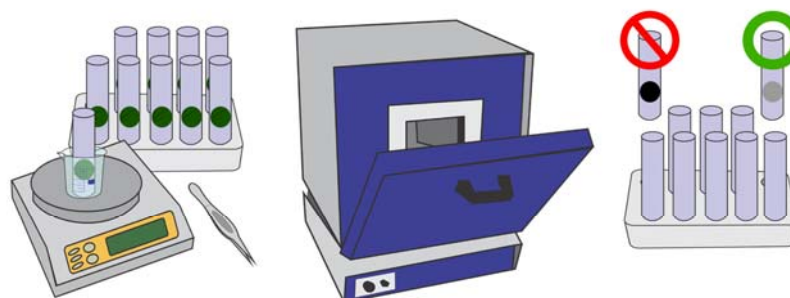
3.4 Variabilidade funcional das linhagens de FMAs

Foi desenvolvido um estudo em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica- RJ, com o objetivo de avaliar a variabilidade funcional tanto entre espécies de diferentes gêneros quanto entre diferentes linhagens de mesma espécie de FMAs. Um estudo foi desenvolvido com milho, *Zea mays L. (Poaceae)*, sendo que a funcionalidade da simbiose foi avaliada pela colonização radicular, efeitos no crescimento e na absorção de fósforo no tecido foliar.

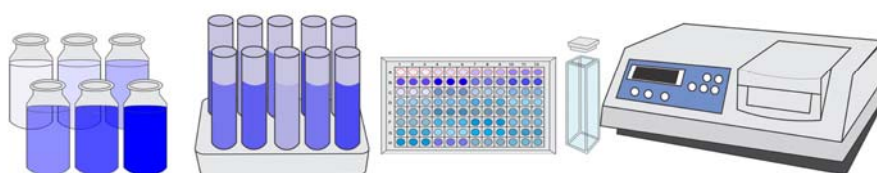
Os experimentos foram implantados utilizando o mesmo substrato anteriormente descrito para multiplicação dos FMAs e foram utilizadas diferentes linhagens desses fungos (ver artigo 3). Após 100 dias de crescimento foram avaliados: a) teor de P na folha mais jovem (Figura 8) completamente desenvolvida amostrando-se um disco foliar de 0,8 cm de diâmetro (AZIZ; HABTE, 1987); b) altura da planta; c) diâmetro do caule; d) massa da parte aérea seca; e) percentagem de colonização micorrízica no sistema radicular (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) após sua clarificação e coloração (Figura 9) (KOSKE; GEMMA, 1989) e f) número de esporos em 25 mL do substrato (Figura 10).



Colete o disco foliar e transfira-o para tubos de vidro e coloque em estufa de ventilação forçada (105°C).



Após obter o peso seco dos discos, queime-os em mufla a 500 °C por 3 horas. repetir a queima até que as amostras virem cinza.



Adicione na cinza 2,5mL do reagente B de Murphy & Rily (1962) e agite até dissolver; Adicione 10mL de água destilada, aguarde 20 minutos e faça a leitura em espectrofotômetro ajustado para 840nm.

Figura 8 Esquema dos passos seguidos na análise de P de disco foliar

Para análise de P é necessário o preparo das soluções padrões para calibração do aparelho conforme as tabelas 3 e 4.

Tabela 3 Preparo dos padrões para calibração

Concentração de P padrão em mg/L	Volume (mL) a ser pipetado de solução de 1,25mg/L de P	Volume (mL) a ser pipetado do reagente "B"	Volume (mL) a ser pipetado de água destilada
0	0	2,5	10
0,1	1	2,5	9
0,2	2	2,5	8
0,3	3	2,5	7
0,4	4	2,5	6
0,5	5	2,5	5

Tabela 4 Soluções necessárias para análise de P

Soluções	KH_2PO_4 1000mg/L de P	KH_2PO_4 50mg/L de P	KH_2PO_4 1,25mg/L de P	H_2SO_4 5N	Reagente “A”	Reagente “B”
Preparo das soluções	Pese 0,88070g de KH_2PO_4 seco em estufa, dissolva em um Becker de 100mL, transfira para um balão volumétrico de 200mL e complete o volume.	Pipete 10mL da solução de KH_2PO_4 com 1000mg/L de P; transfira para um balão volumétrico de 200mL e complete o volume.	Pipete 5mL da solução de estoque de KH_2PO_4 com 50mg/L de P; transfira para um balão volumétrico de 200mL e complete o volume.	Meça 148mL de H_2SO_4 em uma proveta; Coloque cerca de 1,5L de água destilada em um balão volumétrico de 2000mL, despeje o H_2SO_4 lentamente, esperando esfriar, complete o volume do balão.	Coloque 1L da solução de H_2SO_4 5N em um balão volumétrico de 2L, dissolva 12g de molibdato de amônio em 250mL de H_2O ; Dissolva 0,2908g de tartarato de antimônio e potássio em 100mL de H_2O ; Junte ambas as soluções ao H_2SO_4 5N; Complete o volume do balão volumétrico com água, guarde em recipiente protegido de luz, válido por 6 meses.	Dissolva 1,056g de ácido ascórbico em 200mL do reagente “A”; Prepare esta solução no dia de utilizar, válido por 24 horas.

Fonte: Aziz e Habte (1987)

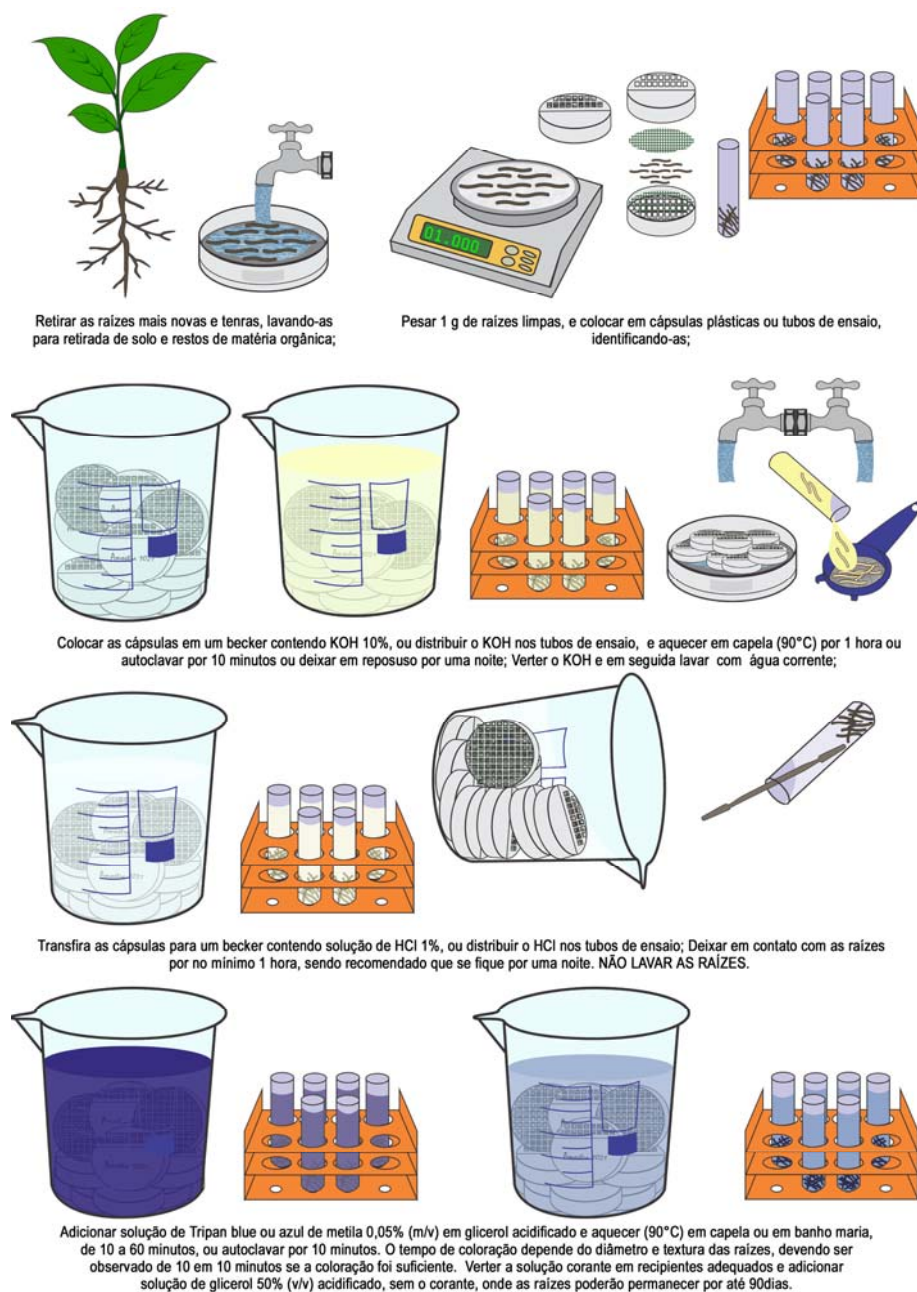


Figura 9 Esquema dos passos seguidos na coloração de raízes

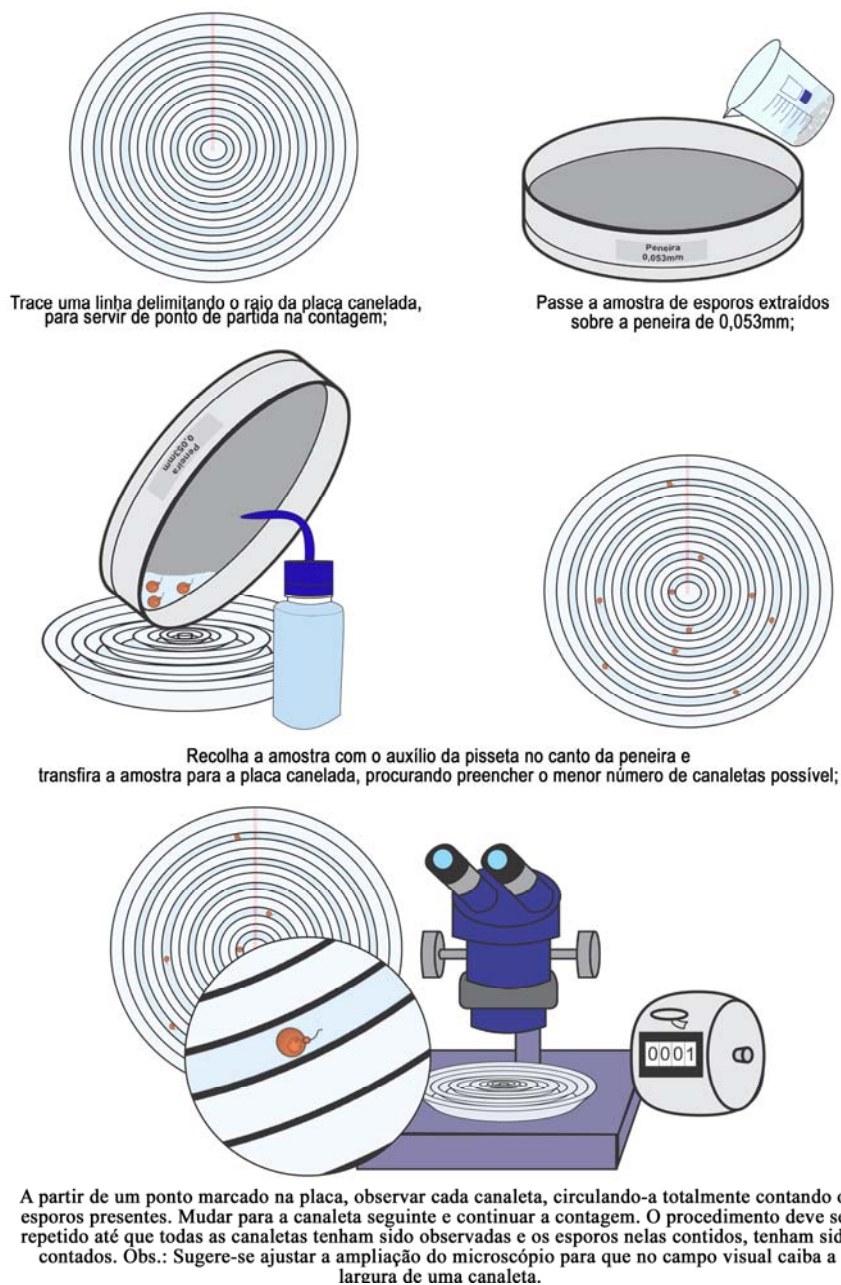


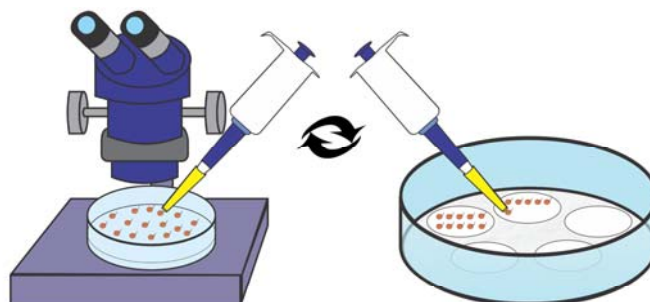
Figura 10 Esquema dos passos seguidos na contagem do número de esporos

3.5 Ocorrência e frequência de anastomoses

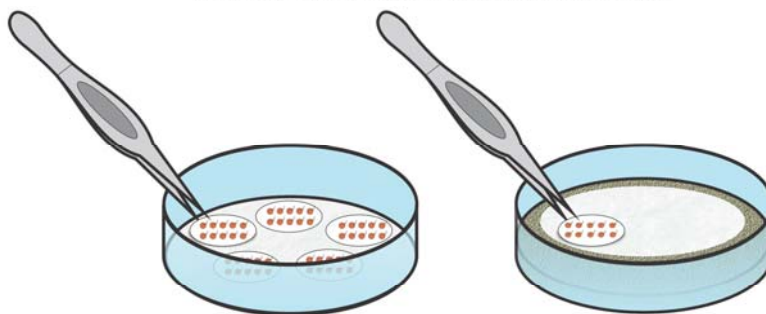
Esporos de 36 linhagens de FMAs (ver artigo 3) obtidos em uma nova extração foram cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico e lavados em água destilada estéril. Os esporos limpos, aparentemente perfeitos e saudáveis foram selecionados e transferidos para membranas de nitrato de celulose do tipo Millipore de 47 mm de diâmetro (poros de 0,45 μ m). As membranas foram divididas ao meio e os esporos foram dispostos em duas fileiras de 5 esporos cada, de forma que os esporos ficassem pareados em cada membrana, com aproximadamente 0,5 cm de distância entre si (Figura 11). Pelo menos 5 membranas foram preparadas para cada linhagem. As cinco membranas foram colocadas sobre outra membrana (Millipore 14cm de diâmetro e poros de 0,45 μ m), levemente umedecida e estabelecida em placas de Petri de 14cm de diâmetro contendo areia lavada estéril. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 27 °C no escuro. As placas foram avaliadas quinzenalmente durante dois meses. Quando se verificava a germinação dos esporos as membranas eram coletadas e coradas (Figura 12), para avaliação da frequência de anastomoses e da frequência do estabelecimento de continuidade protoplasmática e viabilidade das hifas fundidas através da atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) mediante observação da presença de deposições de sais de formazano nos pontos de fusão das hifas (SMITH; GIANINAZZI-PEARSON, 1990). Em seguida, as membranas foram coradas com azul de tripano 0,05% em ácido láctico e montadas em lâminas para microscopia, e observadas ao microscópio de luz Polyvar quanto à formação de anastomose entre hifas do mesmo esporo ou entre hifas de esporos diferentes. O comprimento de hifas foi avaliado através do método de intersecção em grade de linhas descrito por Giovannetti e Mosse (1980). As avaliações foram realizadas sob microscópio estereoscópico. A

frequência de anastomose foi calculada pelo número de anastomoses em relação ao número total de contactos de hifas.

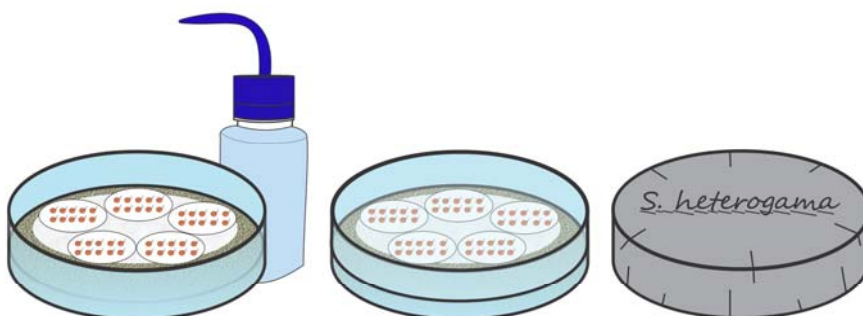
Para visualizar os núcleos nas hifas durante a formação da anastomose, foi utilizado membranas escuras de ésteres de celulose (Millipore diâmetro de 47 mm, tamanho dos poros 0,45µm) para germinar esporos de *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *G. formosanum*, *G. manihotis* e *G. etunicatum*. De sete a quatorze dias após a germinação dos esporos foram montadas em lâminas de microscópio contendo a mistura 1:1 de glicerol e 2, 4-diamidinophenylindole (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) 5 ug / ml de água. Após coloração com DAPI, algumas membranas foram montadas em lâminas de microscópio em uma solução de 0,01% (p/v) de *calcofluor white* (Sigma Aldrich srl) (SBRANA; AVIO; GIOVANNETTI, 1995) e observadas sob epifluorescência usando o filtro de combinação U1 (BP 330-380, LP 418, DS 420). Imagens foram adquiridas com uma câmera digital *L19 coolpix Nikon* aplicada à ocular do microscópio.



Após a extração dos esporos, estes devem ser cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico e em seguida, os esporos limpos, aparentemente perfeitos e saudáveis, devem ser transferidos para membranas do tipo Millipore® (0,45 μm). As membranas devem ser previamente dispostas sobre papel de filtro umedecido. Distribuir os esporos em duas filas contendo cinco esporos cada.



Transferir as membranas contendo os esporos para uma placa de Petri contendo areia lavada estéril. Para manter a umidade homogênea deve-se colocar sobre a areia outra membrana do tipo Millipore® (0,45 μm), a qual deve possuir o diâmetro próximo ao da placa.



Molhar um pouco a areia, fechar a placa e vedar com parafilme e em seguida embrulhá-la com papel alumínio. Incubar em estufa a 27°C. OBS: Não encharcar a placa, molhar apenas o suficiente para manter a membrana úmida. Observar semanalmente se os esporos germinaram ou se é preciso colocar água.

Figura 11 Esquema dos passos seguidos na montagem de membranas para germinação de esporos de FMAs.

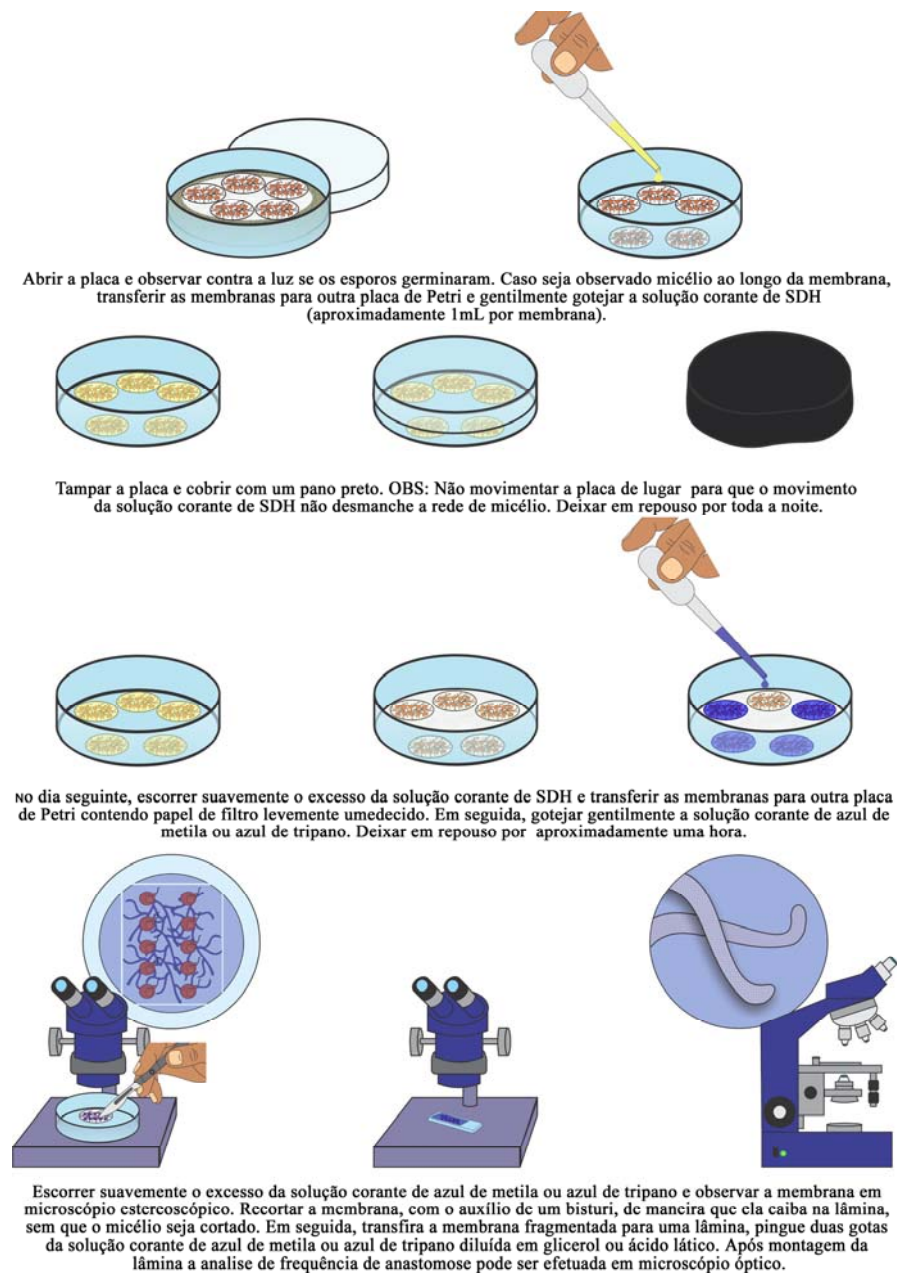


Figura 12 Esquema dos passos seguidos na coloração (SDH e azul de tripano) de membranas contendo esporos de FMAs germinados.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em decorrência da importância da biota e dos processos biológicos para a produção agrícola e da necessidade de se reabilitar ecossistemas degradados pela atividade humana, há grande interesse em estudos sobre a biologia e os efeitos benéficos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), no crescimento e desenvolvimento de plantas. O caráter biotrófico obrigatório associado à ausência de fase sexuada conhecida dos FMAs impõe limitações ao estudo de aspectos básicos da biologia e genética desses fungos. Particularmente na identificação e classificação taxonômica, o que atrapalha os estudos sobre a diversidade funcional dos FMAs. Na condição de biotróficos obrigatórios, a capacidade de formar anastomose e estabelecer um fluxo de protoplasma pode representar um mecanismo fundamental para a manutenção da continuidade fisiológica e genética. Estes processos podem ter consequências importantes, representando uma estratégia de sobrevivência chave para os FMAs, permitindo a manutenção da diversidade genética, na ausência de recombinação sexual. Os resultados do Capítulo 2 fornecem dados sobre a germinação de esporos, arquitetura e crescimento pré-simbiótico do micélio, formação de anastomose entre hifas do mesmo e de diferentes esporos, continuidade protoplasmática e presença de núcleos nas pontes de fusão das hifas. Isto amplia a lista de espécies de FMAs que fazem anastomose e indica que a anastomose em FMAs é muito mais frequente do que se imaginava e que esta frequência pode variar muito entre populações diferentes, assim como ocorre em basidiomicetos. A variabilidade na frequência de anastomose entre espécies e linhagens pertencentes a mesma espécie, assim como a capacidade de germinação das linhagens e características do micélio pré-simbiótico pode influenciar na velocidade de colonização, fluxo de água e nutrientes, e consequentemente nas respostas da

inoculação destas linhagens. O que pode ajudar a compreender a variabilidade funcional relatada no Capítulo 4. As fusões de hifas em FMAs representam um meio para a troca de material genético, particularmente em anastomoses entre hifas derivadas de esporos geneticamente diferentes que possivelmente gerarão indivíduos geneticamente diversos, mas morfologicamente similar. Diante disso foi sugerido que esporos de FMAs podem conter genes ribossomais de morfoespécies diferentes. No Capítulo 3 descrevemos as características moleculares parciais dos genes 18S e 5.8S rDNA e regiões intergênicas obtidas por meio de PCR-(*TaqI*, *MspI*, *HinfI*)-RFLP. Os resultados deste estudo revelaram que a técnica de PCR-RFLP aplicada ao gene ribossomal 18S e regiões ITS é eficiente para discriminar tanto espécies filogeneticamente próximas quanto linhagens de mesma espécie, e ilustram a possibilidade de variabilidade genética entre linhagens de *G. etunicatum*, *E. colombiana*, *A. morrowiae* e *S. heterogama*, a qual pode ter sido obtida através de fusões de hifas entre organismos geneticamente distintos. No entanto, para a conclusão deste estudo é necessário a obtenção das sequências para comprovação de que o DNA amplificado e clivado se trata realmente do DNA do fungo, embora os agrupamentos das linhagens obtidos tenham sido parcialmente coerentes com a classificação das espécies baseada na morfologia dos esporos. A variabilidade genética entre linhagens de FMAs de mesma espécie não é uma novidade, pois tem sido relatada por vários autores, no entanto deve ser melhor estudada.

Vários trabalhos evidenciaram a variabilidade funcional entre isolados geográficos de mesma espécie, Siqueira, (1995) relatou entre isolados geográficos de mesma espécie conferem resposta diferenciada ao cafeeiro. No capítulo 4 nós também relatamos diferenças funcionais, que pode ser maiores entre linhagens da mesma espécie do que entre espécies distintas definidas com base na morfologia dos esporos. De maneira geral, o que tem causado essa variabilidade funcional? Diferenças de potencial de inoculo? Diferenças

biológicas como as relatadas no Capítulo 2? Com base na morfologia pode-se saber se as morfo-espécies estudadas nesses trabalhos constituem uma mesma espécie ou são espécies distintas? Existe variabilidade genética entre estas linhagens? Seria a variabilidade genética que causa essa variabilidade funcional? Não foi possível estabelecer relação entre a variabilidade funcional inter e intraespecífica de FMAs com a variabilidade genética analisada pela técnica do RLFP, uma vez que, grupos com 100% de similaridade genética apresentaram fungos eficientes e não eficientes para promover o crescimento e nutrição do milho.

Diversos fatores podem influenciar nas respostas da inoculação desses fungos, sendo a influência das condições ambientais de onde esses fungos foram isolados um dos fatores. Nós procuramos diminuir as interferências ambientais associados à origem das linhagens e uniformização do potencial de infecção, multiplicando simultaneamente nas mesmas condições todas as linhagens utilizadas. Entretanto, quantos ciclos de multiplicações, gerações, cultivados em condições idênticas seriam necessários para que esses fungos perdessem essa influência externa? Esses paradoxos e questões fundamentais ainda estão sem respostas. Neste sentido, A capacidade de micélio formar anastomose assimbiótica e simbiótica, características do micélio, e a variabilidade genética e funcional devem ser mais investigadas em conjunto, para melhorar a nossa compreensão do desempenho funcional dos FMAs.

Nós procuramos estudar a variabilidade funcional para colonização, promoção do crescimento e absorção de P, bem como, observar sua relação com a variabilidade genética obtidas pela caracterização via PCR-RFLP e avaliar a compatibilidade genética e formação de anastomose de 58 linhagens tropicais de 20 espécies e 06 gêneros de FMAs tropicais. No entanto, nem todos os dados obtidos puderam ser correlacionados, uma vez que muitos dos isolados não multiplicaram em quantidade suficiente para serem utilizados em todos os

experimentos, além disso, muitas das linhagens inclusive de mesma espécie, apresentaram variabilidade na germinação dos esporos dificultando os estudos de compatibilidade vegetativa e anastomose. Entretanto, os resultados obtidos fornecem novas e importantes informações a serem incorporadas para aumentar o entendimento da biologia e ecologia dos FMAs, os quais apresentaram variabilidade genética, variabilidade na frequência e ocorrência de anastomose e conseqüentemente funcional.

REFERÊNCIAS

AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? **New Phytologist**, Oxford, v. 173, n. 4, p. 808-816, Mar. 2007.

AVIO, L. et al. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. **New Phytologist**, Oxford, v. 172, n. 2, p. 347-357, Oct. 2006.

_____. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 55, n. 3, p. 242-253, Mar. 2009.

AZIZ, T.; HABTE, M. Determining vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, n. 12, p. 1097-1101, Dec. 1987.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, n. 3, p. 949-958, Nov. 2000.

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

BENTIVENGA, S. P.; MORTON, J. B. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 5, p. 719-731, June 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.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

CROLL, D. et al. Nonsel self vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, Oxford, v. 181, n. 4, p. 924-937, Mar. 2009.

DODD, J. C. et al. European bank of glomales: an essential tool for efficient international and interdisciplinary collaboration. In: GIANINAZZI, S.; SCHUEPP, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: Birkhauser Verlag, 1994. p. 41-45.

FITTER, A. H. Darkness visible: reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 231-243, Apr. 2005.

FOUGNIES, L. et al. Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 159-166, Feb. 2006.

GERDEMANN, J. N.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of British Mycorrhizal Society**, Cambridge, v. 46, p. 235-244, 1963.

GERDEMANN, J. W.; TRAPPE, J. M. **The endogonaceae in the Pacific Northwest**. Bronx: Mycological Society of America, 1974. 76 p. (Mycologia Memoir, 5).

GIANINAZZI-PEARSON, V. et al. Exploring the genome of *Glomalean fungi*. In: HOCK, B. (Ed.). **The mycota, fungal associations**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 3-17.

GIOVANNETTI, M. Spore germination and pre-symbiotic mycelia growth. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, J. D. D. (Ed.). **Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function**. Wageningen: Kluwer Academic, 2000. p. 47-68.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: physiological and genetic aspects. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. (Ed.). **Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function**. Wageningen: Springer, 2010. p. 3-32.

GIOVANNETTI, M.; AZZOLINI, D.; CITERNESI, A. S. Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5571-5575, Dec. 1999.

GIOVANNETTI, M. et al. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographical areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 616-624, Jan. 2003.

_____. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, n. 1, p. 175-181, Jan. 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, June 1980.

GODFREY, R. M. Studies of British species of endogone: I., morphology and taxonomy. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 40, p. 117-135, 1957.

GOTO, B. T.; MAIA, L. C.; OEHL, F. *Ambispora brasiliensis*, a new ornamented species in the arbuscular mycorrhiza forming Glomero-mycetes. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 105, n. 1, p. 11-18, Mar. 2008.

HEIJDEN, E. W. van der; KUYPER, T. W. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of mycorrhiza l symbiosis? **Plant and Soil**, The Hague, v. 230, n. 1/2, p. 161-174, Feb. 2001.

HEIJDEN, M. G. A. van der; SCHEUBLIN, T. R.; BRADER, A. Taxonomic and functional diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: is there any relationship? **New Phytologist**, Cambridge, v. 164, n. 2, p. 201-204, Nov. 2004.

HUSBAND, R.; HERRE, E. A.; YOUNG, J. P. Temporal variation in the AM communities colonising seedlings in a tropic forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 131-136, Apr. 2002.

INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. Disponível em: <<http://www.invam.caf.wvu.edu/index.html>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. 8th ed. London: Chapman and Hall, 1992. 418 p.

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

KHADE, S. W. New characteristics for morphotaxonomy of gigaspora species belonging to arbuscular mycorrhizal fungi. **Journal of Plant Development**, Iasi, v. 18, n. 1, p. 71-80, Jan. 2011.

KOSKE, R. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 76, p. 328-330, 1981.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 486-488, June 1989.

KRÜGER, M.; WALKER, C.; SCHÜBLER, A. *Acaulospora brasiliensis* comb. nov. and *Acaulospora alpina* (Glomeromycota) from upland Scotland: morphology, molecular phylogeny and DNA-based detection in roots. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 577-587, June 2011.

LOGI, C.; SBRANA, C.; GIOVANNETTI, M. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 9, p. 3473-3479, Sept. 1998.

MERGULHAO, A. C. D. S. et al. Characterisation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi species by PCR/RFLP analysis of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 58, n. 2, p. 341-344, Feb. 2008.

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Aculosporaceae and Gigasporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 471-491, 1990.

MUNKVOLD, L. et al. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 164, n. 2, p. 357-364, Nov. 2004.

NILSSON, R. H. et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Journal of Evolutionary Bioinformatics**, Auckland, v. 4, p. 193-201, May 2008.

NOVAIS, C. B.; SOUZA, F. A. de; SIQUEIRA, J. O. Phenotypic and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal spores from cultures maintained in germplasm collection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 806-896, ago. 2010.

OEHL, F. et al. Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 116, n. 1, p. 75-120, Jan. 2011b.

_____. Glomeromycota: two new classes and a new order. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 116, p. 365-379, Apr./June 2011a.

OEHL, F.; SOUZA, F. A. de; SIEVERDING, E. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhizal-forming Glomeromycetes. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 106, p. 311-360, Oct./Dec. 2008.

PENA, E. de la et al. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. **New Phytologist**, Oxford, v. 169, n. 4, p. 829-840, Aug. 2006.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC, 2004. 173 p.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, J. G. D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com mudas de espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 413-424, maio/jun. 2006.

PURIN, S.; MORTON, J. B. In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 505-514, Aug. 2011.

REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi with in colonized roots. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 73-80, Mar. 2000.

REDECKER, D. et al. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1756-1761, May 1997.

RILLIG, M. C. et al. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 233, n. 2, p. 167-177, June 2001.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 221-228, 1995.

SAUPE, S. J.; CLAVE, C.; BEGUERET, J. Vegetative incompatibility in Wlamentous fungi: Podospora and Neurospora provide some clues. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 608-612, Dec. 2000.

SBRANA, C.; AVIO, L.; GIOVANNETTI, M. The occurrence of calcofluor and lectin binding polysaccharides in the outer wall of AM fungal spores. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1249-1252, 1995.

SBRANA, C.; NUTI, M. P.; GIOVANNETTI, M. Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of *Tuber borchii* isolates. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, n. 8, p. 667-675, Aug. 2007.

SCHENK, N. C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: University of Florida, 1988. 242 p.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Glomeromycota rRNA genes: the diversity of myths? **Mycorrhiza**, Berlin, v. 13, n. 4, p. 233-236, May 2003.

_____. New fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, Dec. 2001.

SILVA, M. M.; COLOZZI FILHO, A. Emprego de técnicas moleculares na taxonomia e em estudos sobre ecologia e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p. 127-152.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. 716 p.

SMITH, S. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 17, n. 2, p. 177-188, 1990.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic, 2008. 800 p.

SOUZA, F. A. de; DECLERCK, S. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycologia**, New York, v. 95, n. 6, p. 1004-1012, Dec. 2003.

SOUZA, F. A. de et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. v. 1, p. 15-75.

_____. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. In: DECLERCK, S.; STRULLU, D. G.; FORTIN, A. (Ed.). **In vitro culture of Mycorrhizas**. Berlin: Springer, 2005. v. 4, p. 73-91.

_____. 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1413-1424, June 2004.

SPAIN, J. L. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 43, p. 331-339, Jan./Mar. 1992.

STÜRMER, S. L. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 247-258, May 2012.

TOMMERUP, I. C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of British Mycorrhizal Society**, Cambridge, v. 81, n. 1, p. 37-45, Aug. 1983a.

_____. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Transactions of British Mycorrhizal Society**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 381-387, Oct. 1983b.

WALKER, C. et al. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov.,

and emendation of Archaeospora and Archaeosporaceae. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 1, p. 137-153, Jan. 2007.

_____. New fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 12, p. 1500-1506, 1995.

WALKER, C.; SANDERS, F. E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III., the separation of Scutellospora gen. nov. from Gigaspora Gerd. & Trappe. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 27, n. 2, p. 169-182, Apr. 1986.

WALKER, C.; SCHÜBLER, A. Molecular clarifications and new taxa in the Glomeromycota. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 12, p. 981-982, Dec. 2004.

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, n. 5, p. 299-363, May 2006.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Vegetative compatibility and anastomosis formation within and among individual germlings of tropical isolates of acaulospora and glomus (*Glomeromycota*)

(Artigo normalizado de acordo com o periódico Mycorrhiza)

RESUMO

Anastomoses em hifas, que desempenham um papel fundamental na formação de redes micorrízicas interconectadas e na troca genética entre os indivíduos compatíveis, foram estudadas em um número limitado de espécies e isolados de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), principalmente em micélio simbiótico. Neste trabalho, a ocorrência e a frequência de anastomose entre hifas dos mesmos e de diferentes esporos individualmente germinados foram avaliadas em isolados tropicais pertencentes à *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e *Glomus*. Relatamos, pela primeira vez, que as espécies pertencentes ao gênero *Acaulospora* são capazes de produzir anastomose, com frequências semelhantes aos das espécies *Glomus*. Hifas de esporos pertencentes à *Glomus* e *Acaulospora* formam anastomoses perfeitas, com frequências que variam de $9,29 \pm 3,01\%$ a $79,84 \pm 4,39\%$ entre hifas do mesmo esporo e de $14,02 \pm 7,36\%$ a $91,41 \pm 3,92\%$ entre hifas de esporos diferentes. Fusões raras, que ocorrem dentro da mesma hifa, foram detectadas em espécies de *Gigaspora* e não foi observada nenhuma anastomose em espécies de *Scutellospora*. A detecção consistente de núcleos em pontes de fusão em todos os isolados e espécies de *Glomus* e *Acaulospora* sugere que a migração nuclear é um processo ativo, tanto dentro como entre hifas pertencentes diferentes esporos. Dados atuais sobre a formação de anastomose, a migração nuclear e a viabilidade de germinação em isolados tropicais de FMA amplia nosso conhecimento sobre a ocorrência extensa e coerente de bem-sucedidas fusões entre hifas neste grupo de simbioses benéficas. A capacidade de formar anastomose e estabelecer um fluxo de protoplasma, fundamental para a manutenção da continuidade fisiológica e genética, pode produzir consequências físicas importantes para os FMAs, que são biotróficos obrigatórios.

Palavras-chave: Palavras-chave: fungos micorrízicos arbusculares tropicais; germinação de esporos, crescimento de hifas; anastomose de hifas, migração nuclear.

Vegetative compatibility and hyphae anastomosis formation belonging to the same or different spores of tropical isolates from *Acaulospora* and *Glomus* (Glomeromycota)

ABSTRACT

Hyphae anastomosis, which play a key role in the formation of interconnected mycorrhizal networks and in genetic exchange among compatible individuals, have been studied in a limited number of species and isolates of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), mainly in symbiotic mycelium. In this work, the occurrence and anastomosis frequency between hyphae of the same and different individually germinated spores were assessed in tropical isolates belonging to *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* and *Glomus*. For the first time was reported, that species belonging to the genus *Acaulospora* are able to produce anastomosis, with frequencies similar to those *Glomus* species. Germlings belonging to *Glomus* and *Acaulospora* formed perfect hyphal fusions, with frequencies ranging from $9.29 \pm 3.01\%$ to $79.84 \pm 4.39\%$ within the same germling and from $14.02 \pm 7.36\%$ to $91.41 \pm 3.92\%$ between different germlings. Rare fusions, occurring within the same hypha, were detected in *Gigaspora* species and no anastomosis were observed in *Scutellospora* species. The consistent detection of nuclei in fusion bridges in all the isolates and species of *Glomus* and *Acaulospora* suggests that nuclear migration is an active process, both within as between germlings. Present data on anastomosis formation, nuclear migration and germination viability in tropical isolates of AMF widen our knowledge on the extensive and consistent occurrence of successful fusions between hyphae in this group of beneficial symbionts. The ability to form anastomosis and establish protoplasm flow, fundamental for the maintenance of physiological and genetic continuity, may produce important physical consequences for the AMFs, which are obligately biotrophic.

Keywords: Tropical arbuscular mycorrhizal fungi. Spore germination. Germling growth. Hyphae anastomosis. Nuclear migration.

1 INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form root symbioses with most plant species from various families, contributing to plant acquisition of soil nutrients, mainly phosphorus, and to the dynamics of plant communities (Van der Heijden et al. 1998; Panwar et al. 2008; Smith and Read 2008). AMF are obligate biotrophs and depend on metabolically active roots to complete their life cycle, which starts with spore germination and is accomplished by the production of extraradical mycelium and new spores, allowing their persistence in soil.

Germination of quiescent spores may be favored by different environmental factors (i.e. pH, temperature, moisture, mineral nutrients) and it is not regulated by host-derived signals (Giovannetti et al. 2010). However, germlings are not able to sustain an extensive independent hyphal growth and cease growing within three weeks since germination (Logi et al. 1998), retracting protoplasm from the tips and forming septa separating viable from empty mycelium (Siqueira et al. 1985). However, in some fungal species, spores are capable of multiple germination, increasing the chances of finding a suitable host (Koske 1981). The hyphae originating from germinated spores produce a coenocytic mycelium which, in many species, show frequent hyphal fusions (anastomoses), which are of critical importance for the maintenance of “mycelial interconnectedness” allowing nutrient flow and a physiological and genetic integration within the asymbiotic colony (Rayner 1996).

After establishing mycorrhizal symbiosis, AMF development is assured by host-derived carbon, that allows the production of an extensive extraradical mycelium spreading from colonized roots into the soil, functional to nutrient uptake and transfer to the host. The analysis of extraradical mycelial structure evidenced the widespread occurrence of anastomoses between contacting

hyphae, originating a highly interconnected network capable of establishing linkages between different plants living nearby (Giovannetti et al. 2001; 2004). A recent finding revealed that young germlings may plug into a pre-existing compatible mycelium, thus gaining access to carbon flowing in the network, suggesting that anastomoses may be fundamental for AMF survival (Sbrana et al. 2011).

AMF are coenocytic organisms containing thousands of nuclei flowing in the mycelium and accumulating within asexually produced spores (Viera and Glenn 1990; Bécard and Pfeffer 1993; Marlean et al 2011). Such nuclei possess a high level of genetic variation and may intermingle during anastomosis (Giovannetti et al. 1999; 2001), allowing genetic exchange between different conspecific germlings (Croll et al. 2009) and the maintenance of AMF genetic diversity (Bever and Wang 2005; Sanders 2002). Thus, in the absence of a tractable genetic system, the assessment of anastomosis formation represents a powerful tool for the identification of genetically different AMF individuals and for investigating the population structure of these obligate symbionts.

The wide occurrence of anastomosis formation between hyphae of the same and different germlings has been detected in a few AMF belonging to a very restricted group of globally distributed species -*Glomus mosseae*, *Glomus intradices*, *Glomus caledonium* - while the inability to produce regular hyphal fusions has been described in species of the genera *Gigaspora* and *Scutellospora* (Giovannetti et al. 1999, 2003; de la Providencia et al. 2005, 2007; Croll et al. 2009).

In this work we studied anastomosis formation in tropical isolates belonging to nine species within the genera *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* and *Glomus*. We investigated the occurrence and frequency of anastomosis between hyphae of the same and different individually germinated

spores, and the intermingling of nuclei in fusion bridges of the same and different germlings.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal material

The AMF isolates used in this study are listed in Table 5. AMF spores were obtained from pure cultures of different Brazilian AMF collections: Laboratory of Soil Microbiology, Federal University of Lavras, Embrapa Agrobiologia, College of Agriculture "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Federal University of Pernambuco (UFPE) and the Regional University of Blumenau (FURB).

To reduce possible environmental effects associated with the different origin of the isolates (maternal effect), our AMF isolates were grown in a greenhouse (Embrapa Agrobiologia - Seropédica, RJ), using *Urochloa decumbens* (syn. *Brachiaria decumbens*) as a host plant. The growing substrate was prepared from ground surface wood, clay and sandy soil (1:1:1 v/v), autoclaved for two consecutive days for 60 minutes at 120 °C) and maintained for 15 days in the laboratory, for possible oxidation of soluble manganese. The main soil chemical properties were: pH (H₂O), 4.8; Ca⁺², 1.3 cmolc dm⁻³; Mg⁺², 0.9 cmolc dm⁻³; Al⁺³, 0.3 cmolc dm⁻³; total P, 5.2 mg dm⁻³; K, 32 mg dm⁻³ (Mehlich 1953); organic matter, 7.8 g kg⁻¹. We prepared pot cultures with 500ml of autoclaved substrate, by inoculating sterile seedlings of *U. decumbens* with 50 spores placed on plant roots with the aid of a pipette.

Table 5. Geographic origin of arbuscular mycorrhizal fungal tropical isolates used in germination tests.

Fungal species	Isolate code	Geographic origin	Biome	Donor
<i>Acaulospora morrowiae</i>	PRN108B	Paraíba	Atlantic Forest	Sturmer, S.
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	A38 (IES-33)	Cuba	—	Saggin, O.J.
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	ALCOA29	Minas Gerais	Atlantic Forest	Siqueira, J.O.
<i>Acaulospora spinosa</i>	95-UFLA	—	Cerrado	Siqueira, J.O.
<i>Acaulospora sp.</i>	A88 (CNPAB 044)	Minas Gerais	Cerrado	Saggin, O.J.
<i>Entrophospora colombiana</i>	A87 (CNPAB 043)	Minas Gerais	Cerrado	Saggin, O.J.
<i>Entrophospora colombiana</i>	A15 (CNPAB 015)	Rio de Janeiro	Atlantic Forest	Saggin, O.J.
<i>Entrophospora colombiana</i>	ALCOA-CCB2	Minas Gerais	Cerrado	Siqueira, J.O.
<i>Entrophospora colombiana</i>	AMZ570A	Amazonas	Amazon Forest	Sturmer, S.
<i>Gigaspora albida</i>	URM- FMA 01	—	—	Maia, L.C.
<i>Gigaspora albida</i>	03-UFLA MG	Minas Gerais	Cerrado	Siqueira, J.O.
<i>Gigaspora candida</i>	A36 (IES-29)	Cuba	—	Saggin, O.J.
<i>Gigaspora margarita</i>	A49 (Inóculo 138)	Minas Gerais	Cerrado	Saggin, O.J.
<i>Gigaspora margarita</i>	A1 (CNPAB 001)	Flórida, EUA	—	Saggin, O.J.
<i>Gigaspora margarita</i>	A41 (IES-42)	Cuba	—	Saggin, O.J.
<i>Gigaspora margarita</i>	279-UFLA	—	—	Siqueira, J.O.
<i>Gigaspora margarita</i>	R1 UFLA	—	—	Siqueira, J.O.
<i>Gigaspora rosea</i>	A35 (IES-19)	Cuba	—	Saggin, O.J.
<i>Glomus clarum</i>	URM - FMA 08	—	—	Maia, L.C.
<i>Glomus clarum</i>	CMM-306	Minas Gerais	Cerrado	Siqueira, J.O.
<i>Glomus clarum</i>	—	Santa Catarina	—	Cardoso, E.J.B
<i>Glomus clarum</i>	351-UFLA	Flórida, EUA	—	Siqueira, J.O.
<i>Glomus etunicatum</i>	365-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	Siqueira, J.O.
<i>Glomus etunicatum</i>	URM-FMA 03	—	—	Maia, L.C.
<i>Glomus etunicatum</i>	SCT101A	Santa Catarina	Atlantic Forest	Sturmer, S.
<i>Glomus formosanum</i>	A20 (CNPAB 020)	Rio de Janeiro	Atlantic Forest	Saggin, O.J.
<i>Glomus manihotis</i>	A83 (CNPAB 041)	Rio de Janeiro	Atlantic Forest	Saggin, O.J.
<i>Glomus SP.</i>	A90 (CNPAB 046)	Pernambuco	Coastal Plain	Saggin, O.J.
<i>Scutellospora calospora</i>	A80 (CNPAB 038)	Pará	Amazon Forest	Saggin, O.J.
<i>Scutellospora gregaria</i>	200-UFLA	Flórida, EUA	—	Siqueira, J.O.

“Table 5, conclusion”

Fungal species	Isolate code	Geographic origin	Biome	Donor
<i>Scutellospora heterogama</i>	A2 (CNPAB 002)	São Paulo	Atlantic Forest	Saggin, O.J.
<i>Scutellospora heterogama</i>	312-UFLA	Flórida, EUA	—	Siqueira, J.O.
<i>Scutellospora heterogama</i>	URM- FMA 05	—	—	Maia, L.C.
<i>Scutellospora heterogama</i>	—	—	—	Cardoso, E.J.B
<i>Scutellospora pellucida</i>	A70 (CNPAB 029)	Rio de Janeiro	Atlantic Forest	Saggin, O.J.
<i>Scutellospora pellucida</i>	128-UFLA	Minas Gerais	Cerrado	Siqueira, J.O.

2.2 Morphological characterization

After six months' growth in pots, 50 ml soil samples were used for spore extraction, by wet sieving and decanting through a set of nested sieves (Gerdemann and Nicolson 1963) and centrifugation in water and sucrose solution (Jenkins 1964). After extraction, at least 50 spores were selected under a stereoscopic microscope and placed on microscope slides with PVLG (polyvinyl lacto glycerol) and PVLG + Melzer's reagent (1:1). The identity of newly produced spore was confirmed using morphological descriptions shown in the INVAM (<http://www.invam.caf.wvu.edu/index.html>) and the Department of Plant Pathology of the Agricultural University in Szczecin site (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota>).

2.3 Anastomosis formation in germlings

Spores were rinsed in distilled water, selected under a dissecting microscope and individually transferred to cellulose nitrate membranes (Millipore, 47mm diameter; 0.45µm pore size). Spores were placed in two rows of five, approximately 0.5 cm apart. For each isolate, at least five membranes were prepared, which were placed on moist sterile quartz grit covered by a large

membrane (Millipore, 125 mm diameter; 0.45µm pore size) in 14 cm diameter Petri dishes. The plates were sealed with Parafilm and incubated at 27 °C in the dark. Spore germination was monitored weekly. Germinated spores were stained for succinate dehydrogenase activity (SDH) localization, to assess the establishment of protoplasmic continuity and the viability of anastomosed hyphae by observing the presence of formazan salt depositions in hyphal bridges (Smith and Gianinazzi-Pearson 1990). Stained membranes were mounted on microscope slides with trypan blue 0.05% in lactic acid and observed under a Reichert-Jung (Vienna, Austria) Polyvar light microscope equipped with epifluorescence optics. The formation of anastomosis between hyphae belonging to the same spore or to different spores was evaluated by assessing the number of contacting hyphae that formed anastomoses.

Hyphal length was evaluated under a dissecting microscope by using the grid line intersect method (Giovannetti and Mosse 1980). The experiments were conducted in the laboratory of Soil Microbiology of the Department of Crop Plant Biology, University of Pisa, Italy.

2.4 Nuclei in anastomosing hyphae

To visualise nuclei in hyphae during anastomosis formation, we used black membranes of cellulose esters (Millipore 47mm diameter, pore size 0.45µm) to germinate spores of *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *G. formosanum*, *G. manihotis* and *G. etunicatum*. Seven to 14-day-old germinated spores were mounted on microscope slides in 2, 4-diamidinophenylindole (DAPI) (Sigma, St. Louis, Mo.) 5 µg/ml in 1:1 water-glycerol. After DAPI staining, some membranes were mounted on microscope slides in a 0.01% (w/v) solution of Calcofluor White (Sigma Aldrich s.r.l.) (Sbrana et al. 1995). Slides were observed under epifluorescence by using the filter combination U1 (BP 330-380,

LP 418, DS 420). Images were acquired with a Nikon coolpix L19 digital camera applied to the microscope eyepiece.

3 RESULTS

3.1 Spore germination and germling hyphal length.

Spores of *Glomus* species germinated by emergence of single or multiple germ tubes from the old subtending hypha, while germ tubes of *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Scutellospora* germinated directly through the spore wall. In particular, germination in species of *Scutellospora* occurred after the development of a germination shield within inner layers of the spore wall.

Spore germination of the different isolates was erratic, even within the same species, showing significantly different germination abilities in the in vivo culture system used (df = 11, F = 7.85, P < 0.001; Table 6). Spores of *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *G. etunicatum*, *G. manihotis*, *G. formosanum*, *Gi. rosea*, *Gi. albida* and *S. calospora* presented the highest germination percentages, that ranged between 20.0 ± 4.5 and 78.0 ± 8.0 (in *A. spinosa* and *G. formosanum*, respectively) (Table 6).

Table 6. Percentages of spore germination, hyphal length and mean growth rate per spore of nine arbuscular mycorrhizal fungal tropical isolates. In columns, means (\pm S.E. of means) followed by different letters are significantly different for P = 0.01.

Fungal species	Germination rate (%)	Hyphal length per spore (cm)	Mean growth rate per spore (mm/day)
<i>A. scrobiculata</i> (A38)	24.73 ± 6.28 cd	7.96 ± 1.89	3.62 ± 0.86 b
<i>A. spinosa</i> (95-UFLA)	20.00 ± 4.47 cd	6.06 ± 1.99	2.75 ± 0.90 b
<i>G. etunicatum</i> (SCT101A)	29.00 ± 5.67 bcd	8.17 ± 1.86	16.33 ± 3.72 a
<i>G. formosanum</i> (A20)	78.00 ± 8.00 a	5.08 ± 0.69	10.15 ± 1.38 ab
<i>G. manihotis</i> (A83)	24.00 ± 7.48 cd	2.80 ± 0.62	5.61 ± 1.24 b
<i>G. clarum</i> (351-UFLA)	8.00 ± 2.00 d	3.12 ± 1.15	6.24 ± 2.29 b
<i>Gi. albida</i> (URM- FMA 01)	24.00 ± 5.21 cd	3.15 ± 1.02	1.43 ± 0.46 b
<i>Gi. rosea</i> (A35)	62.00 ± 8.00 ab	6.56 ± 0.93	2.98 ± 0.42 b
<i>S. calospora</i> (A80)	44.00 ± 9.45 abc	5.10 ± 0.85	2.32 ± 0.39 b

After germination, hyphae originating from individually germinated spores of *Glomus* and *Acaulospora* followed a forward, linear growth, with a strong apical dominance and regular, right-angled branches, giving rise to a coenocytic colony where an active bidirectional flow of nuclei, mitochondria, fat droplets, vacuoles and organelles was detected. Nevertheless, some differences among the diverse species were observed, e. g. *G. etunicatum* developed more secondary branches than *G. formosanum* (Fig. 13 e-f) and mycelial development and architecture of *G. manihotis* and *G. clarum* appeared different in our experimental system: spores of *G. manihotis* germinated through several germ tubes, forming short and abundant secondary branches, whereas *G. clarum* germlings showed a few lateral branches, with an architecture similar to *G. etunicatum* and *G. formosanum* (Fig. 13 c-d). Based on morphological characters and results of molecular analyses *G. manihotis* and *G. clarum* were considered species synonymous (Schwarzott et al. 2001), and this characteristic may represent a difference between these two species.

Mycelial architecture of *A. scrobiculata* and *A. spinosa* was very similar to that of species of the genus *Glomus*, excepted that hyphae of *A. scrobiculata* were thinner (Fig. 13 a-b). By contrast, hyphae originating from germinated spores of *Gigaspora* and *Scutellospora* did not follow a linear growth, showing a coiled appearance, with only a few coiled branches (Fig. 13 g-j).

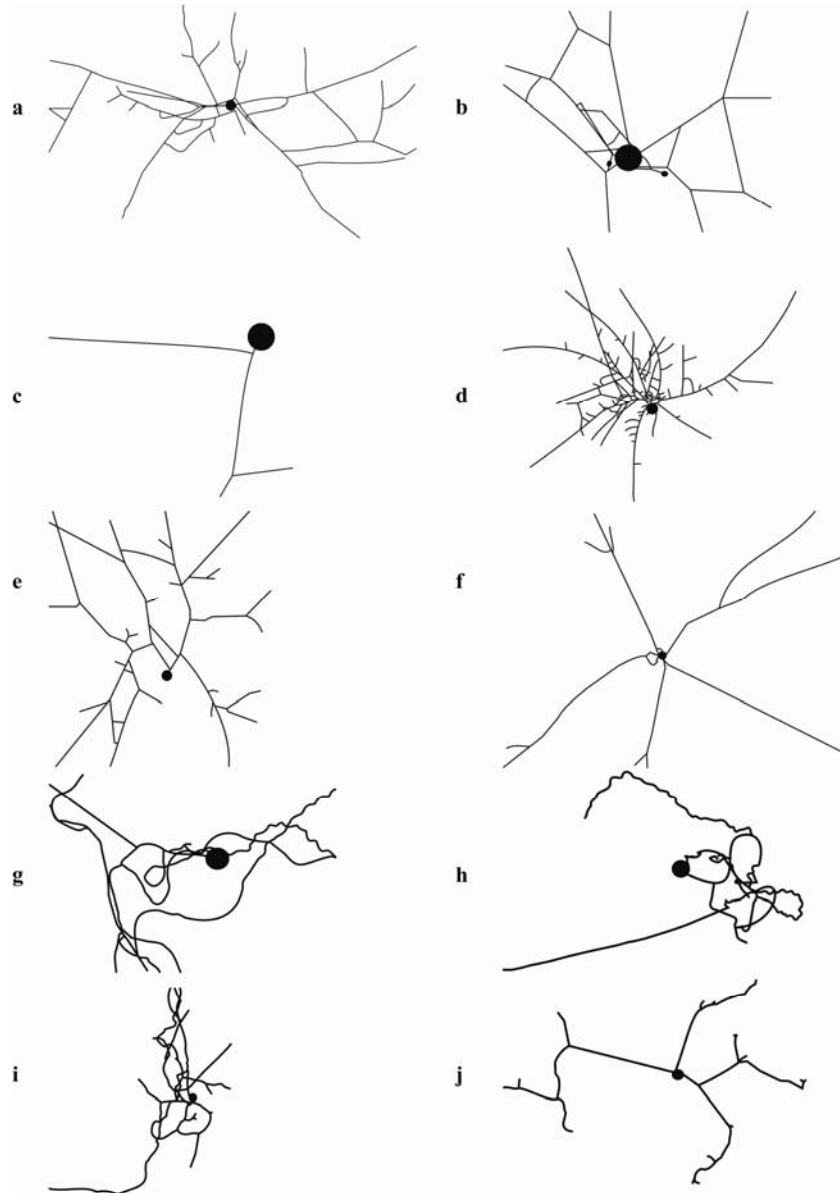


Figure 13 Architecture of asymbiotic mycelium of different tropical isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. a) *Acaulospora scrobiculata*; b) *Acaulospora spinosa*; c) *Glomus clarum*; d) *Glomus manihotis*; e) *Glomus etunicatum*; f) *Glomus formosanum*; g) *Gigaspora albida*; h) *Gigaspora rosea*; i) *Scutellospora calospora* ; j) *Scutellospora pellucida*.

Hyphal growth per germinated spore was variable, although not significantly different, among species and genera, ranging from 3.12 μ 1.15 cm (*G. clarum*) to 8.17 μ 1.86 cm (*G. etunicatum*) per spore after 22 and 10 days, respectively (Table 6). Lower values were observed for single germinating spores of *S. pellucida* and *S. gregaria*.

The mean growth rate of the mycelium during the early growth phase ranged from 5.61 \pm 1.24 to 16.33 \pm 3.72 mm/day in *Glomus* species, from 2.75 \pm 0.90 to 3.62 \pm 0.86 mm/day in *Acaulospora* species, from 1.43 \pm 0.46 to 2.98 \pm 0.42 mm/day in *Gigaspora* species, with significant differences among all the species tested (df = 8, F = 7.73, P < 0.001; Table 6).

New hyphae of *G. manihotis* extended up to only 2.8 cm after 5 days' incubation. Thereafter, mycelial growth was arrested, protoplasm was retracted and several septa formed from the peripheral hyphal tips. Early septation of mycelium was also observed in *G. etunicatum* germlings, where septa formation was observed after 10 days of growth. In *A. scrobiculata*, mycelial growth was arrested and protoplasm was retracted from the peripheral hyphal tips after 22 days' culture. This process led to the formation of many cross walls separating protoplasm-containing from empty hyphae (Fig. 14 a-b).

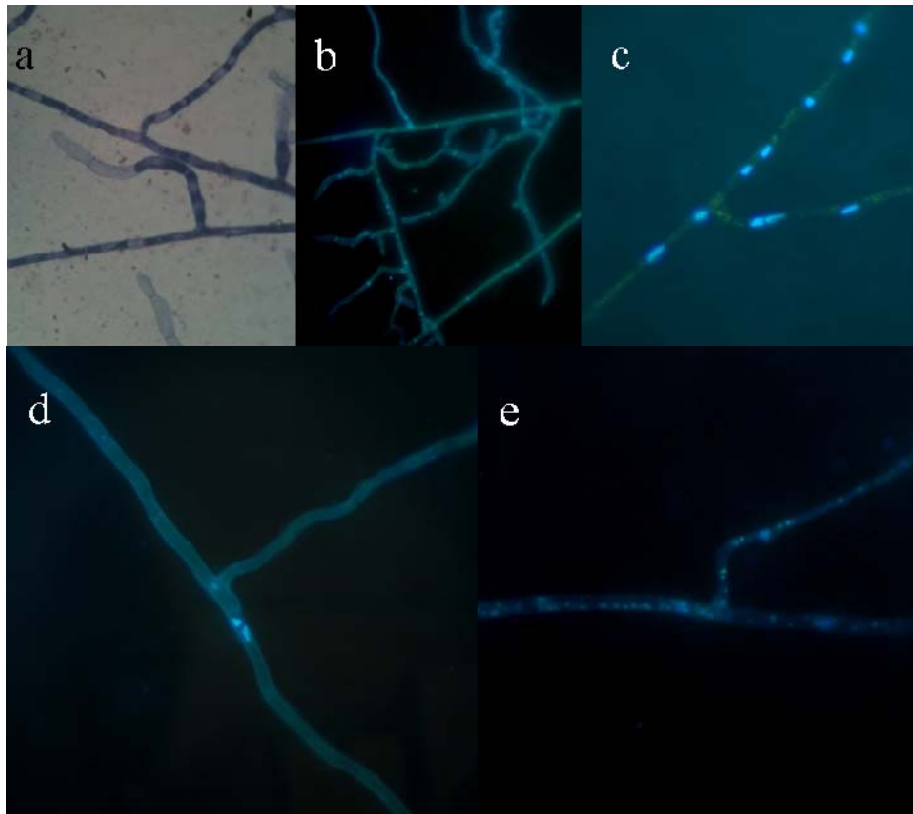


Figure 14. Light and epifluorescence micrographs showing germling hyphal septation and nuclear intermingling in anastomosing hyphae of different tropical isolates of arbuscular mycorrhizal fungi, after 2, 4-diamidinophenylindole or Calcofluor staining. a) Hyphal vacuolization and b) septa formation in germlings of *Glomus manihotis* after 5 days' culture (bar=50 μm and 80 μm , respectively); c) nuclei in anastomosing hyphae of *Glomus formosanum* originating from the same and (d) from different germlings (bar=25 μm and 17 μm , respectively); e) nuclei in fusing hyphae of an *Acaulospora scrobiculata* germling (bar=17 μm).

3.2 Anastomosis formation and occurrence of nuclei in fusion bridges.

To assess anastomosis formation, contacting hyphae observed under the Polyvar microscope were traced back to the origin to check whether the contact occurred between hyphae originating from different germings or from the same one. We detected anastomoses between hyphae belonging to the same individually germinated spore and between different germings of the same isolate in three *Glomus* and in two *Acaulospora* species (Fig. 15 a-f). No anastomoses were observed between hyphae belonging to the same germling of *S. calospora* and *Gigaspora*.

Anastomoses were mainly of the type tip-to-side, and rare tip-to-tip fusions were observed. During pre-contact interactions, the approaching hyphal tips either differentiated a swelling or developed branches growing towards the contacted hypha, showing growth orientation and suggesting the existence of an interhyphal remote signalling (Fig. 15 b, f). When a tip contacted the adjacent hypha, it stopped growth, the walls fused and a protoplasmic flow was established through the fusion bridge.

Successful anastomoses were characterized by high compatibility, consisting in the complete fusions of hyphal walls and by protoplasm continuity and viability, evidenced by the histochemical localization of formazan salt depositions in hyphal fusions, indicating succinate dehydrogenase (SDH) activity. SDH activity was consistently detected in all the anastomoses analysed (Fig. 15 c-d).

DAPI staining and epifluorescence microscopy showed the occurrence of nuclei in the middle of hyphal bridges, both in fusions between hyphae belonging to the same germling and between hyphae belonging to different germings of the same isolate in *A. scrobiculata*, *A. spinosa* and *G. formosanum* (Fig. 14 c-e).

No hyphal incompatibility reactions, such as vacuolization, septal plugging, or hyphal fusion compartment lysis and death, were detected in any of the contacts analysed, after both SDH activity localisation and DAPI/calcofluor staining. However, in interactions between hyphae belonging to the same or to different germlings which did not lead to anastomosis, hyphae appeared to intersect without any contact reaction or incompatible response.

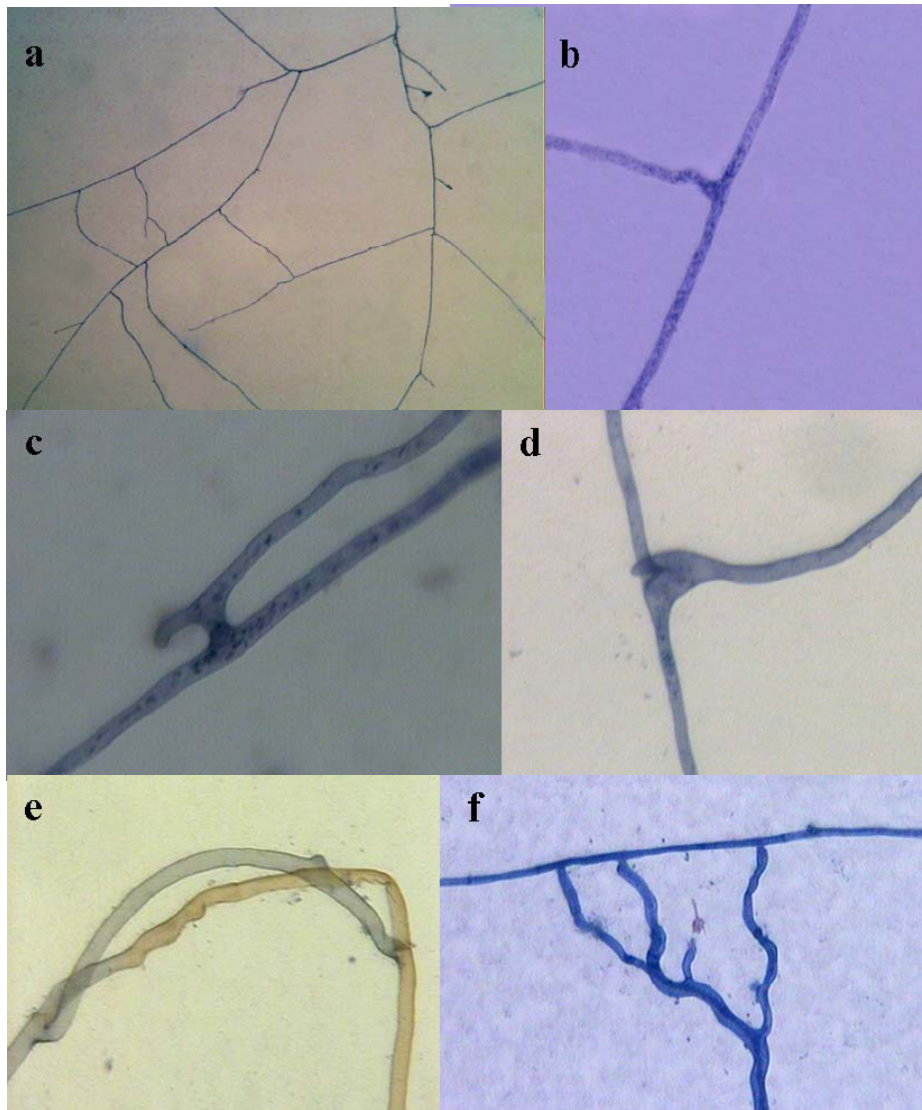


Figure 15 Light micrographs showing anastomosis formation in germlings of tropical isolates of arbuscular mycorrhizal fungi after succinate dehydrogenase activity localization and Trypan blue staining. a) Interconnected mycelium of *Acaulospora scrobiculata* (bar=300 μm); b) hyphal anastomoses showing complete fusion of hyphal wall and protoplasm continuity in *Glomus etunicatum* (bar=50 μm), c) *Glomus manihotis* (bar=17 μm), d) *Glomus formosanum* (bar=17 μm); e) anastomosis bridge formed within the same hypha in *Gigaspora rosea* (bar=17 μm); f) directional branching toward a nearby hypha in *Glomus etunicatum* (bar=50 μm).

3.3 Frequency of contacts and anastomosis formation

High frequencies of anastomosis were detected in most of the isolates and species tested. The percentages of anastomosis occurring between hyphae of the same germling of *G. etunicatum*, *G. formosanum*, *G. clarum* and *G. manihotis* were $75.40 \pm 3.57\%$ (288 fusions, 420 contacts), $79.84 \pm 4.39\%$ (176 fusions, 212 contacts), 47.98 ± 26.19 (5 fusions, 18 contacts) and $9.29 \pm 3.01\%$ (73 fusions, 968 contacts), respectively. Hyphal fusions also occurred between hyphae from the same germling of *A. scrobiculata* and *A. spinosa*, with percentages of $42.01 \pm 6.38\%$ (141 fusions, 439 contacts) and $33.65 \pm 6.88\%$ (110 fusions, 306 contacts), respectively (Table 7). The lowest number of contacts per mm of hypha within the same germling was recorded in *G. formosanum* and the highest in *G. manihotis*, with significant differences among the two species ($df = 8$, $F = 2.597$, $P = 0.017$; Table 7). The number of anastomoses per mm of hypha ranged from 3.02 ± 1.05 in *G. clarum* to 18.84 ± 3.17 in *A. spinosa*, with significant differences among species (Kruskal-Wallis test $P = 0.006$; Table 7).

TABLE 7. Average anastomosis frequencies, total number of hyphal anastomoses and contacts, and anastomoses and contacts per mm of hypha, detected in mycelia originating from individually germinated spores of six different species of tropical isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. In columns, means (\pm S.E. of means) followed by different letters are significantly different for $P = 0.01$.

	Anastomosis frequency (%)	Total anastomosis number	Number of contacts	Anastomoses per mm hypha	Contacts per cm hypha
<i>A. scrobiculata</i> (A38)	42.01 \pm 6.38bcd	141	439	9.74 \pm 2.97	2.63 \pm 0.56 b
<i>A. spinosa</i> (95-UFLA)	32.81 \pm 6.92cd	110	306	15.90 \pm 3.18	6.24 \pm 1.89ab
<i>G. etunicatum</i> (SCT101A)	75.40 \pm 3.57ab	288	420	15.68 \pm 3.04	2.23 \pm 0.51 b
<i>G. formosanum</i> (A20)	79.84 \pm 4.39 a	176	212	9.25 \pm 1.01	1.14 \pm 0.15 b
<i>G. manihotis</i> (A83)	9.29 \pm 3.01 d	73	968	8.02 \pm 3.17	11.28 \pm 3.86a
<i>G. clarum</i> (351UFLA)	47.98 \pm 26.19abc	5	18	3.02 \pm 1.04	1.14 \pm 0.57 b
<i>Gi. albidia</i> (URM-FMA 01)	-	0	315	-	9.16 \pm 2.53 ab
<i>Gi. rosea</i> (A35)	-	0	309	-	1.72 \pm 0.30 b
<i>S. calospora</i> (A80)	-	0	953	-	9.45 \pm 3.97 ab

Anastomosis frequencies occurring between hyphae originating from different spores showed high values, ranging from 63.79 ± 6.09 % and 91.41 ± 3.92 % when spores of *G. etunicatum*, *G. formosanum* and *A. scrobiculata* were paired, whereas frequencies lower than 25% were recorded in *G. manihotis* and *A. spinosa* (Table 8).

TABLE 8. Average anastomosis frequencies and total number of hyphal anastomoses and contacts between mycelia originating from different germplings of the same isolate of five species of tropical arbuscular mycorrhizal fungi.

	Anastomosis frequency (%)	Total anastomosis number	Number of contacts
<i>A. scrobiculata</i> (A38)	72.86 ± 6.72 a	82	119
<i>A. spinosa</i> (95-UFLA)	14.02 ± 7.36 b	14	59
<i>G. etunicatum</i> (SCT101A)	63.79 ± 6.09 a	100	208
<i>G. formosanum</i> (A20)	91.41 ± 3.92 a	84	97
<i>G. manihotis</i> (A83)	24.29 ± 11.02 b	13	105

Two ways ANOVA indicated that fungal species represented a significant factor affecting anastomosis frequency ($df = 4$, $F = 42.619$, $P < 0.001$), whereas the type of hyphal contact (within the same spore/between different spores) was not significant. Notwithstanding, a significant interaction was detected between the two factors ($df = 4$, $F = 6.123$, $P < 0.001$). One way ANOVA for data recorded within the same spore evidenced significant differences among species ($df = 5$, $F = 20.856$, $P < 0.001$), and Tukey's test showed that anastomosis frequency of *G. manihotis* was significantly different ($P = 0.05$) from that of *G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. formosanum*.

One way ANOVA on results obtained from different spores evidenced significant differences among species ($df = 4$, $F = 18.718$, $P < 0.001$), and

Tukey's test showed that anastomosis frequencies of *G. manihotis* and *A. spinosa* were significantly different ($P = 0.05$) from those of *G. etunicatum*, *A. scrobiculata* and *G. formosanum*. Interestingly, in *A. scrobiculata*, fusion rate was significantly higher when contacting hyphae originated from different spores, compared to contacts occurring within the same spore (Kruskal-Wallis test, $P = 0.001$), whereas the contrary was observed for *A. spinosa* (Kruskal-Wallis test, $P = 0.036$).

No fusions were detected between hyphae belonging to the same germling of *S. gregaria*, *S. calospora* and *S. pellucida*. Anastomoses were rarely observed within the same hyphae of *Gi. albida* (5 fusions, 315 contacts) and *Gi. rosea* (3 fusions, 309 contacts), while no fusions between adjacent hyphae, either originating from the same or from different spores, were detected (results not shown).

4 DISCUSSION

This study shows, for the first time, anastomosis formation, nuclear migration and germling viability in tropical isolates of diverse species and genera of AMF, widening our knowledge on the extensive and consistent occurrence of successful hyphal fusions in this group of beneficial fungal symbionts. Here, we report for the first time that species belonging to the genus *Acaulospora* undergo anastomosis formation at frequencies similar to those showed by species of the genus *Glomus*. We also report data on spore germination and hyphal length of 9 different tropical AMF species, and on the inability of some species to undergo regular anastomosis, producing in some instances hyphal healings.

Spore germination was erratic in the different isolates, species and genera, possibly as a result of spore dormancy, that is the failure of a spore to germinate in the presence of physical and chemical conditions supporting germination of apparently identical spores of the same species (Tommerup 1983a). The relief of spore dormancy and the activation of the cell cycle depends on different environmental factors (pH, temperature, moisture, etc.), which vary with species/genus/isolate, thus being very difficult to foresee (Giovannetti 2001). Here, our isolates of *A. spinosa* and *S. calospora* showed a good germination, contrary to previous results obtained in in vitro and in vivo systems (Tommerup 1983a; Declerck et al. 2005), confirming spore germination variability among isolates.

We detected for the first time the early formation of septal plugging following cytoplasm withdrawal from germlings' hyphal tips of *Glomus manihotis* and *Glomus etunicatum*, which showed many peripheral hyphae completely devoid of cytoplasm and nuclei 5 days after germination, an event previously described in ageing hyphae of germlings growing in the absence of

the host (Logi et al. 1998; Siqueira et al. 1985). It is well known that spores of AMF, although capable of germination in adequate edaphic and environmental conditions, are not able of extensive independent hyphal growth, and, in the absence of the host, cease growth within a few weeks: accordingly, many germlings of *A. scrobiculata* showed hyphal septation after 22 days' culture.

Germlings of AMF are able to elongate and originate a coenocytic mycelial network generally extending no more than 200 mm (Giovannetti and Avio 2002). Here, the extent of germlings was variable among individuals, isolates, species and genera, ranging from 22.8 to 81.7 mm, after 10-20 days' growth. Our data compare well with those of *G. caledonium*, which reached 30-50 mm, depending on the individual spore, after 10-15 days' growth (Logi et al. 1998).

The isolate of *Gi. rosea* utilised in our work showed a hyphal growth rate (3 mm/day) similar to that reported for this species by Giovannetti et al. (2000) (2.98 mm/day). The isolate of *G. clarum* tested here showed a growth rate of 6.24 mm/day, in contrast with values reported for a different conspecific isolate, extending only 8 mm after 10 days' incubation (Louis and Lim 1988). The observed variability in germling hyphal lengths and growth rates confirms this character being affected by several variables, such as experimental systems and AM fungal isolates (Hepper and Smith 1976; Hepper 1979; Graham 1982; Siqueira et al. 1982; Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Tommerup 1983b; Giovannetti et al. 2000; Bago et al. 1998; Logi et al. 1998; Becard and Piché 1989).

Anastomosis formation in AMF had been previously described and quantified both in asymbiotic and symbiotic mycelial networks of a limited number of species, mainly belonging to the genera *Glomus* (*G. caledonium*, *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. clarum*, *G. proliferum*, *G. hoi* and *Glomus sp.* MUCL 43194), *Gigaspora* (*Gi. gigantea*, *Gi. margarita* and *Gi. rosea*) and

Scutellospora (*S. heterogama* and *S. reticulata*), and in the species *Ambispora leptoticha* and *Paraglomus occultum* (Giovannetti et al. 1999, 2001, 2003; de la Providencia et al. 2005, 2007; Cardenas-Flores et al. 2010, 2011; Purin and Morton 2011).

Anastomoses were reported to occur regularly and at high frequency in hyphae belonging to the same and to different germings of the same isolate, in *G. caledonium*, *G. mosseae*, *G. intraradices* (Giovannetti et al. 1999; Croll et al. 2009). Here, vegetative compatibility tests showed for the first time that germinated spores of tropical isolates of *G. etunicatum*, *G. formosanum*, *G. manihotis*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa* were capable of forming anastomosis both within the same and between different germings and that anastomosis frequencies ranged between 9.29 and 91.41%. Most values are comparable to those reported previously for germings of *G. mosseae*, *G. caledonium* and *G. intraradices* (51-57%, 35-55% and 59-69%, respectively) and for self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* (more than 50%) and higher than those reported for *Rhizoctonia* endophytes from the roots of *Pinus silvestris* and of the orchid *Goodyera repens* (22-50%) (Hyakumachi and Ui 1987; Sen et al. 1999).

Microscopic examinations of contacts between hyphae belonging to the same and to different germings of isolates of *G. manihotis*, *G. etunicatum*, *G. formosanum* and *A. scrobiculata* allowed us to detect chemotropism before hyphal fusion, previously described in *G. caledonium* during time-course studies of the dynamics of anastomosis formation in living hyphae (Giovannetti and Sbrana 2001), in *Phanerochaete velutina* and *Stereum spp.* (Ainsworth and Rayner 1986; 1989) and in *Neurospora crassa* (Hickey et al. 2002). Chemotropism, together with the development of hyphal branches by approaching tips towards adjacent hyphae prior to any physical contact, suggests that anastomosis formation is highly regulated by specific recognition signals.

However, the cellular and biochemical steps, including cell wall degradation and synthesis, governing the complex process of hyphal fusion remain to be investigated, together with the question as to whether remote chemical signals controlling pre-fusion events, possibly mediated by pheromones, are active in the regulation of the physiological switch making adjacent hyphae fusion-competent (Bistis 1981; Snetselaar et al. 1996).

Hyphal ability to form anastomoses and the establishment of protoplasm flow are important for the maintenance of physiological and genetic continuity within and between germlings and may have important fitness consequences, representing a key survival strategy for AMF, that are obligate biotrophs, as already reported for the pathogen *R. solani*, whose fusion-impaired isolates showed lower survival rates and reduced saprophytic and pathogenic capacity (Hyakumachi and Ui 1987). A novel finding revealed the important role possibly played by anastomosis formation in AMF survival, as spores of *G. mosseae*, germinating in the absence of the host, were able to plug into compatible symbiotic mycelia, thus gaining access to nutrient resources flowing in the mycorrhizal network (Sbrana et al. 2011).

The consistent detection of nuclei in anastomosis bridges in all the isolates and species of *Glomus* and

Acaulospora tested here suggests that nuclear migration is active through the fusing hyphae, supporting the view that in these asexual fungi genetic exchange through intermingling of nuclei during anastomosis formation represents a fundamental mechanism allowing the maintenance of genetic diversity in the absence of sexual recombination (Croll et al. 2009; Bever and Wang 2005).

Acknowledgments

The anastomosis formation experiments were carried out in the laboratory of Soil Microbiology of the Department of Crop Plant Biology, University of Pisa, Italy. The authors thank Leonor Costa Maia (Pernambuco Federal University), Elke J. B. N. Cardoso (ESALq) and Sidney Sturmer (FURB) and their respective institutions for providing some of the AMF lineages utilized in the present study. The authors also thank the Brazilian research foundations: Minas Gerais State Reserach Foundation (FAPEMIG :PROCESSO CAG 20008-09), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), for a fellowship to CBN and for the financial support to the project.

REFERENCES

Ainsworth AM, Rayner ADM (1986) Responses of living hyphae associated with self and non-self fusions in the basidiomycete *Phanerochaete velutina*. J Gen Microbiol 132:191–201

Ainsworth AM, Rayner ADM (1989) Hyphal and mycelial responses associated with genetic exchange within and between species of the basidiomycete genus *Stereum*. J Gen Microbiol 135:1643–1659

Bago B, Zipfel W, Williams RM, Chamberland H, Lafontaine JG, Webb WW, Piche Y (1998) In vivo studies on the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* grown under axenic conditions. Protoplasma 203:1–15

Becard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55:2320–2325

Bever JD, Wang M (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi: hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature* 433:E3–4

Bistis GN (1981) Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating-type in *Neurospora crassa*. *Mycologia* 73:959–975

Cardenas-Flores A, Draye X, Bivort C, Cranenbrouck S, Declerck S (2010) Impact of multispores in vitro subcultivation of *Glomus* sp. MUCL 43194 (DAOM 197198) on vegetative compatibility and genetic diversity detected by AFLP. *Mycorrhiza* 20:415–425

Cardenas-Flores A, Cranenbrouck S, Draye X, Guillet A, Govaerts B, Declerck S (2011) The sterol biosynthesis inhibitor fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza* 21:443–449

Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR (2009) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 181:924–937

de la Providencia IE, de Souza FA, Fernandez F, Séjalon-Delmas N, Declerck S (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi exhibit distinct pattern of anastomoses formation and hyphal healing mechanism between different phylogenetic groups. *New Phytol* 165:261–271

de la Providencia IE, Fernandez F, Declerck S (2007) Hyphal healing mechanism in the arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora reticulata* and *Glomus clarum* differs in response to severe physical stress. *FEMS Microbiol Lett* 268:120–125

Declerck S, Strullu DG, Fortin JA (2005) In vitro culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 3–372

Gerdemann JN, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46:235–244

Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989) In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7:243–255

Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on roots. *New Phytol* 84:489-500

Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS (1999) Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 65:5571–5575

Giovannetti M, Sbrana C, Logi C (2000) Microchambers and video-enhanced light microscopy for monitoring cellular events in living hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226:153–159

Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 151:717–724.

Giovannetti M, Sbrana C (2001) Self and non-self responses in hyphal tips of arbuscular mycorrhizal fungi. In Geitmann A, Cresti M (eds) *Cell biology of plant and fungal tip growth*, NATO science series I: life and behavioural sciences, vol. 328. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp 221–231

Giovannetti M, Avio L (2002) Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In Khachatourians GG, Arora DK (eds) *Applied mycology and biotechnology. Agriculture and Food Production*, vol. 2. Elsevier, Amsterdam, NL, pp 275-310

Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L (2003) Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographical areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:616–624

Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P (2004) Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 164:175–181

Giovannetti M, Avio L, Sbrana C (2010) Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth - Physiological and genetic aspects. In Koltai H, Kapulnik Y (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Springer Netherlands, pp 3-32

Graham JH (1982) Effect of citrus exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeum*. *Mycologia* 74:831–835

Hepper CM (1979) Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol Biochem* 11:269–277

Hepper CM, Smith GA (1976) Observation on the germination of *Endogone* spores. *Trans Br Mycol Soc* 66:189–194

Hickey PC, Jacobson DJ, Read ND, Glass NL (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 37:109–119

Hyakumachi X, Ui X (1987) Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from fields of sugarbeet monoculture. *Trans Br Mycol Soc* 89:155–159

Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report* 48:692

Koske R (1981) Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Trans Br Mycol Soc* 76:328–330

Logi C, Sbrana C, Giovannetti M (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl Environ Microbiol* 64:3473–3479

Louis I, Lim G (1988) Effect of storage of inoculum on spore germination of a tropical isolate of *Glomus clarum*. *Mycologia* 80:157–161

Mehlich A (1953) Determination of P, Ca, Mg, K, Na, and NH₄. North Carolina Soil Test Division

Panwar J, Yadav RS, Yadav BK, Tarafdar JC (2008) Arbuscular mycorrhizae: a dynamic microsymbiont for sustainable agriculture. In Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds) *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, Springer, The Netherlands, Dordrecht, pp 159–176

Purin S, Morton JB (2011) In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21:505–514

Rayner ADM (1996) Interconnectedness and individualism in fungal mycelia. In

Sutton BC (ed) A century of mycology, Cambridge University Press, pp 193-232

Sanders IR (2002) Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *American Nat* 160:S128–S141

Sbrana C, Avio L, Giovannetti M (1995) The occurrence of calcofluor and lectin binding polysaccharides in the outer wall of AM fungal spores. *Mycol Res* 99:1249-1252

Sbrana C, Fortuna P, Giovannetti M (2011) Plugging into the network: belowground connections between germlings and extraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 103:307-316

Schwarzott D, Walker C, Schüssler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) is nonmonophyletic. *Mol Phyl Evolut* 21:190–197.

Sen R, Hietala AM, Zelmer CD (1999) Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratorhiza* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytol* 144:331–341

Siqueira JO, Hubbell DH, Schenck NC (1982) Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. *Mycologia* 74:952–959

Siqueira JO, Sylvia DM, GIBSON J, HUBBELL DH. Spores germination and germ tubes of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* (Print), OTTAWA, v. 31, p. 965-972, 1985.

Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1990) Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust J Plant Physiol* 17:177–188

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edition, Academic Press, London, UK, pp 1-769

Snetselaar KM, Boelker M, Kahmann R (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* 20:299–312

Tommerup IC (1983a) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans Br Mycol Soc* 81:37–45

Tommerup IC (1983b) Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans Br Mycol Soc* 81:381–387

Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69–72

ARTIGO 2 Caracterização molecular de linhagens tropicais de fungos
Micorrizicos arbusculares

(Artigo normalizado de acordo com o periódico PAB)

RESUMO

Independentemente da pesquisa, básica ou aplicada, uma correta identificação de linhagens de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) é um requisito fundamental na micorrizologia. Assim, linhagens depositadas em coleções de cultura responsáveis pela preservação da biodiversidade destes fungos e distribuição de linhagens devem ser identificadas e caracterizadas corretamente. Desta forma, o objetivo central deste trabalho foi caracterizar geneticamente linhagens de FMAs tropicais depositadas na Coleção de FMAs da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). A análise genotípica foi feita com base na discriminação específica contidas nos genes 18S rDNA e regiões intergênicas através da técnica de PCR-RFLP, a qual permitiu a diferenciação entre espécies de 6 gêneros, inclusive pertencentes a mesma espécie. Os agrupamentos das linhagens obtidos foram parcialmente coerentes com a classificação das espécies baseada na morfologia dos esporos. Agruparam-se as linhagens de *G. clarum* e em um segundo grupo as linhagens dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* (Família *Gigasporaceae*), não permitindo separação das espécies destes gêneros em duas enzimas. A análise do RFLP mostrou diferenças entre as linhagens de *E. colombiana*, *A. morrowiae* e *G. etunicatum* que diferiram acentuadamente entre si. Os resultados indicam a aplicabilidade da técnica para discriminação de espécies e até mesmo linhagens de mesma espécie de FMAs quem podem possuir variabilidade genética. Não há relatos sobre disponibilidade de sequências de todas estas linhagens. Para o nosso conhecimento, estas são identificadas e caracterizadas apenas pela morfologia externa de seus esporos. Aqui, descrevemos as características moleculares parciais dos genes 18S e 5.8S rDNA e regiões intergênicas obtidas por meio de PCR-(*TaqI*, *MspI*, *HinfI*)-RFLP. Os resultados deste estudo irá estabelecer um conjunto de sequências de rDNA para as linhagens tropicais de modo que possam ser feitas comparações com outras sequências de linhagens de FMAs disponíveis.

Palavras-chave: Glomeromycota, identificação molecular, iniciadores, taxonomia.

Molecular characterization of arbuscular mycorrhiza fungal

ABSTRACT

Regardless of the research, basic or applied, a correct identification of strains of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a fundamental requirement in studies of mycorrhizae. Thus, strains deposited in culture collections responsibility to maintain the biodiversity of these fungi and distribution lines must be properly identified and characterized. Thus, the main objective of this study was to characterize genetically strains of tropical AMF deposited at the collection of AMF of the Embrapa Agrobiologia (COFMEA). The genotypic analysis was based on discrimination contained in the specific 18S rDNA genes and intergenic regions by PCR-RFLP, which allowed the differentiation between species 6 Genres, including belonging to the same species. The groupings of the strains obtained were partially consistent with the classification of species based on morphology of the spores. Loaded into the strains of *G. clarum* and a second group the strains of the genera *Gigaspora* and *Scutellospora* (Family Gigasporaceae), not allowing separation of the species of these genera in the two enzymes. The RFLP analysis showed differences among strains of *E. Colombian*, *A. morrowiae* and *G. etunicatum* that differed markedly from each other. The results indicate the applicability of the technique for discrimination of species and even strains of the same species of AMF who may have genetic variability. There are no reports on the availability of sequences of all these strains. To our knowledge, these are identified and characterized only by the external morphology of their spores. Here, we describe the molecular characteristics of partial 18S and 5.8S rDNA genes and intergenic regions obtained by PCR-(*TaqI*, *MspI*, *HinfI*)-RFLP. The results of this study will establish a joint rDNA sequences for strains tropical so that comparisons can be made with sequences of other strains are available AMF.

Keywords: Glomeromycota, morphological characterization, molecular identification, iniciadores, taxonomy.

1 INTRODUÇÃO

As micorrizas arbusculares (MA) são simbioses mutualistas entre raízes das plantas e fungos pertencentes ao filo Glomeromycota. A planta fornece a energia e fatores de crescimento necessários para os fungos completarem seu ciclo de vida e estes melhoram sua absorção de nutrientes a partir do solo. Esses fungos são biotróficos obrigatórios e dependem de raízes metabolicamente ativas para completarem seu ciclo de vida, o que impõe limitações ao estudo de aspectos básicos de biologia e genética desses fungos. A identificação e caracterização destes fungos são os primeiros passos para o estudo desta associação (Mergulhão et al., 2008). O caráter biotrófico obrigatório associado à ausência de fase sexuada conhecida, faz com que a identificação e classificação destes fungos sejam baseadas quase que exclusivamente nas características morfológicas e nas estruturas das paredes de seus esporos.

No entanto, apesar das espécies de FMAs apresentarem diferenças morfológicas, essas diferenças não são sempre evidentes, demandando tempo e conhecimento taxonômico do técnico responsável pela identificação, além disso, algumas espécies apresentam dimorfismo e nem sempre os esporos obtidos de uma cultura apresentam todas as características necessárias para sua identificação ao nível de espécies. Além disso, a caracterização fenotípica não possibilita uma fácil distinção das diferentes espécies de FMAs durante a fase simbiótica micelial nos tecidos radiculares. Esta também pode ser influenciada por condições locais e pela diferença de maturidade dos esporos introduzindo problemas para identificação precisa de FMAs.

Neste sentido, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os FMAs a partir de métodos que exijam menos experiência do taxonomista, envolvendo análises moleculares ou bioquímicas (de Souza et al 2004; Mergulhão et al., 2008; Lee & Young, 2009).

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a pesquisa com FMAs, têm permitido identificar os FMAs dentro e fora das raízes, distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie (Avio et al., 2009), e as relações entre espécies e populações, num nível de confiança que usualmente os estudos fenotípicos clássicos não permitem (Stukenbrock & Rosendahl, 2005). Os métodos diagnósticos baseados em PCR abrem a possibilidade de utilizar essas técnicas de maneira rápida, segura e reproduzível para identificação e controle de qualidade de coleções de FMAs. A PCR pode amplificar sequências específicas de DNA de FMAs, como por exemplo os genes ribossomais (rRNA). A variação destas sequências pode ser observada através de eletroforese em gel de agarose após a restrição com endonucleases (RFLP – Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição), a qual tem potencial para diferenciar espécies filogeneticamente próximas (Mergulhão et al., 2008). A técnica de PCR-RFLP tem sido aplicado para identificar linhagens de FMAs introduzidas ou que ocorrem naturalmente em associação com espécies de plantas economicamente importante e também para diferenciar e identificar FMAs em nível de espécie (Redecker et al, 2000; Mergulhão et al., 2008).

Independentemente da pesquisa, básica ou aplicada, uma correta identificação de linhagens de FMAs é um requisito fundamental na micorrizologia. Assim, linhagens depositadas em coleções de cultura responsáveis pela preservação da biodiversidade destes fungos e distribuição de linhagens devem ser identificadas e caracterizadas corretamente. Desta forma, o objetivo central deste trabalho foi caracterizar linhagens de FMAs tropicais depositadas na Coleção de FMAs da Embrapa Agrobiologia (COFMEA) utilizando PCR-RFLP. Os resultados deste estudo irá também estabelecer um conjunto de padrões de RFLP destas linhagens tropicais e que serão validados

por sequenciamento de rDNA e por comparações com outras sequências de linhagens de FMAs disponíveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente todas as linhagens foram multiplicadas simultaneamente em casa de vegetação (Embrapa Agrobiologia - Seropédica, RJ), utilizando-se como planta hospedeira *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (syn. *Brachiaria decumbens*), em vasos contendo 500 mL de substrato autoclavado. O substrato, preparado com solo superficial de mata, solo argiloso (cambissolo vermelho amarelo) e solo arenoso (planossolo) (1:1:1 v/v) foi autoclavado por dois dias consecutivos (60 minutos a 120°C, 1,2 kgf/cm²) e permaneceu por 15 dias em repouso para oxidação de possível manganês solúvel. A análise química revelou as seguintes características após a autoclavagem: pH em água = 4,8; Ca⁺² = 1,3 cmol_c dm⁻³; Mg⁺² = 0,9 cmol_c dm⁻³; Al⁺³ = 0,3 cmol_c dm⁻³; P = 5,2 mg dm⁻³ e K = 32 mg dm⁻³ (Mehlich 1) e MO = 0,78 dag kg⁻¹.

Após seis meses de multiplicação, os esporos foram extraídos de 50 mL de solo por peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugações em água e solução de sacarose (Jenkins, 1964). Após a extração, os esporos foram selecionados sob microscópio estereoscópico e fixados em uma lâmina para microscopia com PVLG (polivinil lacto glicerol) e PVLG + reagente de Melzer (1:1). A confirmação da identidade de cada linhagem foi realizada utilizando as descrições de caracteres morfológicos disponíveis nos sites INVAM (<http://www.invam.caf.wvu.edu/index.html>) e Blaszkowski (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>) e na descrição original e atuais de cada espécie.

Para a caracterização genética os esporos foram cuidadosamente selecionados sob microscópio estereoscópico quanto à integridade, sanidade e pureza da linhagem. Foram submetidos a quatro sessões de ultra-som de 15 s, intercaladas por lavagens em água destilada estéril para eliminar partículas de solo e possíveis microrganismos superficialmente aderidos. Os esporos limpos,

aparentemente perfeitos e sadios foram armazenados à -20°C dentro de frascos eppendorf autoclavados.

A extração do DNA foi realizada como descrito por de Souza et al. (2004) utilizando de 150 a 200 esporos. Para a análise de PCR-RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição), o DNA foi amplificado com o par de iniciadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) que permitem amplificar o DNA ribossomal (rDNA) do início do gene 18S até o início do gene 25S, que abrangem as duas regiões intergênicas e o gene 5.8S. As reações foram realizadas de acordo com Novais et al. (2010). Em seguida foi efetuada duas estratégias de ampliações Nested-PCR (ver Figura 16), as quais utilizaram como DNA molde 2 µL de uma diluição (1:1000) dos produtos de PCR da primeira reação realizada com os iniciadores NS1 e ITS4 que permitem amplificar o DNA ribossomal (rDNA) do início do gene 18S até o início do gene 25S, que abrangem as duas regiões intergênicas e o gene 5.8S. Na primeira estratégia Nested-PCR utilizou-se os NS31 (5'- TTGGAGGGCAAGTC TGGTGCC-3) (Simon et al., 1992) e F1Ra (5'-CTTTTACTTCTCTAAATGA CC-3') (de Souza et al., 2004) para amplificar a região V3-V4 e V9 do 18S rDNA anteriormente utilizadas na identificação molecular de espécies do gênero *Gigaspora* (de Souza et al., 2004) e na segunda os iniciadores NS7 (5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGAT GC-3') (White et al., 1990) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATC3') (White et al., 1990) que inclui as regiões internas (ITS1, 5.8S, ITS2) que apresenta elevada variabilidade na composição de bases e no tamanho do fragmento (Renker et al, 2006; Gamper & Leuchtmann, 2007). As condições das reações de amplificação foram 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 2,5 mM de MgCl₂, 0,28 µM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase – Promega, Madison, EUA). A reação foi realizada em

termociclador marca Eppendorff® seguindo os programas: 2 min. a 93°C para desnaturação inicial; 30 ciclos 94°C por 60 s; 55°C por 60 s; 72°C por 160 s; 72°C por 5 min. para final de extensão para os iniciadores NS31-F1Ra e 3 min. a 94°C para desnaturação inicial; 2 ciclos 94°C por 60 s; 60°C por 60 s; 72°C por 45 s; 32 ciclos 94°C por 60 s; 58°C por 60 s; 72°C por 45 s; 72°C por 10 min. para extensão final para o par de iniciador NS7-ITS4.

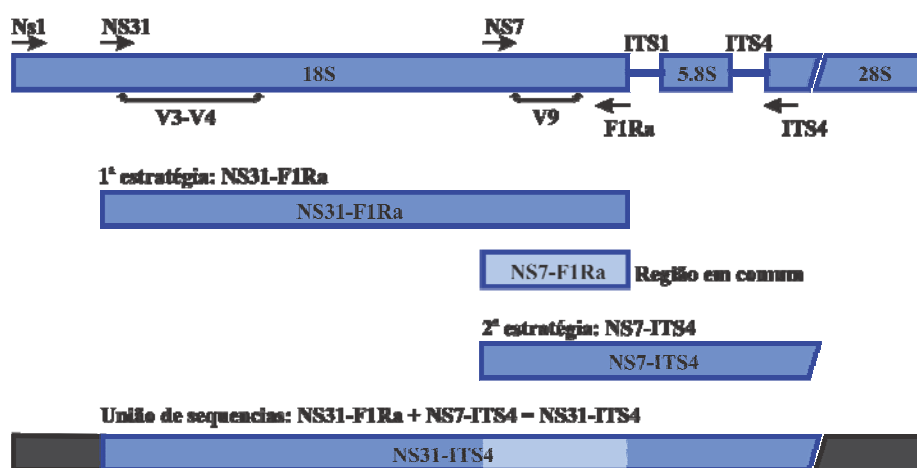


Figura 16 Representação esquemática do gene ribossomal (rDNA), focalizando no gene que codifica para o 18S. As posições aproximadas dos iniciadores estão indicadas (setas), bem como as estratégias utilizadas que contém regiões variáveis (V3-V4, V9 e ITS) (Modificada de Souza et al., 2004).

O produto de PCR amplificado de cada amostra foi aplicado no gel de agarose 0,8% e após eletroforese e visualização em luz ultravioleta a banda desejada foi sacada do gel e purificada com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Os produtos foram então clonados no vetor “pGEM-T Easy” (Promega) e utilizados para transformação de *Escherichia coli* (JM109 Competent Cells, $>10^8$ cfu/ μ g, Promega) conforme recomendações do fabricante. As bactérias contendo insertos foram confirmadas através de reação de PCR (Figura 17), com os iniciadores pGENR e pGENF, e foram cultivadas

em meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, estas também foram armazenadas a -80°C em meio LB + ampicilina, contendo 15% de glicerol na concentração final. Alíquotas dos produtos de PCR de colônia foram utilizados em reações de restrição para seleção dos clones, sendo os restantes purificados e vão ser utilizados em reações de seqüenciamento.

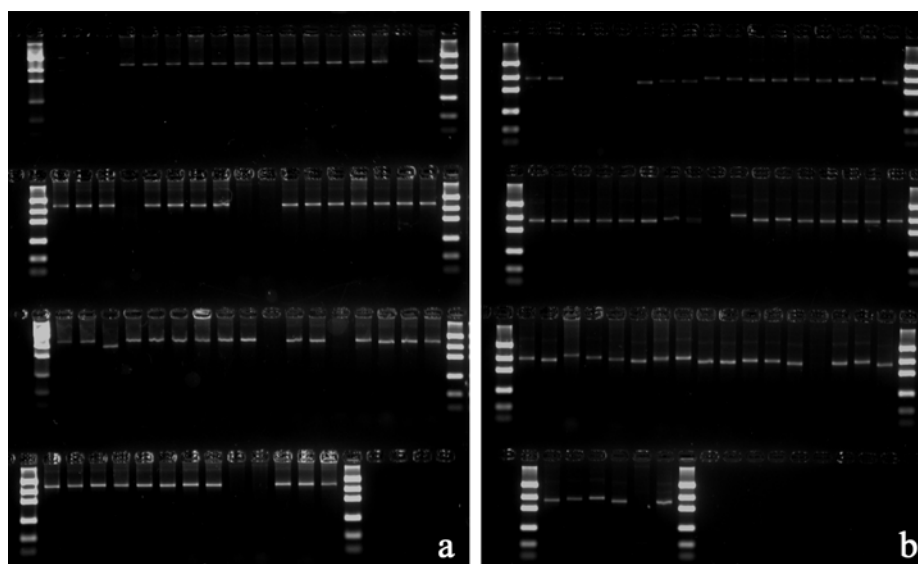


Figura 17 Gel de agarose evidenciando os produtos amplificados por PCR colônia correspondentes a região NS31-F1Ra (a) e NS7-ITS4 (b). Marcador Low DNA Mass Ladder.

As seqüências obtidas serão processadas e submetidas a um banco de dados on-line para determinação da taxonomia de fragmento individual. Os dados de seqüências serão usados então para análise filogenética e para caracterização das linhagens sendo comparadas com seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências dos dois fragmentos poderão ainda, serem unidas formando um único fragmento de tamanho relativamente grande (NS31-ITS4), com aproximadamente 2000 pares de bases,

a união das sequências destes fragmentos é possível pois, existe uma região em comum de 344pb (NS7-F1Ra) entre os dois fragmentos amplificados (Figura 16).

Os fragmentos de DNA amplificados foram clivados com as endonucleases *HinfI*, *TaqI* e *MspI* utilizando 8 μ L do produto da segunda PCR; 1,5 μ L do tampão (10X) da enzima, 4 U da enzima em volume final de 15 μ L. A clivagem foi realizada durante 240 min a 37°C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (3% p/v) por 150 min a 85 V. Os perfis de bandas obtidos foram submetidos à análise de similaridade, no programa Gelcompar II (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), adotando o coeficiente de similaridade de Dice e o método de agrupamento UPGMA. Como a detecção no RFLP necessita de uma quantidade de DNA que seja suficiente para formar bandas visíveis nos géis de restrição, por segurança foi optado excluir das análises amostras cuja visualização do perfil de bandas era difícil. Assim, algumas amostras não estão presentes em todos os dendrogramas gerados de acordo com o fragmento e enzimas de restrição.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A organização subcelular dos esporos apresenta-se de forma similar às descrições originais e às informações compiladas nos sites do INVAM e do Blaskowski (Figura 18).

Das 58 linhagens listadas na Tabela 2, conseguiu-se amplificar e clonar o DNA ribossômico de 53 linhagens amplificadas com o par de iniciadores NS31- F1Ra (Figura 17a) e 51 linhagens com o fragmento NS7-ITS4 (Figura 17b), considerando-se alto o sucesso de obtenção de DNA clonado (90% das amostras). Falhas no isolamento e amplificação do DNA são causadas por variadas razões, sendo a principal a contaminação por produtos de DNA espúrios (Sambrook e Russel, 2001). Além disso, apesar da eficiência nos métodos de extração de DNA, em algumas espécies o DNA obtido não apresenta quantidade e pureza suficiente para serem amplificadas na PCR e muitas vezes, quando obtido, a clonagem nem sempre é satisfatória.

Os produtos amplificados apresentaram tamanhos variados entre as linhagens nos dois fragmentos quando visualizados em gel de agarose, sendo de aproximadamente 1300pb para NS31-F1Ra e de 1100pb para NS7-ITS4. Isto era esperado, pois as regiões amplificadas possuem regiões de variabilidade como V3-V4 e V9 em NS31-F1Ra e ITS em NS7-ITS4. No entanto, os resultados confirmam que o polimorfismo é maior na região que compreende as regiões intergênicas ITS1 e ITS2 (Figura 19, 20, e 21).

A técnica utilizada (PCR-RFLP baseada nas regiões de variabilidade do gene ribossomal 18S e regiões ITS) mostrou-se eficiente para discriminar tanto espécies filogeneticamente próximas quanto linhagens de mesma espécie, conforme preconizado por outros autores (Redecker et al., 1997; 2003; de Souza et al., 2004; Mergulhão et al., 2008; Avio et al., 2009).

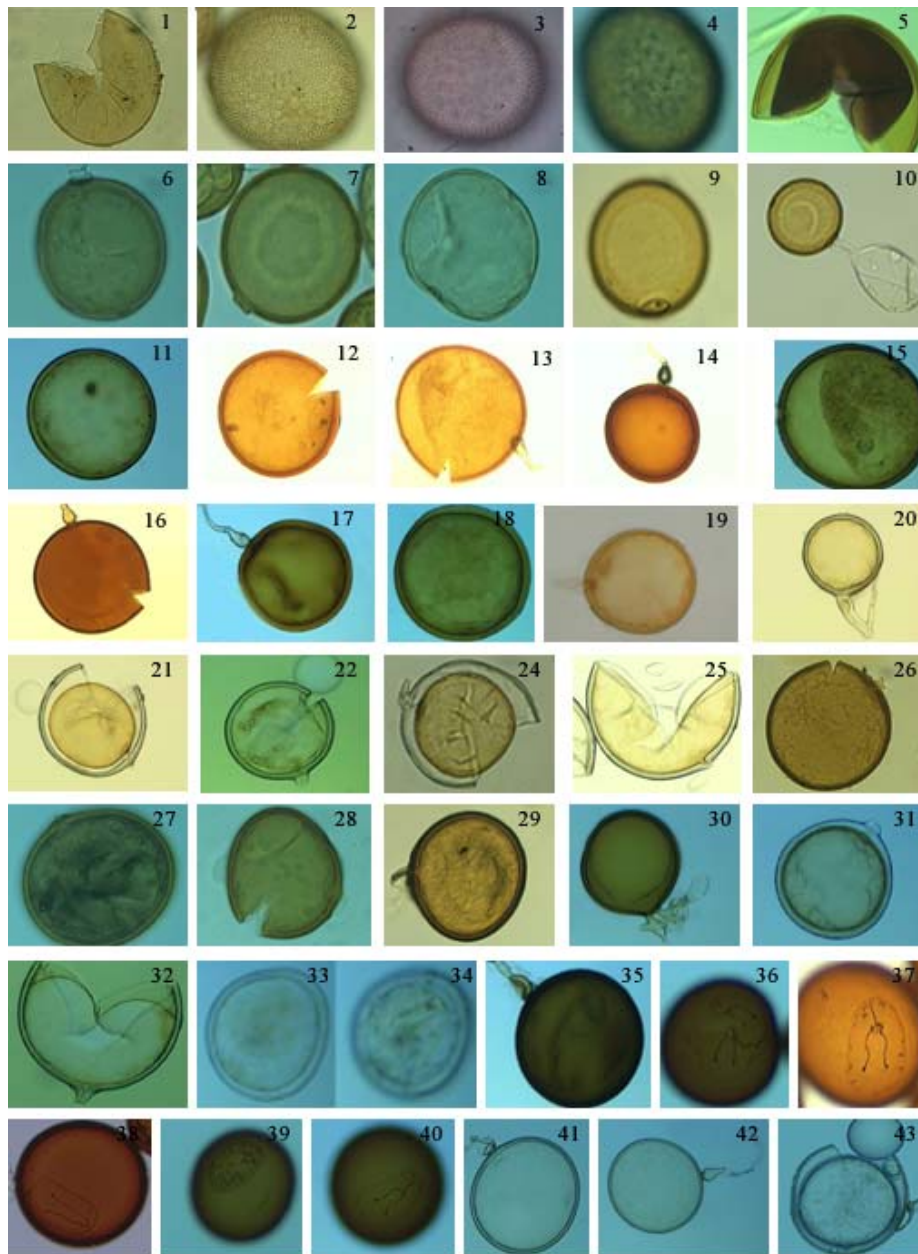


Figura 18 Esporos de 1) *A. morrowiae* (PRN108B), 2) *A. scrobiculata* (A38, IES-33), 3) *A. scrobiculata* (ALCOA 29), 4) *A. spinosa* (95-UFLA), 5) *Acaulospora* sp. (A88, CNPAB 044), 6) *E. colombiana* (A87, CNPAB 043), 7)

E. colombiana (A15, CNPAB 015), 8) *E. colombiana* (ALCOA-CCB2), 9) *E. colombiana* (06-UFLA), 10) *E. colombiana* (AMZ570A), 11) *G. albida* (URM-FMA 01), 12) *G. albida* (03-UFLA MG), 13) *G. candida* (A36, IES-29), 14) *G. margarita* (A49, Inóculo 138), 15) *G. margarita* (A1, CNPAB 001), 16) *G. margarita* (A41, IES-42), 17) *G. margarita* (279-UFLA), 18) *G. margarita* (R1 UFLA), 19) *G. rosea* (A35, IES-19), 20) *G. clarum* (A5, CNPAB 005), 21) *G. clarum* (URM - FMA 08), 22) *G. clarum* (CMM-306), 23) *G. clarum* (ESALq), 24) *G. clarum* (351-UFLA), 25) *G. etunicatum* (365-UFLA), 26) *G. etunicatum* (URM-FMA 03), 27) *G. etunicatum* (ESALq), 28) *G. etunicatum* (ESALq), 29) *G. etunicatum* (SCT101A), 30) *G. formosanum* (A20, CNPAB 020), 31) *G. manihotis* (A83, CNPAB 041), 32) *Glomus sp.* (A90, CNPAB 046), 33) *S. callospora* (A80, CNPAB 038), 34) *S. gregaria* (200-UFLA), 35) *S. heterogama* (A34, IES-16), 36) *S. heterogama* (A2, CNPAB 002), 37) *S. heterogama* (312-UFLA), 38) *S. heterogama* (UFPE), 39) *S. heterogama* (ESALq), 40) *S. pellucida* (464-UFLA), 41) *S. pellucida* (A70, CNPAB 029), 42) *S. pellucida* (128-UFLA).

Os agrupamentos das linhagens formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição com os produtos de PCR obtidos com os iniciadores NS7-ITS4 (Figura 19, 20 e 21), principalmente com a através da digestão com a enzima *MspI* (Figura 21) foram parcialmente coerentes com a classificação das espécies baseada na morfologia dos esporos (Figura 18).

A digestão dos fragmentos de PCR com as enzimas de restrição *HinfI*, *MspI* e *TaqI* revelou semelhança entre as linhagens de *G. clarum*, *Glomus sp.* e *G. manihotis*, agrupando-as com mais de 80% de similaridade (Figura 19, 20 e 21). *Glomus sp.* tem esporos grande e claros que combinam com a descrição morfológica de *G. clarum* (Figura 18) e, *G. manihotis* não pode ser distinguido de *G. clarum* usando esta técnica de RFLP (Redecker et al., 1997), sugerindo serem linhagens muito próximas molecularmente e morfológicamente. Distante deste grupo, com baixa similaridade ficou a linhagem de *G. formosanum* e as de *G. etunicatum*.

Um outro agrupamento muito claro foi obtido com as linhagens dos gêneros *Gigaspora*. As linhagens destes gêneros quando não mostraram padrões idênticos (100%) de restrição agruparam-se com mais de 80% de similaridade. Entretanto a técnica do RFLP para estes gêneros não permitiu uma clara separação das espécies descritas com base na morfologia dos esporos.

Dentro do grupo *Gigaspora-Scutellospora* a única linhagem presente cuja taxonomia morfológica não a coloca nos gêneros *Scutellospora* e *Gigaspora* em todos os agrupamentos foi *A. scrobiculata* (ALCOA 29) e em alguns casos *E. colombiana* e *A. morrowiae* (Figura 19, 20 e 21).

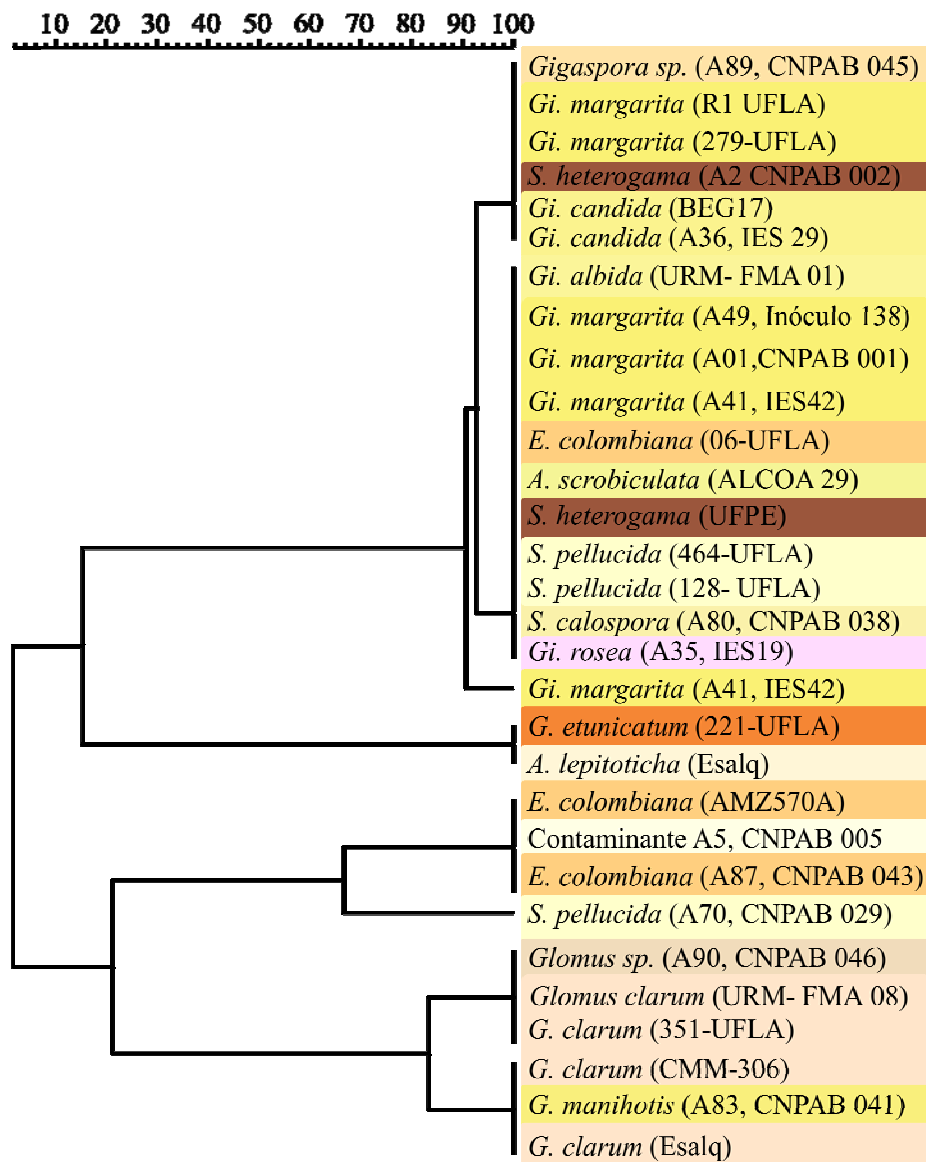


Figura 19 Dendrograma de similaridade genética de diferentes linhagens de fungos micorrízicos arbusculares mostrando os agrupamentos formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição NS31-F1Ra-(*Taq*I)-RFLP. Indicação das cores dos esporos de acordo com o quadro de cores criado pelo INVAN.

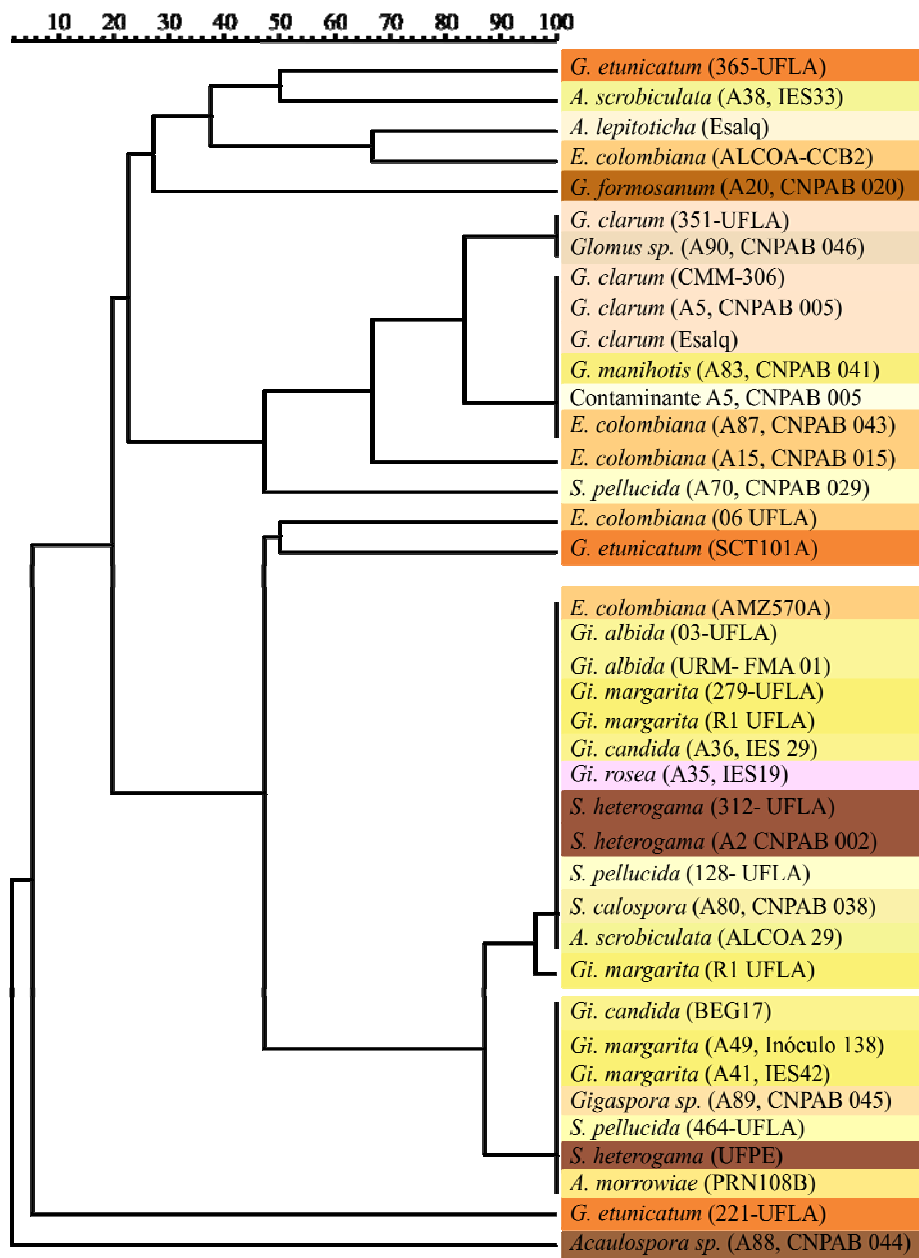


Figura 20 Dendrogramas de similaridade genética de diferentes linhagens de fungos micorrízicos arbusculares mostrando os agrupamentos formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição NS31-F1Ra-(*Hin*I)-RFLP. Indicação das cores dos esporos de acordo com o quadro de cores criado pelo INVAN.

Diferentes linhagens de mesma espécie mostraram padrões diferentes de *Hinf*I, *Msp*I e *Taq*I-RFLP tanto na restrição do fragmento obtido com os iniciadores NS31-F1Ra quanto com o par NS7-ITS4 (Figura 22, 23 e 24). *A. scrobiculata* (ALCOA 29) diferiu em todas as análises do isolado *A. scrobiculata* (A38, IES-33), assim como as diferentes linhagens de *G. etunicatum* que diferiram entre si e dos demais isolados de *Glomus*.

Os fragmentos obtidos com os iniciadores NS31-F1Ra abrange a região V3-V4 e V9 do 18S rDNA e os fragmentos obtidos com os iniciadores NS7-ITS4 inclui além da região V9, as regiões internas (ITS1, 5.8S, ITS2) que apresenta elevada variabilidade na composição de bases e no tamanho do fragmento (Grifoni et al., 1995; Renker et al., 2003, 2006; Gamper & Leuchtman, 2007). Apesar das análises de restrição terem sido feitas em dois fragmentos diferentes, que tem apenas o fragmento NS7-F1Ra em comum, de maneira geral tiveram agrupamento bastante similar, mantendo muitos grupos formados como no caso das linhagens de *G. clarum*, *Glomus sp.* e *G. manihotis* e nas da Família *Gigasporaceae*. Esta região em comum (NS7-F1Ra) foi anteriormente utilizadas na identificação molecular de espécies do gênero *Gigaspora* (de Souza et al., 2004) e de 14 linhagens pertencentes a 6 gêneros e 11 espécies de FMAs (Novais et al., 2010) através da técnica de PCR-DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação). Novais et al., (2010) relata que a discriminação de amplicons obtidos desta região (V9 do 18S rDNA) permitiu a discriminação de todas as espécies estudadas pela técnica do PCR-DGGE, sendo consistente com a identificação taxonômica. No entanto, não se pode determinar que a variabilidade nos padrões de bandas entre as linhagens obtidas com o PCR-RFLP foi somente em função da variabilidade da região V9, uma vez que os dendrogramas não foram totalmente idênticos. O polimorfismo da região ITS detectado por PCR-RFLP tem sido geralmente considerado

adequado para diferenciar FMAs em nível de espécie (Renker et al., 2006; Hempel et al, 2007).

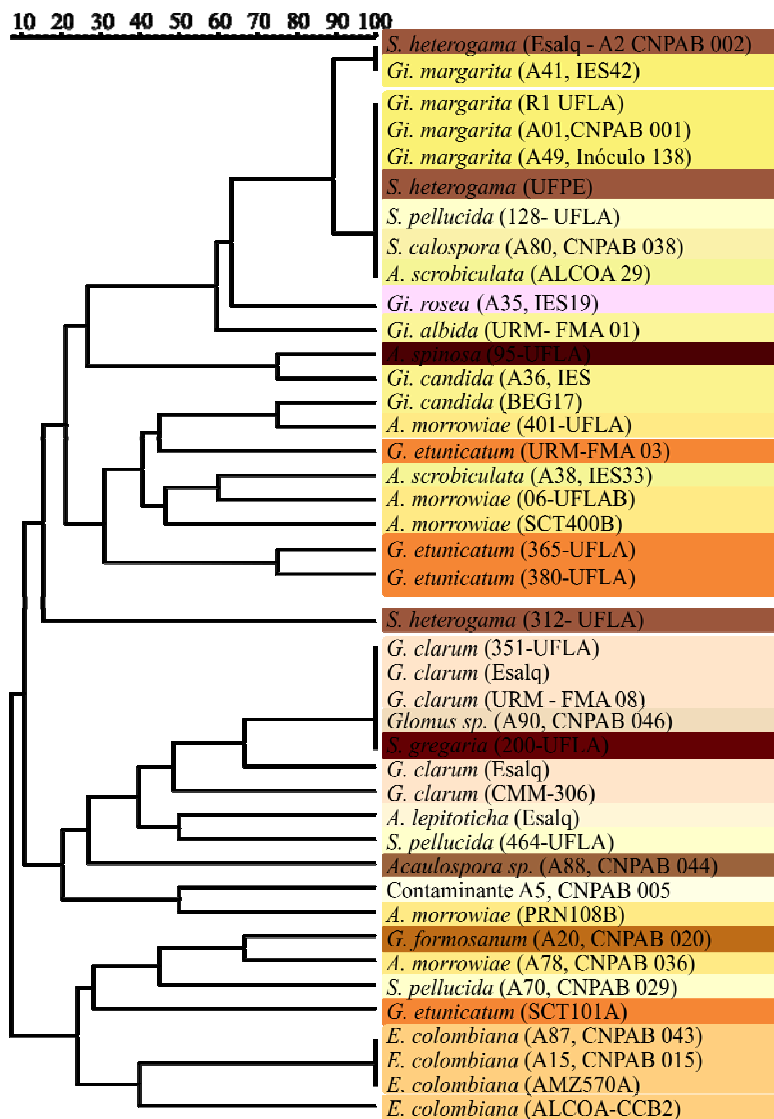


Figura 22 Dendrogramas de similaridade genética de diferentes linhagens de fungos micorrízicos arbusculares mostrando os agrupamentos formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição NS7-ITS4-(*TaqI*)-RFLP. Indicação das cores dos esporos de acordo com o quadro de cores criado pelo INVAN.

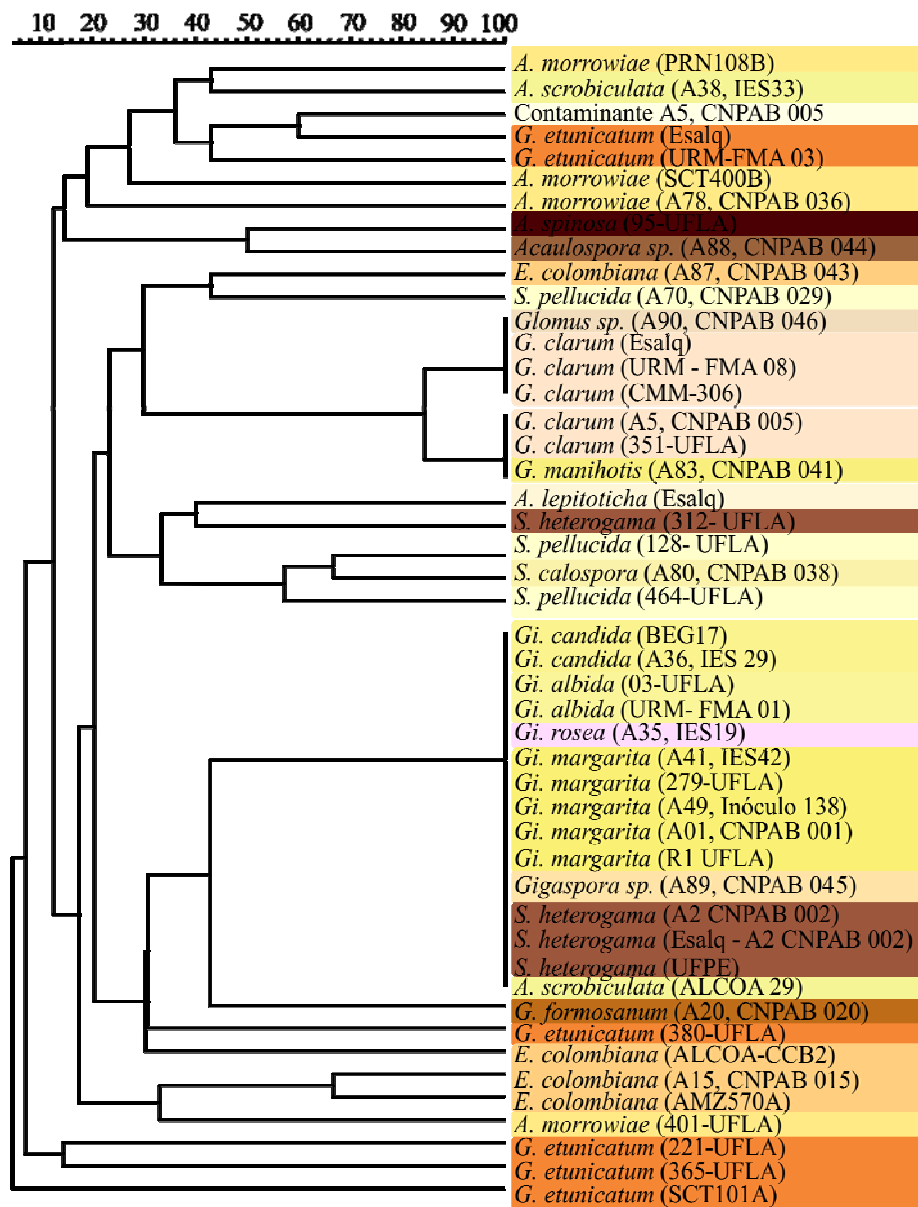


Figura 23 Dendrogramas de similaridade genética de diferentes linhagens de fungos micorrízicos arbusculares mostrando os agrupamentos formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição NS7-ITS4-(*Hin*I)-RFLP. Indicação das cores dos esporos de acordo com o quadro de cores criado pelo INVAN.

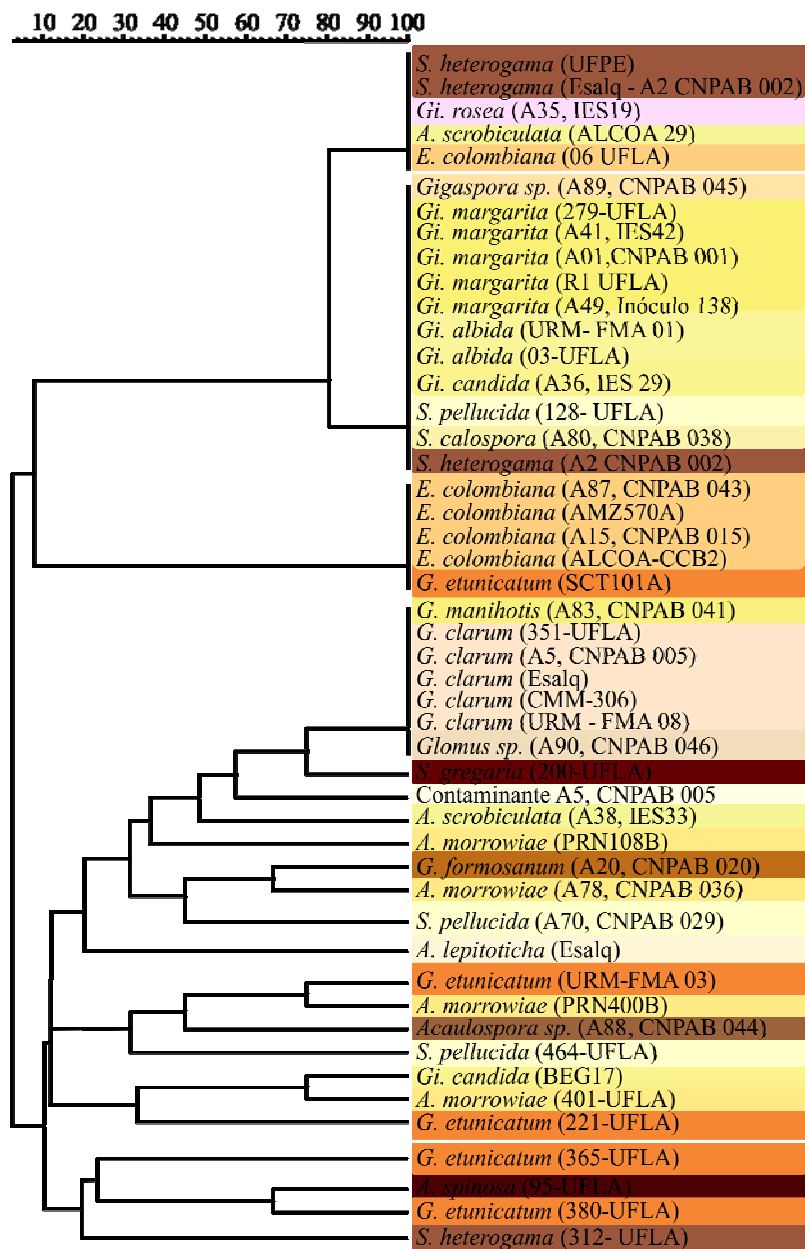


Figura 24 Dendrogramas de similaridade genética de diferentes linhagens de fungos micorrízicos arbusculares mostrando os agrupamentos formados pela análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição NS7-ITS4-(*Msp*I)-RFLP. Indicação das cores dos esporos de acordo com o quadro de cores criado pelo INVAN.

A técnica de PCR -RFLP tem sido aplicado para identificar linhagens de FMAs introduzidas ou que ocorrem naturalmente em associação com espécies de plantas economicamente importante e também para diferenciar e identificar FMAs em nível de espécie (Mergulhão et al., 2008; Renker et al, 2006; Hempel et al, 2007).

O potencial da técnica de PCR-RFLP para separação das espécies de *Glomus* foi relatada por Mergulhão et al., (2008) que através da restrição da região ITS encontrou diferenças claras no padrão de bandas de quatro espécies: 3 de *Glomus* (*G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. intraradices*) e uma de *Paraglomus* (*P. occultum*). É interessante notar que todas as diferentes linhagens de *G. clarum* se agruparam juntas, inclusive com linhagens morfológicamente similar, enquanto as diferentes linhagens de *G. etunicatum* ficaram dispersas (Figura 19, 20, 21, 22, 23 e 24).

Diversidade nos padrões de bandas também foi obtida entre linhagens de *A. morrowiae*, *S. heterogama* e de *E. colombiana*. A digestão do fragmento NS31-F1Ra com a *MspI* (Figura 21) e do NS7-ITS4 com as enzimas *TaqI* e *MspI* (Figura 22 e 24) não gerou bandas discriminativas que poderia permitir a diferenciação entre linhagens de *E. colombiana*. Por outro lado, os padrões de bandas obtidos com NS31-F1Ra-(*TaqI* e *HinI*) (Figura 19 e 20) e NS7-ITS4-(*HinI*)-RFLP (Figura 23) promoveram a dispersão destas linhagens.

Estas divergências entre linhagens de mesma espécie pode ser um indicativo de existência de diferenças genéticas entre essas linhagens, demonstrando que as regiões amplificadas apresentam polimorfismo entre as espécies analisadas e que de acordo com o perfil das bandas obtido é possível diferenciar as espécies e algumas linhagens de FMAs testadas. No entanto, essa variabilidade não pode ser detectada em todas as enzimas. *MspI* -RFLP (Figura 21 e 24) revelou menor polimorfismo entre os isolados de mesma espécie com muitas dessas linhagens agrupando com 100% de similaridade, o que supõe

baixa resolução desta enzima, uma vez que o RFLP separa somente sequências que apresentem polimorfismo nos sítios de restrição reconhecidos pela enzima de restrição utilizada. Esta divergência de agrupamento entre linhagens de mesma espécie após digestão com diferentes enzimas de restrição do mesmo fragmento nos permite descartar que estes resultados podem ser um reflexo da heterogeneidade entre núcleos de espécies diferentes em consequência da extração de DNA de múltiplos esporos. Uma vez que as amostras digeridas foram provenientes da mesma reação de PCR em cada fragmento. Mas não nos permite descartar que esta variabilidade pode também ter sido em função da amplificação de diferentes cópias do 18S. Nosso objetivo é criar uma biblioteca de padrões, os quais oferecem um modo conveniente para minimizar tempo e os gastos com o sequenciamento de DNA. Em coleções de preservação de FMAs a caracterização de cópias predominantes do 18S, o que pode ser obtida com a amplificação de DNA obtido de múltiplos esporos, pode ter maior praticidade no estabelecimento de padrões de RFLP, uma vez que a sequência de ITS, por exemplo, é raramente recuperada duas vezes a partir de um único esporo (Lanfranco et al., 1999, Antonioli et al., 2000). Uma vez que padrões de RFLP de diferentes espécies e linhagens de FMAs forem seqüenciados e estabelecidos, novos padrões poderão ser usados para comparação com os padrões existentes e quando equivalentes a estes não é necessário um novo sequenciamento.

Migração nuclear através de pontes de fusão sugeriu que troca genética poderia ocorrer por meio de anastomose entre hifas derivadas de indivíduos geneticamente diferentes gerando indivíduos geneticamente variáveis. Assim, Croll et al. (2009), relataram a ocorrência de anastomose e troca de material genético entre isolados geneticamente distintos de *Glomus intraradices*. Clapp et al., (2001) sugere que esporos de FMAs podem conter genes ribossomais de morfoespécies diferentes. Neste sentido, a diversidade genética entre linhagens de FMAs de mesma espécie não é uma novidade. Avio et al., (2009) relatou que

a técnica de PCR-RFLP foi capaz de detectar diversidade genética entre isolados geográficos de *G. mosseae*, esses autores observaram grande variabilidade entre sequências de algumas linhagens como também maior homogeneidade interna entre sequências de outras linhagens, indicando que diferentes linhagens de mesma espécie podem possuir diversidade genética.

No entanto, para que se possa concluir se existem diferenças genéticas entre estas linhagens de mesma espécie ou se a variabilidade genética revelada pelo RFLP foi em função da qualidade das amostras nos géis obtidos que comprometeu a clareza da análise é fundamental a obtenção das sequências. Além disso, essas linhagens de mesma espécie que apresentaram variabilidade genética foram também as que apresentaram dissimilaridade acentuada, formando cada linhagem grupos isolados com menos de 70% de similaridade com as demais linhagens o que requer mais estudos para compreensão desses fenômenos. A linhagem mais dissimilar foi as de *A. morrowiae* que somente na *MspI*-(NS31-FIRa)-RFLP teve uma linhagem *A. morrowiae* (PRN108B) que agrupou entre *Acaulospora sp.* (A88, CNPAB044) e *A. scrobiculata* (A38, IES-33) com 100% de similaridade. Outros estudos também relataram variação genética entre linhagens de mesma espécie de FMAs (Koch et al., 2004; de Souza et al., 2004; Croll et al., 2008; Mathimaran et al., 2008a; Croll et al., 2009), sendo que a maioria das variações genéticas inter e intra-específica foram descritas usando sequências que cobrem os genes ribossomais 18S e 5.8S e as regiões intergênicas ITS1 e ITS2.

Nossos resultados mostram que a variabilidade nos padrões de bandas obtidos é maior para o gênero *Glomus* do que na família *Gigasporaceae*, na qual ambos os gêneros estudados (*Gigaspora* e *Scutellospora*) não foram distinguidos. As linhagens destes gêneros quando não mostraram padrões idênticos (100%) de restrição agruparam-se com mais de 80% de similaridade. Entretanto a técnica do RFLP para estes gêneros não permitiu uma clara

separação das espécies descritas com base na morfologia dos esporos, sendo que a maior distinção entre as espécies do gênero *Gigaspora* foi obtida com a digestão *TaqI*-(NS7-ITS4)-RFLP (Figura 22), que separou linhagens de *Gi. margarita*, *Gi. albida*, *Gi. rosea* e *Gi. candida*. Nossos dados estão de acordo com Redecker et al., (2003), que relatou que os padrões de RFLP pode ser usado para distinguir muitas morfoespécies de FMAs, exceto para *Gigasporaceae*. Além disso, os fungos classificados morfologicamente dentro do gênero *Glomus* não pertencem a um grupo monofilético e atualmente estão sendo molecularmente divididos em diversos gêneros (Oehl et al., 2011). A evolução destes estudos tem causado constantes mudanças na nomenclatura dos gêneros de Glomeromycota, de modo que no presente estudo optou-se por utilizar a classificação com base morfológica adaptada às primeiras famílias segregadas com base molecular (Morton e Benny, 1990; Morton e Redecker, 2001) em vez de adaptar a nomenclatura a moderna denominação de gêneros (Oehl et al., 2011; Schüßler & Walker, 2010), a qual ainda não está completamente sedimentada. Entretanto, é fato comprovado que a morfologia dos esporos pode não refletir sua condição genética (Oehl et al., 2011). Segundo estes autores, entre os novos gêneros que o filo Glomeromycota está sendo dividido, cerca de 10 formam esporos exclusivamente glomóides, um gigasporóide, sete scutellosporóides, quatro entrophosporóides, dois acaulosporóides, um pacisporóide e três gêneros apresentam bimorfismo dos esporos, incluindo o gênero não micorrízico que se associa a alga *Nostoc*.

Este trabalho ainda está em andamento sendo os resultados apresentados apenas uma premissa da caracterização genética dessas linhagens. Apesar de muitos autores utilizarem o RFLP, e relatarem que esta técnica é suficiente para minimizar o esforço de seqüenciamento (Helgason et al 1998; Sýkorová et al 2007; Appoloni et al 2008), quando utiliza-se iniciadores gerais para fungos e eucariotos é necessário a inclusão de suas seqüências, principalmente para

melhor compreensão de agrupamentos ambíguos. Neste sentido, é evidente a necessidade da inclusão das sequências para validação dos padrões de RFLP obtidos. O sequenciamento destes fragmentos permitirá a análise filogenética ampla, pois sequências das regiões estudadas estão disponível para a maioria dos taxos de FMAs (Rosendahl, 2008).

4 CONCLUSÕES

As linhagens de FMA avaliados apresentaram características morfológicas similares às encontradas para espécies descritas, o que confirma a correta identificação segundo a taxonomia convencional.

A discriminação de amplicons obtidos da região NS31-F1Ra e NS7-ITS4 do rDNA permite a discriminação entre linhagens de *Glomus* e *Gigasporaceae* estudadas pela técnica do PCR-RFLP, sendo parcialmente coerentes com a classificação das espécies baseada na morfologia dos esporos.

Nossos resultados ilustram a possibilidade de variabilidade genética entre linhagens de *G. etunicatum*, *E. colombiana*, *A. morrowiae* e *S. heterogama* que poderá ser confirmada pelo sequenciamento dos fragmentos.

REFERÊNCIAS

ANTONIOLLI, Z. I.; SCHACHTMAN, D. P.; OPHEL-KELLER, K.; SMITH, S. E. Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycol. Res.** v.104, n.6, p.708-715, 2000.

APPOLONI, S; LEKBERG, Y; TERCEK, MT; ZABINSKI, CA; REDECKER, D. Molecular Community Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Roots of Geothermal Soils in Yellowstone National Park (USA). **Microbial Ecology.** 56(4):649-659, 2008.

AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M; Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Can. J. Microbiol.** v.55, p.242–253, 2009.

CLAPP, J.P.; RODRIGUEZ, A.; DODD, J.C. Intraspecific LSU variation in spores of isolates of species of *Glomus coronatum* compared with morphologically-similar species of *Glomus*. *New Phytologist*, v.149, n.3, 2001.

CROLL, D.; GIOVANNETTI, M.; KOCH A.M.; SBRANA, C.; EHINGER, M.; LAMMERS, P.J.; SANDERS, I.R.. Nonsel self vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytol** 181:924–937, 2009.

de SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; van VEEN, J.A; 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*. **Appl. Env. Microbiology**, v.70, n. 3, p.1413-1424, 2004.

GAMPER, H.; LEUCHTMANN, A. Taxon-specific PCR primers to detect two inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungi from temperate agricultural grassland, **Mycorrhiza**, 17, 145-152, 2007.

GERDEMANN, J. N.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of British Mycorrhizal Society, Cambridge*, v. 46, p. 235-244, 1963.

HELGASON, T.; DANIEL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, T. P. W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, London, v. 384, p. 431-431, 1998.

HEMPEL, S; RENKER, C; BUSCOT, F. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. v.9, n.8, p.1930-1938, 2007.

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

KOCH, A.M.; KUHN, G.; FONTANILLAS, P.; FUMAGALLI, L.; GOUDET, I; SANDERS, I.R. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, n. 8, p.2369–2374, 2004.

LANFRANCO, L.; DELPERO, M.; BONFANTE, P. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol. Ecol.* v.8, p.37-46, 1999.

LEE, J.; YOUNG, J.P.W. The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist*, v.183, p.200–211, 2009.

MERGULHAO, A.C.D.S.; DA SILVA, M.V.; 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). *Ann. Microbiol.*, 58(2):341-344, 2008.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, with an emendations of Glomaceae. *Mycotaxon*, v.37, p.471-491, Apr./Jun. 1990.

MORTON, J.B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, v.93, n.1, pp.181-195, 2001

NOVAIS, C. B.; de SOUZA, F. A.; SIQUEIRA, J. O.. Phenotypic and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal spores from cultures maintained in germplasm collection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.8, p.806-896, ago. 2010.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G.A. da. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, v.2, n.2, p.191–199, 2011.

REDECKER, D., HIJRI, I., WIEMKEN, A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. **Folia Geobot.** v.38, p113-124, 2003.

REDECKER, D.; MORTON, J. B.; BRUNS, T. D. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*, **Mycologia**, v.92, p.282- 285, 2000.

REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1756-1761, 1997.

RENKER, C.; WEISSHUHN, K.; KELLNER, H.; BUSCOT, F. Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza*, v.16, p.525-531, 2006.

ROSENDAHL, S. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, v.178, p.253–266, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2.344p. (Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction).

SCHUÜBLER, A.; WALKER, C. *The Glomeromycota: a species list with new families and genera*. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University. URL:<http://www.amf-phylogeny.com>. ISBN-13:978-1466388048; ISBN-10:1466388048. 2010.

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

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, 2005.

SÝKOROVÁ, Z.; WIEMKEN, A.; REDECKER, D. Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.5426–5434, 2007.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification And direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A. et al., Eds.), **Academic Press**, pp.315-322. San Diego, CA., 1990.

**ARTIGO 3 Genetic and functional inter and intraspecific variability of
tropical isolates of *Arbuscular mycorrhizal fungi***

(Artigo normalizado de acordo com o periódico PAB)

ABSTRACT

For a single plant species under the same environmental conditions, the interaction and contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) varies among isolates, with both inter and intraspecific variability. The present study evaluated the functional variability for colonization, growth promotion and P uptake of corn of 45 isolates of 20 species and six genera and observed the relationship of this functional variability with the isolates' genetic variability revealed by PCR-RFLP analysis. All the isolates abundantly colonized the corn roots, but only 23 promoted higher shoot dry mass and P leaf content. The cluster analysis based on functional variability data separated the isolates *A. morrowiae* (Am2), *Acaulospora* sp. (Aca), *E. colombiana* (Ec3, Ec4 and Ec5), *Gi. albida* (Gia1), *Gi. margarita* (Gim4 and Gim5), *Gi. rosea* (Gir), *G. clarum* (Gc2, Gc3, Gc4 e Gc5), *G. etunicatum* (Ge4), *G. manihotis* (Gm), *Glomus* sp (Gsp), *S. calospora* (Sc), *S. heterogama* (Sh2, Sh3, Sh4 and Sh5) and *S. pellucida* (Sp3) from the others the 80% similarity. These were considered efficient in promoting functional symbiosis in corn and the other isolates were considered inefficient. The cluster analysis obtained by the RFLP technique was partly coherent with the species classification based on spore morphology. The isolates of *G. clarum* fell in one cluster and the isolates of the *Gigaspora* and *Scutellospora* genera (Gigasporaceae family) were clustered in a second cluster, without the ability to separate the species of these genera. The RFLP analysis revealed accentuated differences of the *E. colombiana*, *A. morrowiae* and *Glomus etunicatum* isolates. The results did not show relationship between functional variability and genetic variability.

Keywords: RFLP, geographical isolates, *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, corn.

Análise da variabilidade genética e funcional de linhagens inter e intraespecíficas de isolados tropicais Fungos Micorrízicos Arbusculares

RESUMO

Para uma mesma planta e condições ambientais a interação e contribuição dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) varia entre linhagens, havendo variabilidade inter e intraespecífica. O presente estudo avaliou em 45 linhagens de 20 espécies e seis gêneros a variabilidade funcional para colonização, promoção do crescimento e absorção de P do milho, bem como, observa sua relação com a variabilidade genética utilizando análise de PCR-RFLP. Todas as linhagens colonizaram abundantemente o milho, mas apenas 23 das 45 linhagens estudadas promoveram maior massa da parte aérea seca e 23 maior teor de P nas folhas do milho. Há grande coincidência entre este comportamento. Análise de agrupamento separou as linhagens de *A. morrowiae* (Am2), *Acaulospora* sp. (Aca), *E. colombiana* (Ec3, Ec4, e Ec5), *Gi. albida* (Gia1), *Gi. margarita* (Gim4 e Gim5), *Gi. rosea* (Gir), *G. clarum* (Gc2, Gc3, Gc4 e Gc5), *G. etunicatum* (Ge4), *G. manihotis* (Gm), *Glomus* sp (Gsp), *S. calospora* (Sc), *S. heterogama* (Sh2, Sh3, Sh4 e Sh5) e *S. pellucida* (Sp3) como sendo eficientes em promover simbiose funcional em milho. As demais linhagens foram consideradas ineficientes. Em ambos os casos as linhagens se agruparam com 80% de similaridade. O agrupamento das linhagens obtido pela técnica do RFLP foi parcialmente coerente com a classificação das espécies baseada na morfologia dos esporos. Agruparam-se as linhagens de *G. clarum* e em um segundo grupo as linhagens dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* (Família Gigasporaceae), não permitindo separação das espécies destes gêneros. A análise do RFLP mostrou diferenças entre as linhagens de *E. colombiana*, *A. morrowiae* e *Glomus etunicatum* que diferiram acentuadamente entre si. Os resultados não mostraram se há relação entre a variabilidade funcional inter e intraespecífica de FMAs com a variabilidade genética revelada pela técnica do RFLP.

Palavras-chave: RFLP, isolados geográficos, *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, milho.

1 INTRODUCTION

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form symbiotic relationships with the majority of land plant species and are distributed throughout the tropics. This association is characterized by the penetration of the fungal mycelium between and within the cells of the radicular cortex, without causing visible morphological change to the naked eye, but that modifies the plant's physiology, enhancing its capacity to absorb nutrients from the soil, especially those with low soil mobility such as phosphorous. For the same plant species, the effects and contribution of AMF vary according to the fungal isolates, reflected in differences in the symbiotic efficiency of the fungus (van der Heijden and Kuyper, 2001). This variation is well documented, but the mechanisms that regulate these interactions and effects are poorly understood. This leaves doubt about the role of AMF in crop yields and recuperation of degraded ecosystems (Siqueira et al., 2010), hampering the definition of strategies for the application of these fungi.

At present 230 AMF species are known (Schüßler and Walker 2010), a number considered low compared to the number of plant species with which these fungi can associate. This situation induces the view that AMF form a homogenous group of symbionts in which all the species perform identical biological functions in the ecosystem (Husband et al., 2002). However, studies of the genetic variation of the 18S rDNA gene subunit have revealed that AMF form a diverse group of fungi in contradiction with the low known species richness, both in terms of number of species and their symbiotic functions (de Souza et al., 2008). The genetic variability of AMF revealed by molecular studies has been associated with their functional variability, measured by the interactions and effects of these fungi on the host plant.

The use of molecular techniques based on PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) has allowed verification that the AMF community in the rhizosphere varies among plant species (Babu and Reddy, 2011; Martínez-García and Pugnaire, 2011) and among soils with different concentrations of nutrients (Martínez-García et al., 2011). It has been found that the community variability is greater in the rhizosphere than in the roots (Martínez-García et al., 2011; Miras-Avalos et al., 2011), suggesting some degree of preference or specificity. According to Wagg et al. (2011), due to the seemingly limitless possibilities for complementarity or selection effect, it is difficult, if not impossible, to determine all the functional and resource-based niches that each AMF species within a more AMF-rich community can occupy to influence, and thus direct, the richness-plant productivity relationship.

Great functional variability of AMF has been detected, both regarding species and isolates of the same species defined based on spore morphology (Munkvold et al., 2004; Avio et al., 2006; Smith et al., 2004). However, these studies evaluated a small number of isolates of a single genus (*Glomus*). The present study is the first to assess a large number of isolates, encompassing various species and genera from tropical ecosystems, regarding their genetic and functional variability in relation to a single plant species.

In general, the symbiotic efficiency of an AMF isolates is attributed to two main factors: the ability to abundantly colonize the roots and the ability to promote beneficial responses for the host plant's nutrition and growth. The differences in symbiotic performance observed among different AMF isolates is considered as measure of the functional variability of microsymbionts (Pouyu-Rojas et al., 2006). Corn shows high growth rate, high uptake of nutrients and high level of mycotrophy making it an ideal host for studies to assess the functional variability of AMF. Therefore, the aim of this work was to evaluate

the genetic and functional variability, both among species of different genera and different isolates of the same species of AMF, regarding root colonization, growth effects and phosphorous uptake of corn, *Zea mays* L. (Poaceae), and to verify whether there is relationship between the genetic and functional variability.

2 MATERIAL AND METHODS

It was used 45 AMF isolates belonging to 20 species and 6 genera (Table 9). Initially, to reduce the environmental interferences associated with the origin of the isolates and to make the potential for infection uniform, all the isolates were multiplied simultaneously in greenhouse (Embrapa Agrobiology Research Center, Seropédica, RJ, Brazil), utilizing *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (syn. *Brachiaria decumbens*) as the host species, grown in pots containing 500 mL of autoclaved substrate. This substrate was composed of three fractions in equal amounts (1:1:1 v/v): forest surface soil; a clayey soil (red-yellow Cambisol); and a sandy soil (Planosol). This substrate was autoclaved for 60 min on two consecutive days at 120 °C, 1.2 kgf cm⁻², and remained at rest for 15 days to allow oxidation of possible soluble manganese. The chemical analysis revealed the following characteristics after autoclaving: pH in water = 4.8; Ca⁺² = 1.3 cmol_c dm⁻³; Mg⁺² = 0.9 cmol_c dm⁻³; Al⁺³ = 0.3 cmol_c dm⁻³; P = 5.2 mg dm⁻³, K = 32 mg dm⁻³ (Mehlich 1) and MO = 0.78 dag kg⁻¹.

After six months of multiplication, the spores were extracted from 200 mL of soil by wet sieving (Gerdemann and Nicolson, 1963) and centrifuged in a water/sucrose solution (Jenkins, 1964). After extraction, the spores were selected under a stereoscopic microscope and mounted on slides with PVLG (polyvinyl-lacto-glycerol) and Melzer's reagent (1:1). Confirmation of the identity of each isolate was performed using the descriptions of the morphological characteristics available in the INVAM (2012) and the original description of each species.

Table 9 List of the AMF isolates studied in this work.

Species ⁽¹⁾	Code of origin ⁽²⁾	Code ⁽³⁾	Plant of origin	Location of origin	Biome of origin	Institution of origin ⁽⁴⁾
<i>Acaulospora morrowiae</i>	401-UFLA	Am1	Native grasses	Três Marias, MG	Cerrado	UFLA
<i>Acaulospora morrowiae</i>	PRN108B	Am2	<i>Cortaderia</i> sp	Campina Grande do Sul, PR	Atlantic Forest	FURB
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	A38 (IES-33)	As1	— ⁽⁷⁾	IES ⁽⁵⁾ (Cuba)	—	CNPAB
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	ALCOA29	As2	—	Poços de Caldas, MG	Atlantic Forest	UFLA
<i>Acaulospora spinosa</i>	95-UFLA	Asp	—	—	Cerrado	UFLA
<i>Acaulospora</i> sp.	A88 (CNPAB 044)	Aca	<i>Gleichenia</i> sp	Itumirim, MG	Cerrado	CNPAB
<i>Archaeospora leptoticha</i>	—	Arle	<i>Araucaria angustifolia</i>	—	Pinhais Forest	ESALq
<i>Entrophospora colombiana</i>	A87 (CNPAB 043)	Ec1	<i>Gleichenia</i> sp	Itumirim, MG	Cerrado	CNPAB
<i>Entrophospora colombiana</i>	A15 (CNPAB 015)	Ec2	<i>Zea mays</i>	Barra do Pirai, RJ	Atlantic Forest	CNPAB
<i>Entrophospora colombiana</i>	ALCOA-CCB2	Ec3	—	Minas Gerais	Cerrado	UFLA
<i>Entrophospora colombiana</i>	06-UFLA	Ec4	—	—	—	UFLA
<i>Entrophospora colombiana</i>	AMZ570A	Ec5	—	Benjamin Constant, AM	Amazon Forest	FURB
<i>Gigaspora albida</i>	URM- FMA 01	Gia1	—	—	—	UFPE
<i>Gigaspora albida</i>	03-UFLA MG	Gia2	Native grasses	Três Marias, MG	Cerrado	UFLA
<i>Gigaspora candida</i>	A36 (IES-29)	Gic1	—	IES ⁽⁵⁾ (Cuba)	—	CNPAB
<i>Gigaspora candida</i>	BEG17	Gic2	—	Taiwan	Tropical Agricultural	BEG
<i>Gigaspora margarita</i>	A49 (Inóculo 138)	Gim1	<i>Coffea arabica</i>	Patrocínio, MG	Cerrado	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	A1 (CNPAB 001)	Gim2	—	Universidade da Flórida	—	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	A41 (IES-42)	Gim3	—	IES ⁽⁵⁾ (Cuba)	—	CNPAB
<i>Gigaspora margarita</i>	279-UFLA	Gim4	—	—	—	UFLA
<i>Gigaspora margarita</i>	R1 UFLA	Gim5	<i>Zea mays</i>	—	—	UFLA
<i>Gigaspora rosea</i>	A35 (IES-19)	Gir	—	IES ⁽⁵⁾ (Cuba)	—	CNPAB
<i>Gigaspora</i> sp	A81 (CNPAB 039)	Gisp	<i>Maranta arundinacea</i>	Seropédica, RJ	Atlantic Forest	CNPAB

“Tabela 9, Conclusion”

Species ⁽¹⁾	Code of origin ⁽²⁾	Code ⁽³⁾	Plant of origin	Location of origin	Biome of origin	Institution of origin ⁽⁴⁾
<i>Glomus clarum</i>	A5 (CNPAB 005)	Gc1	—	INVAM ⁽⁶⁾	—	CNPAB
<i>Glomus clarum</i>	URM - FMA 08	Gc2	—	—	—	UFPE
<i>Glomus clarum</i>	CMM-306	Gc3	Native grasses	Três Pontas, MG	Cerrado	UFLA
<i>Glomus clarum</i>	—	Gc4	—	Florianópolis, SC	—	ESALQ
<i>Glomus clarum</i>	351-UFLA	Gc5	—	Universidade da Flórida	—	UFLA
<i>Glomus etunicatum</i>	365-UFLA	Ge1	<i>Coffea arabica</i>	Patrocínio, MG	Cerrado	UFLA
<i>Glomus etunicatum</i>	URM-FMA 03	Ge2	—	—	—	UFPE
<i>Glomus etunicatum</i>	—	Ge3	—	Santa Catarina	—	ESALQ
<i>Glomus etunicatum</i>	SCT101A	Ge4	<i>Malus domestica</i>	Santa Catarina	Pinhais Forest	FURB
<i>Glomus formosanum</i>	A20 (CNPAB 020)	Gf	<i>Imperata brasiliensis</i>	Barra do Pirai, RJ	Atlantic Forest	CNPAB
<i>Glomus manihotis</i>	A83 (CNPAB 041)	Gm	<i>Manihot esculenta</i>	Seropédica, RJ	Atlantic Forest	CNPAB
<i>Glomus sp.</i>	A90 (CNPAB 046)	Gsp	<i>Canavalia rosea</i>	Recife, PE	Planície costeira	CNPAB
<i>Scutellospora calospora</i>	A80 (CNPAB 038)	Sc	Native plant	Oriximiná, PA	Amazon Forest	CNPAB
<i>Scutellospora gregaria</i>	200-UFLA	Sg	<i>Gossypium hirsutum</i>	Flórida, EUA	—	UFLA
<i>Scutellospora heterogama</i>	A34 (IES-16)	Sh1	—	IES ⁽⁵⁾ (Cuba)	—	CNPAB
<i>Scutellospora heterogama</i>	A2 (CNPAB 002)	Sh2	<i>Coffea arabica</i>	Campinas, SP	Atlantic Forest	CNPAB
<i>Scutellospora heterogama</i>	312-UFLA	Sh3	—	Flórida, EUA	—	UFLA
<i>Scutellospora heterogama</i>	URM- FMA 05	Sh4	—	—	—	UFPE
<i>Scutellospora heterogama</i>	—	Sh5	—	—	—	ESALQ
<i>Scutellospora pellucida</i>	464-UFLA	Sp1	—	Lavras, MG	Cerrado	UFLA
<i>Scutellospora pellucida</i>	A70 (CNPAB 029)	Sp2	<i>Ipomoea batatas</i>	Seropédica, RJ	Atlantic Forest	CNPAB
<i>Scutellospora pellucida</i>	128-UFLA	Sp3	—	Lavras, MG	Cerrado	UFLA

⁽¹⁾: According to the classification based on spore morphology (Morton and Benny, 1990); ⁽²⁾: Code of the isolates used in the institution of origin⁽³⁾; ⁽³⁾: Code of the isolates used in this work; ⁽⁴⁾: Institutions that donated the isolates, FURB = Blumenau Regional University; CNPAB = Embrapa – National Center for Agrobiological Research; UFLA = Lavras Federal University; ESALQ = Luiz de Queiroz Superior School of Agriculture; UFPE = Pernambuco Federal University; ⁽⁵⁾: Instituto de Ecología y Sistemática de Cuba; ⁽⁶⁾: International Culture Collections of (Vesicular) Arbuscular Fungi; ⁽⁷⁾: Information not available on the institution of origin.

It was selected 41 isolates that presented multiplication of sufficient spores to assess the functional variability. The test plant was corn (*Zea mays L.*; *Poaceae*, simple hybrid “BRS 1010”), grown in the same substrate. The seeds were pre-germinated in a sterile substrate containing sand and vermiculite (1:1 v/v) and when the radicles reached 10 mm, three seeds were transplanted to pots containing 500 g of substrate. After 15 days the plants were culled, leaving one plant per pot.

The plant roots were inoculated with a suspension containing 200 spores at the time of transplanting. The pots of the treatment without inoculation (control) received 5 mL of a filtrate containing no AMF propagules, prepared with a mixture of the inocula of the 41 isolates tested. The experimental design was randomized blocks with 42 treatments (41 isolates and the control without inoculation) and five repetitions.

During the experiment, the plants were fertilized using nutrient solution without P, composed of 6.39 mg dm⁻³ of N, 5.88 mg dm⁻³ of K, 6.01 mg dm⁻³ of Ca, 1.46 mg dm⁻³ of Mg, 4.33 mg dm⁻³ of S, 0.02 mg dm⁻³ of B, 0.006 mg dm⁻³ of Cu, 0.002 mg dm⁻³ of Zn, 0.17 mg dm⁻³ of Fe, 0.0002 mg dm⁻³ of Mo, 0.07 mg dm⁻³ of Na and 5.34 mg dm⁻³ of Cl, divided in 20 applications, one per week in the first 45 days and then two per week until the end of the experiment.

After 100 days of growth, the following parameters were evaluated: a) P concentration, measured in 0.8 cm diameter disk taken from the youngest fully developed leaf (Aziz & Habte, 1987); b) plant height; c) stem diameter; d) shoot dry mass; e) root colonization (Giovannetti & Mosse, 1980), determined after clarification and staining the root system (Koske & Gemma, 1989; Grace & Stribley, 1991) and f) number of spores in 25 mL of substrate. The data were submitted to analysis of variance and Scott-Knott test (5%), carried out in the SISVAR statistical program, after transforming the mycorrhizal colonization values and number of spores by $\arcsin(x/100)^{1/2}$ and $(x + 1)^{1/2}$, respectively. The

variables shoot dry mass (SDM) and leaf P content together were submitted to cluster analysis according to the Bray-Curtis similarity coefficient and the UPGMA method.

The genetic characterization was carried out by using spores from the multiplication with *U. decumbens*. The spores were carefully selected under stereoscopic microscope regarding integrity, health and purity. The selected spores were submitted to four ultrasound sessions of 15 s, interspersed with washing in distilled sterile water to eliminate soil particles and possible microorganisms adhering to their surface. The cleaned spores, apparently perfect and healthy, were then stored at -20 °C.

The DNA extraction was performed as described by Souza et al. (2004), utilizing 150 to 200 spores. For the PCR-RFLP analysis the DNA was amplified with the pair of primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), according to Novais et al. (2010). Then, with the primers NS31 (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3) (Simon et al., 1992) and F1Ra (5'-CTTTACTTCTCTAAATGACC-3') (de Souza et al., 2004), employing 2 µL of a dilution (1:1000) from the first PCR as template DNA, 200 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 mM of MgCl₂, 0.28 µM of each primer and 2.5 U of Taq DNA polymerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase – Promega, Madison, USA). The reaction was carried out in an Eppendorff® thermocycler with the following steps: 2 min. at 93 °C for initial denaturing; 30 cycles at 94 °C for 60 s; 55 °C for 60 s; 72 °C for 160 s; and 72 °C for 5 min.

The DNA fragments were cleaved with the endonucleases *Hinf*I, *Taq*I and *Msp*I, using 8 µL of the product from the second PCR, 1.5 µL of the buffer (10X) and 4 U of the enzyme, in a final volume of 15 µL. The cleavage was performed for 240 min at 37 °C. The fragments were then separate in agarose gel (3% w/v) for 150 min at 85 V. The band profiles obtained were submitted to

similarity analysis with the Gelcompar II program (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), adopting the Dice similarity coefficient and the UPGMA cluster method.

3 RESULTS and DISCUSSION

3.1 Genetic variability of the AMF

Of the 45 lineages (Table 1) was possible to amplify the ribosomal DNA of 36, considered to be a high success rate (80% of the samples). Failures to isolate and amplify DNA are caused by various reasons, the main one being contamination by spurious DNA products (Sambrook and Russel, 2001). It was impossible to amplify the DNA of the isolates *A. scrobiculata* (As1), *A. spinosa* (Asp), *G. clarum* (Gc2), *G. etunicatum* (Ge1, Ge2 and Ge3), *S. gregaria* (Sg) and *S. heterogama* (Sh4 and Sh5).

The PCR-RFLP based on the ribosomal gene 18S was efficient to discriminate both phylogenetically close species and isolates of the same species, as observed by other authors (Redecker et al., 1997; de Souza et al., 2004; Mergulhão et al., 2008; Avio et al., 2009). The cluster obtained (Figure 25) was partially coherent with the species classification based on spore morphology. The isolates of *G. clarum* (Gc1, Gc3, Gc4 and Gc5), *Glomus* sp (Gsp) e *G. manihotis* (Gm) clustered with over 90% similarity. Gsp has large clear spores that match the morphological description of *G. clarum* and *G. manihotis*, and could not be distinguish *G. clarum* using this RFLP technique (Redecker et al., 1997), suggesting they are very closely related from molecular and morphological standpoint. The isolate *G. formosanum* (Gf) was distant from this group, with only 44% similarity.

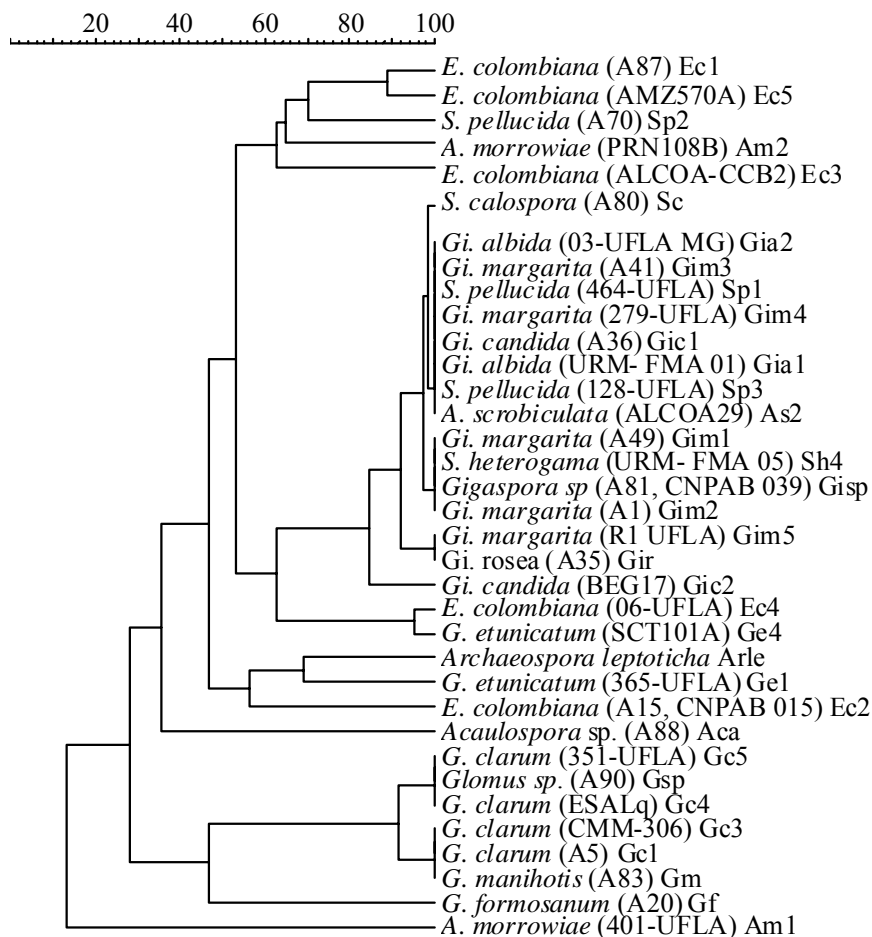


Figure 25 Genetic similarity of different arbuscular mycorrhizal fungi isolates showing the clusters formed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 18S rDNA gene.

Another very distinct cluster was obtained with the isolates of the *Gigaspora* and *Scutellospora* genera. These genera's isolates were grouped with over 84% similarity. However, the RFLP technique for these genera did not permit a clear separation of the species described based on their spore morphology, as also found by Redecker et al. (1997). The *Gigaspora*-*Scutellospora* group contained five sub-groups, each of with isolates having

100% similarity: subgroups [Sh2 and Sc]; [Gia1, Gia2, Gic1, Gim3, Gim4, Gim6, Sp1, Sp3 and As2]; [Gim1, Gim2, Gisp and Sh4]; [Gim5 and Gir] and [Gic2]. The only isolate present in these subgroups whose morphological taxonomy does not place it in the *Scutellospora* or *Gigaspora* genus was *Acaulospora scrobiculata* (As2). On the other hand, the only *Scutellospora* isolate that was absent from these subgroups was *S. pellucida* (Sp2), which formed a separate cluster, close to *E. colombiana* isolates (Ec1 and Ec5).

The *E. colombiana* isolates differed sharply from each other, with the closest being Ec1 and Ec5, which presented 90% similarity. Ec4 presented 96% similarity with *G. etunicatum* (Ge4). The other isolates analyzed (Am1, Am2, Aca, Arle, Ec2, Ec3 and Ge1) were dissimilar, with each isolate forming an isolated group with under 70% similarity with the other isolates. The most dissimilar isolate was *A. morrowiae* (Am1), which only showed 15% similarity with the other isolates studied.

The results show that the sequence variability studied is greater for the *Glomus* genus than for the Gigasporaceae family, in which both the genera studied (*Gigaspora* and *Scutellospora*) were indistinguishable. This was expected, since the fungi classified morphologically within the *Glomus* genus do not belong to a monophyletic group and are being currently divided into various genera (Oehl et al., 2011). The evolution of these studies has been causing constant changes in the nomenclature of the genera belonging to the Glomeromycota, so that here we decided to use the classification based on morphology adapted to the first groups segregated on a molecular basis (Morton and Benny, 1990; Morton and Redecker, 2001) instead of adapting the nomenclature to the modern genus denominations (Oehl et al., 2011; Schüßler and Walker, 2010), which is still not completely settled. Nevertheless, it has been well established that the morphology of spores may not reflect their genetic condition (Oehl et al., 2011). According to these authors, among the new genera

into which the Glomeromycota phylum is being divided, around ten form exclusively glomoid spores, one a gigasporoid spore, seven form scutellosporoid spores, four entrophosporoid spores, two acaulosporoids spores, one a pacisporoid spore and three genera present spore dimorphism, including the non-mycorrhizal genus that associates with the alga *Nostoc*.

3.2 Functional variability of the AMF

There were significant effects ($p < 0.05$) from the inoculation with different AMF isolates on the growth, nutrition and corn mycorrhization (Table 10). There were differences between isolates of distinct species as well as isolates of the same species. The isolates *A. morrowiae* (Am2), *Acaulospora* sp. (Aca), *E. colombiana* (Ec3, Ec4 and Ec5), *Gi. albida* (Gia1), *Gi. margarita* (Gim4 and Gim5), *Gi. rosea* (Gir), *G. clarum* (Gc2, Gc3, Gc4 and Gc5), *G. etunicatum* (Ge4), *G. manihotis* (Gm), *Glomus* sp (Gsp), *S. calospora* (Sc), *S. heterogama* (Sh2, Sh3, Sh4 e Sh5) and *S. pellucida* (Sp3) all promoted greater height and leaf P content (Table 10). In general, these isolates also promoted greater shoot dry mass and stem diameter, which can be observed from the high average values (Table 10) and the positive correlations between the leaf P content and plant height ($r = 0.69$; $P \leq 0.01$), shoot dry mass ($r = 0.72$; $P \leq 0.01$) and stem diameter ($r = 0.65$; $P \leq 0.01$).

Table 10 Plant height, stem diameter, shoot dry mass (SDM), leaf P content (P), number of spores in the substrate and rate of root mycorrhizal colonization of the corn plants inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungi isolates from different origins.

Code	Treatments	Height	Diameter	SDM	P	Spores ⁽¹⁾	Colonization
		cm	mm	g	g kg ⁻¹	unidade	%
Con	<i>Control (not inoculated)</i>	24,9 c	5,68 c	1,95 b	3,17 b	1,0 d	0,0 c
Am2	<i>A. morrowiae</i>	45,7 a	6,22 a	3,08 a	3,89 a	67,3 a	58,4 a
As1	<i>A. scrobiculata</i> (A38)	29,4 b	5,52 c	2,35 b	3,22 b	27,6 c	43,0 a
As2	<i>A. scrobiculata</i>	19,6 c	4,85 c	1,28 c	2,67 b	15,7 d	43,2 a
Asp	<i>A. spinosa</i> (95-UFLA)	30,5 b	5,38 c	2,22 b	3,51 b	10,8 d	27,0 b
Aca	<i>Acaulospora</i> sp. (A88)	43,9 a	5,35 c	2,74 a	3,84a	35,4 c	31,8 b
Ec1	<i>E. colombiana</i> (A87)	29,3 b	5,01 c	1,68 c	3,45 b	25,0 c	26,0 b
Ec2	<i>E. colombiana</i> (A15)	32,1 b	5,15 c	2,49 a	3,18 b	33,7 c	33,4 b
Ec3	<i>E. colombiana</i>	35,7 a	5,36 c	2,91 a	3,85 a	64,3 a	51,8 a
Ec4	<i>E. colombiana</i> (06-	36,0 a	5,83 b	2,41 b	4,65 a	59,4 a	51,2 a
Ec5	<i>E. colombiana</i>	36,0 a	6,25 a	2,69 a	4,15 a	76,2 a	29,0 b
Gia1	<i>Gi. albida</i> (URM- FMA	39,8 a	5,21 c	2,76 a	3,88 a	32,1 c	50,6 a
Gia2	<i>Gi. albida</i> (03-UFLA	29,8 b	5,64 c	2,06 b	3,29 b	22,2 c	34,8 b
Gic1	<i>Gi. candida</i> (A36)	22,6 c	5,68 c	1,96 b	3,64 b	17,7 d	29,8 b
Gim1	<i>Gi. margarita</i> (A49)	19,7 c	5,32 c	1,67 c	3,47 b	8,0 d	40,2 b
Gim2	<i>Gi. margarita</i> (A1)	32,2 b	5,58 c	2,05 b	3,30 b	9,4 d	38,6 b
Gim3	<i>Gi. margarita</i> (A41)	33,0 b	5,87 b	2,82 a	3,49 b	14,1 d	48,0 a
Gim4	<i>Gi. margarita</i> (279-	36,5 a	4,96 c	2,50 a	3,85 a	16,6 d	51,8 a
Gim5	<i>Gi. margarita</i> (R1	39,9 a	5,47 c	3,08 a	3,93 a	23,7 c	47,6 a
Gir	<i>Gi. rosea</i> (A35)	38,7 a	5,80 b	2,35 b	4,48 a	32,9 c	41,8 a
Gc1	<i>G. clarum</i> (A5)	28,6 b	5,01 c	1,97 b	3,27 b	38,8 b	40,0 b
Gc2	<i>G. clarum</i> (URM -	34,9 a	6,78 a	3,51 a	4,45 a	47,5 b	50,6 a
Gc3	<i>G. clarum</i> (CMM-306)	40,0 a	5,85 b	3,13 a	3,94a	43,8 b	52,8 a
Gc4	<i>G. clarum</i> (ESALq)	40,6 a	6,59 a	3,40 a	3,87 a	61,1 a	54,6 a
Gc5	<i>G. clarum</i> (351-UFLA)	45,0 a	6,76 a	3,27 a	4,28 a	46,5 b	50,6 a
Ge1	<i>G. etunicatum</i> (365-	16,4 c	5,17 c	0,99 c	2,51 b	10,4 d	38,2 b
Ge2	<i>G. etunicatum</i> (URM-	31,6 b	5,00 c	2,31 b	3,16 b	36,4 c	31,8 b
Ge3	<i>G. etunicatum</i> (ESALq)	32,1 b	5,55 c	2,58 a	3,36	28,7 c	27,8 b
Ge4	<i>G. etunicatum</i>	44,1 a	6,51 a	3,29 a	3,71	52,4 b	58,6 a
Gf	<i>G. formosanum</i> (A20)	28,4 b	5,56 c	1,94 b	2,96	42,0 b	57,2 a

“Table 10, Conclusion”

Codice	Treatments	Height	Diameter	SDM	P	Spores ⁽¹⁾	Colonization
		cm	mm	g	g kg ⁻¹	unidade	%
Gm	<i>G. manihotis</i> (A83)	34,4 a	6,36 a	2,93 a	4,97	44,4 b	42,8 a
Gsp	<i>Glomus sp.</i> (A90)	43,1 a	6,26 a	3,36 a	4,29	51,3 b	27,2 b
Sc	<i>S. calospora</i> (A80)	38,5 a	6,62 a	3,44 a	4,07	48,4 b	49,6 a
Sg	<i>S. gregaria</i> (200-	30,0 b	4,76 c	2,00 b	3,36	10,7 d	25,0 b
Sh1	<i>S. heterogama</i> (A34)	25,1 c	4,62 c	1,96 b	3,00	16,2 d	30,4 b
Sh2	<i>S. heterogama</i> (A2)	35,7 a	5,90 b	2,88 a	3,82	20,5 d	53,0 a
Sh3	<i>S. heterogama</i> (312-	39,5 a	6,04 b	2,73 a	4,33	32,8 c	60,4 a
Sh4	<i>S. heterogama</i> (URM-	40,4 a	5,52 c	2,72 a	3,83	30,6 c	55,0 a
Sh5	<i>S. heterogama</i> (ESALq)	42,2 a	5,30 c	3,00 a	3,84	29,8 c	51,0 a
Sp1	<i>S. pellucida</i> (464-	28,5 b	5,02 c	2,17 b	3,31	14,3 d	24,6 b
Sp2	<i>S. pellucida</i> (A70)	28,8 b	4,90 c	1,84 b	3,54	22,2 c	31,8 b
Sp3	<i>S. pellucida</i> (128-	45,9 a	5,64 c	2,77 a	3,84	21,4 c	61,6 a

⁽¹⁾Values transformed by $(X+1)^{1/2}$; Different letters in the column indicate differences of the means by the Scott Knott test at 5%.

The cluster analysis carried out with the variables shoot dry mass (SDM) and leaf P content grouped the isolates mentioned above with 80% similarity (Figure 26). This group can be considered to contain the isolates that are efficient in promoting growth, phosphate nutrition and mycorrhizal symbiosis in corn. The other isolates, considered inefficient, also were clustered with 80% similarity in a second cluster (Figure 26). Of the isolates mentioned above, the only exceptions and possible errors of this grouping were *Acaulospora sp.* (Aca), which was among the inefficient lineages, and *G. formosanum* (Gf), which was grouped with the efficient ones. The explanation for this outcome is that *Acaulospora sp.* (Aca) promoted high growth and phosphate nutrition in the corn plants but showed low mycorrhizal colonization (31.8%), while *G. formosanum* (Gf) promoted low growth and phosphate nutrition but had a high rate of root colonization (57.2%).

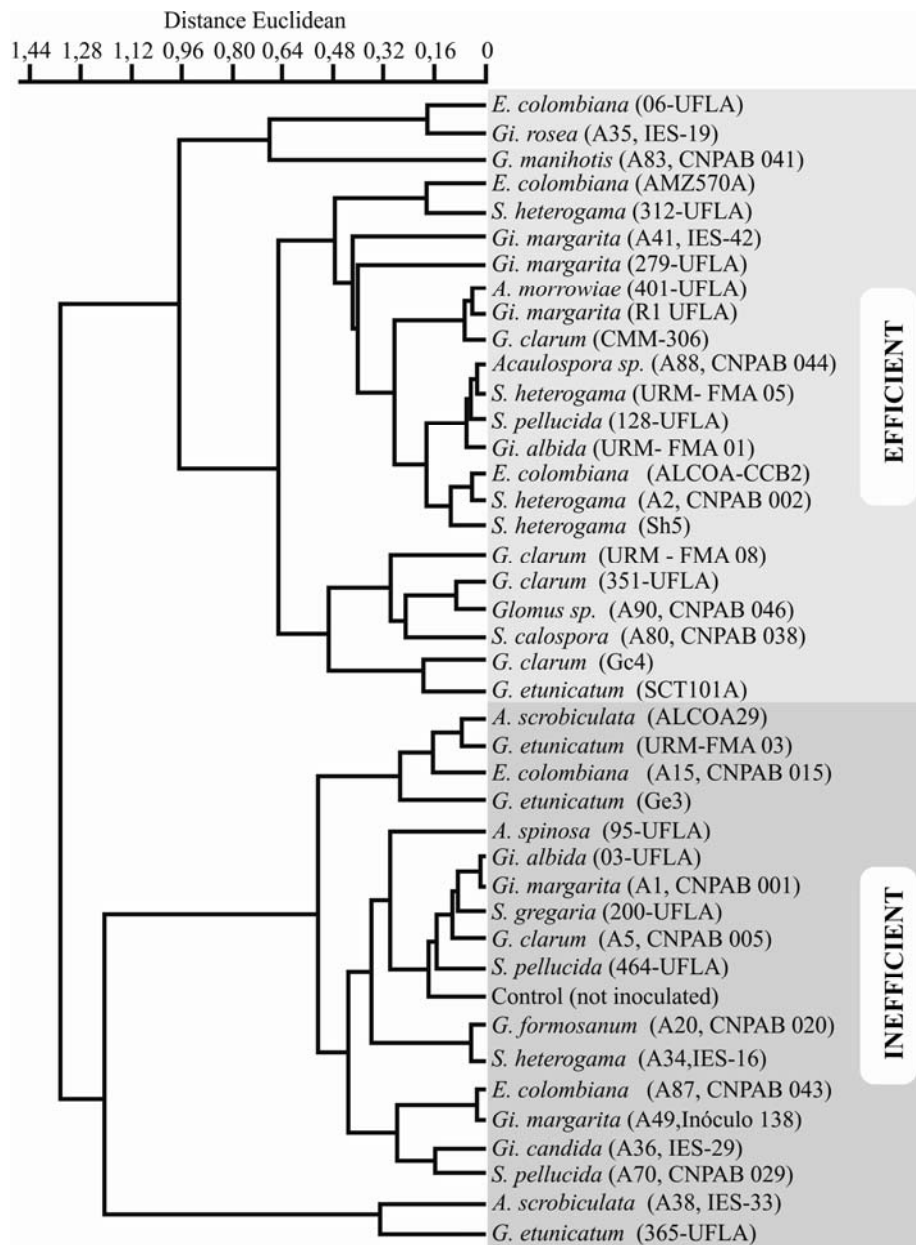


Figure 26 Cluster analysis of the variables shoot dry mass (SDM) and leaf P content evaluated in the different AMF isolates utilizing the Bray-Curtis distance coefficient.

These data demonstrate the functional variability among the isolates studied, with variation in fungus-plant compatibility and efficiency in promoting growth and nutrition of corn. For the majority of isolates there is a positive relation between mycorrhizal colonization and corn growth and nutrition of. However, there are isolates that exclusively colonize corn roots without any compensation in growth and P nutrition, as already mentioned for the case of *G. formosanum* (Gf), as well as the lineages *G. margarita* (Gim3) and *A. scrobiculata* (As1 and As2). This situation suggests that various mechanisms act on the different corn-fungus combinations, so that the most efficient symbiosis (from a farming standpoint) is the one with the best fit between the investment the plant makes in intraradical colonization and the return that the plant obtains in growth and nutrition (Koide, 1991). Further according to that author, this can be influenced by the development characteristics of each isolate, which are peculiar and intrinsic to its genetic expression, associated with corn and the substrate used. The particular behavior of corn regarding susceptibility to colonization by different isolates appears to result both from the fungus-plant compatibility, as shown by Pouyú-Rojas et al. (2006), and the capacity of each isolate to overcome the barriers to root colonization (Kiriachek et al., 2009).

Among the isolates of the same species, there was variation in both root colonization and sporulation. Within the same fungal species, the isolates that presented greater colonization and sporulation promoted more growth P nutrition improvement. This can be observed for the isolates *A. scrobiculata* (As1), *E. colombiana* (Ec3, Ec4 and Ec5), *Gi. albida* (Gia1), *Gi. margarita* (Gim3, Gim4 and Gim5), *G. clarum* (Gc2, Gc3, Gc4 and Gc5), *G. etunicatum* (Ge4), *S. heterogama* (Sh2, Sh3, Sh4 and Sh5) and *S. pellucida* (Sp3), which were better than the other isolates of their species in the mycorrhization, growth and P-nutrition (Table 10).

3.3 Relationship between genetic and functional variability

It was not possible to observe a relationship between the functional and genetic variability of the isolates studied. There were functional differences even within the groups of isolates that presented 100% genetic similarity, i.e. isolates efficient and inefficient in promoting corn growth. For example, in the group formed by Gc1, Gc3 and Gm, the first isolate is inefficient and the second two are efficient for corn, and in the group formed of Gim1, Gim2 and Sh4, the first two are inefficient and the last is efficient.

Munkvold et al. (2004) studying different geographic isolates of the species *Glomus mosseae*, *Glomus caledonium* and *Glomus claroideum*, found that although species clusters have been clearly distinguished by analysis of LSU rDNA sequences, these groups often do not correspond to the functional differences observed. The authors noted that the important functional characteristics, such as hypha length and plant growth and P nutrition, varied more between the isolates of the same species than between species, suggesting the need for simultaneous analysis of various molecular markers to explain these functional differences. Functional difference in isolates can be induced by selective pressure in only a few generations, as reported by Koch et al. (2004). Employing the PCR-AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique, they observed genetic differences between *Glomus* intraradices isolates from a single geographic area after field experiments over several generations with part of the community maintained in a separate place but under identical conditions. The isolates showed considerable differences in the band profiles and phenotypes, especially in the density of the extraradical hyphae, a characteristic considered important in the acquisition of phosphorous from the soil. The genetic diversity of AMF has allowed them to thrive over millions of years in different land ecosystems with a wide diversity of plants in constant

change over the time.

Studies of the intraspecific functional variability have been carried out with only a small number of isolates and few AMF species, most often with different *Glomus mosseae* isolates. In the present study, we examined a large number of tropical AMF isolates and observed that the differences, both genotypic and functional, are often greater between isolates of the same species than between different species defined based on spore morphology.

The restriction band profiles are more useful to identify taxonomic entities at the species level in other organisms than in Glomeromycota (Redecker et al., 1997), possibly because these fungi have different copies of the region of the ribosomal DNA in a single spore. Since the objective of this work was not to assess the phylogeny of the isolates, but rather the genetic variability among them, the molecular technique applied was successful, showing that the gene sequences are heterogeneous among isolates of the same species for *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita*, *Scutellospora heterogama*, *E. colombiana* and *Gigaspora candida*, among others. This suggests that when employing molecular taxonomic criteria, different isolates of a single species defined based on spore morphology can belong to different species than those established by conventional taxonomy.

The results indicate that the RFLP technique does not permit diagnosing the symbiotic efficiency of the AMF isolates tested here. They also show that the restriction band profiles confirm the identification of *Glomus clarum* and the majority of the members of the Gigasporaceae family, but do not permit distinguishing the species of this family.

The results obtained here are important to provide greater insight into the functional and genetic variability of AMF. Further studies will be necessary to clarify whether only one multiplication cycle under the same environmental condition and host, as employed in this work, is sufficient to reduce the origin's

effect, which came from different collections maintained under different culture conditions (substrate composition, host plant) and environmental conditions (states of Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and Pernambuco).

4 CONCLUSIONS

1. The RFLP technique allows differentiation of isolates of the same species, described based on spore morphology, so it can be a practical way to distinguish isolates in culture collections and programs for applying AMF.

2. The isolates analyzed could be grouped into efficient and inefficient promoters of growth, phosphate nutrition and mycorrhization of corn.

3. It was not possible to observe a relationship between the functional and genetic variability by analysis using the RFLP technique.

4. Groups with 100% genetic similarity by the RFLP technique contained efficient and inefficient fungi.

5. The functional differences can be greater between isolates of the same species than between distinct species as defined based on spore morphology.

5 Acknowledgments

We thank the researchers Leonor Costa Maia (Pernambuco Federal University), Elke J. B. N. Cardoso (ESALq) and Sidney Sturmer (FURB) and their respective institutions for providing some of the AMF lineages utilized in the present study. We also thank the agronomy doctoral student Samuel Ribeiro Passos for help with the Gelcompar II program.

REFERENCES

- AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M; Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Can. J. Microbiol.** v.55, p.242–253, 2009.
- AVIO, L.; PELLEGRINO, E.; BONARI, E.; GIOVANNETTI, M.. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytol.* 172: 347–357. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01839.x. PMID:16995921, 2006.
- AZIZ, T.; HABTE, M. Determining vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks. *Canadian Journal of Microbiology*, v.33, p.1097-1101, 1987.
- Babu, A. G. and Reddy, M. S. 2011. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with plants growing in fly ash pond and their potential role in ecological restoration. *Current Microbiology* 63 (3): 273-280.
- BETHLENFALVAY, G.J., FRANSON, R.L., BROWN, M.S., AND MIHARA, K.L. The *Glycine–Glomus–Bradyrhizobium* symbiosis: IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Physiol. Plant.* 76: 226–232. doi: 10.1111/j. 1399-3054.1989.tb05637.x, 1989.
- CLARK, R.B; ZETO, S.K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biol. Biochem.*, v.28, p. 1505–1511, 1996.
- de SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; van VEEN, J.A; 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*. **Appl. Env. Microbiology**, v.70, n. 3, p.1413-1424, 2004.
- de SOUZA, F.A.; DA SILVA, I.C.L.; BERBARA, R.L.L. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA; F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIJBERT, B. (Org.). Biodiversidade Variabilidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros. Lavras, MG: Editora UFLA, v.1, p. 483-536, 2008.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. *Revista Científica Symposium*, 6(2), 36-41, 2008.

GERDEMANN, J. N.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of British Mycorrhizal Society, Cambridge*, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 95(10):1160-1162, 1991.

HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; TURNER, S.L.; GALLERY, R.; YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* v.11, p.2669-2678, 2002.

INVAM - International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponível em:
<http://www.invam.caf.wvu.edu/index.html>. Consultado em 06 de fevereiro de 2012.

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

KIRIACHEK, S.G; de AZEVEDO, L.C.B; PERES, L.E.P.; LAMBAIS, M.R. Regulation of arbuscular mycorrhizae development. **Revista brasileira de ciência do solo**. 33(1):1-16, 2009.

KLIRONOMOS, J. N. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, Tempe, v.84, n.9, p.2292-2301, Sept. 2003.

KOCH, A.M.; KUHN, G.; FONTANILLAS, P.; FUMAGALLI, L.; GOUDET, I; SANDERS, I.R. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, n. 8, p.2369-2374, 2004.

KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *The New Phytologist*, Oxford, v.117, n.3, p.365-86, Mar. 1991.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, Cambridge, v.92, n.4, p.486-488, June 1989.

Martinez-Garcia, L. B. and Pugnaire, F. I. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology* 48 (3): 313-317

Martinez-Garcia, L. B., Armas, C., Dios Miranda, J. de, Padilla, F. M. and Pugnaire, F. I. 2011. Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology & Biochemistry* 43 (3): 682-689.

MERGULHAO, A.C.D.S.; DA SILVA, M.V.; 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). *Ann. Microbiol.*, 58(2):341-344, 2008.

Miras-Avalos, J. M., Antunes, P. M., Koch, A., Khosla, K., Klironomos, J. N. and Dunfield, K. E. 2011. The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia* 54 (4): 235-241.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, with an emendations of Glomaceae. *Mycotaxon*, v.37, p.471-491, Apr./Jun. 1990.

MORTON, J.B; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, v.93, n.1, pp.181-195, 2001

MUNKVOLD, L.; KJOLLER, R.; VESTBERG, M.; ROSENDAHL, S.; JAKOBSEN, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Cambridge, v.164, n.2, p.357-364, Nov. 2004.

NOVAIS, C. B.; de SOUZA, F. A.; SIQUEIRA, J. O.. Phenotypic and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal spores from cultures maintained in germplasm collection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.8, p.806-896, ago. 2010.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G.A. da. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, v.2, n.2, p.191–199, 2011. doi:10.5598/ima fungus.2011.02.02.10

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, J. G. D. Symbiotic compatibility of arbuscular mycorrhizal fungi with tropical tree species . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.30, n.3, p.413-424, maio/jun. 2006.

REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1756-1761, 1997.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Evaluation of the symbiotic effectiveness of endomycorrhizal fungi for coffee tree. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, n.2, p.221-228, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2.344p. (Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction)

SCHÜBLER, A.; WALKER, C. *The Glomeromycota: a species list with new families and new genera*. Arthur Schüßler, Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Disponível em : www.amf-phylogeny.com. Consultado em 06 de fevereiro de 2012.

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

SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. Histórico e evolução da micorrizologia no Brasil: avanços em três décadas. In: SIQUEIRA,

J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (eds.) Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: UFLA, 2010. p1-14

SMITH, S. E.; SMITH, F. A.; JAKOBSEN, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist*, Cambridge, v.162, n.2, p.511–524, May 2004.

STAHL, P.D.; CHRISTENSEN, M.; WILLIAMS, S.E. Population variation in the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: uniform garden experiments. *Mycol. Res.* 94: 1070–1076, 1990.

VAN DER HEIJDEN, E.W.; KUYPER, T.W. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? *Plant and Soil*, v230, p.161–174, 2001.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification And direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A. et al., Eds.), **Academic Press**, pp.315-322. San Diego, CA., 1990.

Wagg, C.; Jansa, J.; Schmid, B.; van der Heijden, M. Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecology Letters*, (2011) 14: 1001–1009.