



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.
Centro de Convenções do SESC

Caracterização Molecular de Fungos Micorrízicos Arbusculares Associados a Genótipos de Milho Contrastantes para Eficiência no Uso de Fósforo

Eliane Aparecida Gomes⁽¹⁾; Flávia Aparecida O. Soares⁽²⁾; Ubiraci G. de Paula Lana⁽³⁾ & Francisco Adriano de Souza⁽¹⁾

(1) Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, eliane@cnpmc.embrapa.br (apresentador do trabalho), francisco.adriano@cnpmc.embrapa.br; (2) Bióloga – Bolsista McKnight/Fapemig, flaviasetelagoas@yahoo.com.br; (3) Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, ubiraci@cnpmc.embrapa.br

RESUMO – Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) aumentam a superfície de exploração do solo e a capacidade de absorção de nutrientes e de água pelas raízes facilitando a adaptação das plantas a solos pouco férteis. O objetivo desse trabalho é avaliar a comunidade nativa de FMA presente nas raízes de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo (P) pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e por clonagem e sequenciamento de rDNA (DNA ribossômico). A análise por DGGE indicou grande diversidade de FMA entre os genótipos de milho, apresentando bandas exclusivas em duas linhagens eficientes (L228-3 e L3), ambas cultivadas sob baixo teor de P. Na análise por clonagem, as duas bibliotecas obtidas em baixo P, apresentaram um número predominante de clones de FMA enquanto que naquelas obtidas em alto P predominaram fungos não micorrízicos, como *Fusarium*. Os testes estatísticos indicaram que as quatro bibliotecas cobriram de 48% a 78% da diversidade total indicando a necessidade do sequenciamento de um número mais representativo de sequências. A biblioteca da linhagem L3 em baixo P apresentou os maiores valores para os estimadores de riqueza Ace e Chao e também para o índice de Shannon. Além disso, foi a que apresentou maior valor de equitabilidade, indicando que esta biblioteca é a que apresenta a maior diversidade de FMA.

Palavras-chave: Fungos micorrízicos arbusculares, genótipos contrastantes, fósforo, milho

INTRODUÇÃO - Um dos fatores limitantes da expansão agrícola no Cerrado brasileiro são os solos ácidos, com baixa fertilidade, toxidez de alumínio e baixa disponibilidade de fósforo (P) (Novais &

Smyth, 1999). As plantas de milho cultivadas neste ambiente estão expostas a estresses nutricionais, particularmente de fósforo, apresentando frequentemente associação com FMA. Os fungos têm uma importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente fósforo (Smith & Read, 1997). Porém, existe pouca informação sobre os efeitos de genótipos de milho eficientes na absorção de fósforo na dinâmica do desenvolvimento de FMA.

O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises do DNA permitiu a identificação dos fungos dentro e fora das raízes e distinguir diferentes isolados de uma espécie presentes nas áreas de cultivo. Dentre essas técnicas, análises por clonagem e sequenciamento de rDNA e DGGE estão entre as mais utilizadas para estudar as variações intra e interespecíficas e as relações filogenéticas entre FMA (Liang et al., 2008). O objetivo deste trabalho é caracterizar a população de FMA presente em raízes de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo, cultivados em solo de Cerrado, com alta e baixa disponibilidade deste nutriente.

MATERIAL E MÉTODOS - Foram utilizados quinze genótipos de milho (*Zea mays*) eficientes, moderadamente eficientes e ineficientes no uso de P (Tabela 1), previamente selecionados dentro do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

O experimento foi conduzido em um latossolo vermelho distrófico, fase cerrado, com baixo (3 mg Kg⁻¹) e alto nível de P (29 mg kg⁻¹), sem limitação
Tabela 1. Genótipos de milho cultivados e respectivas eficiências no uso de P

Linhagens eficientes	Linhagens ineficientes	Linhagem média	Híbridos eficientes	Híbridos ineficientes
L3	L22	L36	BRS 1010	L3 x L53
L228-3	L53		BRS 3060	L36 x Cateto
L161	Cateto		L3 x L22	HS20 x 22
				HS5046 x 53
				HS26 x 1113

dos demais nutrientes em um delineamento em blocos casualizados completos com três repetições. As raízes mais finas dos genótipos de milho foram coletadas aos 60 dias após o plantio, durante a fase de florescimento. O DNA total das raízes foi extraído segundo protocolo descrito por Saghai-Marroof et al., (1984), com modificações.

Para análise por DGGE, os fragmentos de rDNA dos fungos micorrízicos foram amplificados com os *primers* NS5 e ITS4 (White et al., 1990), seguido de uma segunda reação de *nested*-PCR, com o *primer* específico para família Glomeraceae de fungos micorrízicos, GLOM1310 (Redecker, 2000) acrescido de uma sequência GC-grampo juntamente com ITS2 (White et al., 1990). Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 6% contendo um gradiente de 25% a 35% de agentes desnaturantes (uréia e formamida deionizada) e submetidos à eletroforese em uma unidade de DGGE da Bio-Rad (Richmond, EUA) a 70 V por 16 horas a 60°C. Após a corrida, os géis foram corados com prata e os padrões de bandas obtidos comparados utilizando o programa Statistica 6.0 utilizando UPGMA (*Unweighted Pair Group With Mathematical Averages*). As bandas mais informativas foram eluídas do gel, reamplificadas e o DNA sequenciado.

Para a clonagem, foram utilizadas as linhagens de milho (*Zea mays*) L3 e L22 cultivadas em baixo e alto P. Os fragmentos de rDNA dos fungos micorrízicos foram amplificados por PCR, utilizando-se o *primer* universal NS31 (White et al., 1990) e o *primer* específico para fungos micorrízicos AM1 (Helgason et al. 1998), seguido de uma segunda reação de *nested* PCR, com o *primer* FM7 (de Souza, 2010, resultados não publicados) específico para fungos micorrízicos, juntamente com NS31. Os fragmentos de genes ribossômicos amplificados dos fungos micorrízicos foram clonados no vetor pJET1.2 (Fermentas, USA). O DNA plasmidial recombinante foi extraído pelo método da lise alcalina e sequenciado utilizando-se o *primer* pJET1.2 direto. As reações de sequenciamento das bandas eluídas do DGGE e do DNA plasmidial da clonagem foram realizadas com o kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com recomendações do fabricante e analisadas no sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências de DNA obtidas foram

processadas e comparadas com as informações disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa Blast-N.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – A amplificação do DNA dos fungos micorrízicos presentes nas raízes dos genótipos de milho utilizando os pares de *primers* GLOM1310/ITS2 e NS31/FM7 resultaram em fragmentos de 600 e 400 pares de bases, respectivamente, para todos os genótipos analisados. A análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos fragmentos amplificados com os *primers* GLOM1310 e ITS2 das raízes de sete linhagens e oito híbridos cultivados em alto e baixo P indicou grande diversidade da população de fungos micorrízicos entre os genótipos (Fig. 1). Foi analisado um total de 33 bandas no gel das linhagens e 36 bandas no gel dos híbridos. Bandas exclusivas foram encontradas nas linhagens eficientes L228-3 e L3 (Fig. 1-I), ambas cultivadas em baixo teor de P. Essas bandas podem estar relacionadas a uma associação preferencial entre espécies de FMA e esses genótipos. Diversos trabalhos têm demonstrado que, apesar da ausência de especificidade hospedeira, há uma variação nas espécies de FMA que colonizam a planta e os seus benefícios ao hospedeiro em função dos genótipos dos simbiontes (Klironomos et al., 2000).

Os perfis das bandas no gel de DGGE foram usados para construção de dendrogramas de linhagens (Fig. 1-I) e híbridos (Fig. 1-II). O dendrograma das linhagens das raízes de milho indicou que a uma distância de 0,4% houve um agrupamento de quase todas as linhagens cultivadas em alto P e o agrupamento de todas as linhagens cultivadas em baixo P (Fig. 1-I). A eficiência no uso de P não foi o fator determinante no agrupamento das linhagens. Pode-se considerar que o agrupamento da população de fungos micorrízicos foi influenciado pela disponibilidade de P no solo. O fator determinante no agrupamento dos híbridos não ficou claro, uma vez que os grupos apresentaram genótipos tanto eficientes, quanto ineficientes, cultivados sob alto e baixo P.

A análise das sequências dos fragmentos eluídos dos géis obtidas confirma a especificidade dos *primers* para a família Glomeraceae, uma vez que não foram identificadas espécies de outras famílias (dados não mostrados). Apesar do número de sequências identificadas não ser representativo da comunidade de fungos presente nos genótipos, a espécie *Glomus clarum* apareceu somente nos genótipos de milho cultivados sob baixo P (bandas 1,2,3,4 e 5 da Fig.1), podendo estar relacionada à tolerância ao estresse de P nesse solo. Uma mesma amostra apresentou bandas diferentes, pertencentes a uma mesma espécie, indicando a ocorrência de uma variação intra-

específica. As bandas 1 e 2 (Fig. 1-I) da linhagem L3 e as bandas 4 e 5 (Fig. 1-II) do híbrido HS26 X 1113 foram identificadas como pertencentes à espécie *G. clarum*. Estes dados sugerem que estas diferentes ocorreram devido a variações entre as cópias do gene rRNA.

Para análise dos fragmentos de DNA amplificados com os *primers* NS31/FM7 por clonagem foram construídas quatro bibliotecas, L3BP, L22BP, L3AP e L22AP (linhagens L3 e L22 cultivadas em alto e baixos teores de P), totalizando 361 clones sequenciados, dos quais 338 apresentaram sequências de qualidade (87, 97, 92 e 62 clones de cada biblioteca, respectivamente). Deste total, 199 sequências representaram fungos micorrízicos distribuídos da seguinte forma: L3BP (69 clones), L22 BP (74 clones), L3AP (18 clones) e L22 AP (38 clones). Nas bibliotecas obtidas em baixo P, tanto L3 quanto L22 apresentaram um número maior de clones de fungos micorrízicos em comparação com outros fungos endofíticos. No entanto, nas bibliotecas obtidas em alto teor de P, foi observada uma predominância de fungos não micorrízicos, como *Fusarium* do filo Ascomycota (Fig. 2). Após a análise por Blast, foram realizados testes estatísticos com base na distribuição das sequências de DNA dos fungos micorrízicos para inferir sobre a cobertura, riqueza, diversidade e equitabilidade de cada biblioteca. Para verificar se o número de clones de cada biblioteca estava realmente refletindo a diversidade das amostras, foi calculado o índice de cobertura de acordo com Chelius & Triplett (2001). As quatro bibliotecas deste estudo cobriram de 48% a 78% da diversidade total indicando a necessidade do sequenciamento de um número mais representativo de sequências (Tabela 2). A biblioteca L3BP apresentou os maiores valores para os estimadores de riqueza Ace e Chao e também para o índice de Shannon. Além disso, a L3BP apresentou maior valor de equitabilidade, indicando que esta biblioteca é a que apresenta a maior diversidade de FMA (Tabela 2).

CONCLUSÕES – A técnica de PCR-DGGE utilizando *primers* para família Glomeraceae mostrou grande diversidade da população micorrízica entre os genótipos. Bandas exclusivas observadas somente nas linhagens eficientes (L228-3 e L3) ambas cultivadas sob baixo fósforo, podem estar relacionadas com a eficiência destes genótipos. A presença de *G. clarum* somente em genótipos cultivados sob baixo P indica uma possível relação dessa espécie à tolerância ao estresse de P nesse solo. Os genótipos dos simbiontes e as condições nutricionais do ambiente foram determinantes no processo de colonização micorrízica. Nas bibliotecas obtidas utilizando *primers* específicos para Glomeromycetes houve mudança na estrutura das comunidades de FMA em função do aumento da disponibilidade de P, com

tendência de redução da diversidade e equitabilidade. A biblioteca L3BP apresentou os maiores valores para os estimadores de riqueza Ace e Chao, para o índice de Shannon e para os valores de equitabilidade.

Agradecimentos

O projeto contou com recursos da Fundação McKnight, Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

REFERÊNCIAS

- HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 384: 431, 1998.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em Solo e Planta em Condições Tropicais. Viçosa: UFV, 1999. 399p.
- KLIRONOMOS, J.N.; MCCUNE, J.; HART, M.; NEVILLES, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Lett.*, 3: 137-141, 2000.
- LIANG, Z.; DRIJBER, R. A.; LEE, D. J.; DWIEKAT, I. M.; HARRIS, S. D.; WEDIN, D. A.; A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biol. & Bioch.*, 40: 956-966, 2008.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em Solo e Planta em Condições Tropicais. 1ed. Viçosa: UFV, 1999. 399p.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, 10:73-80, 2000.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89: 1477-1481, 1984.
- SMITH, S.E.; READ, D. J. Mycorrhizal symbiosis. 2.ed. New York Academic, 1997. 604p
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications* Academic Press, San Diego, Calif, pp 315-322, 1990.

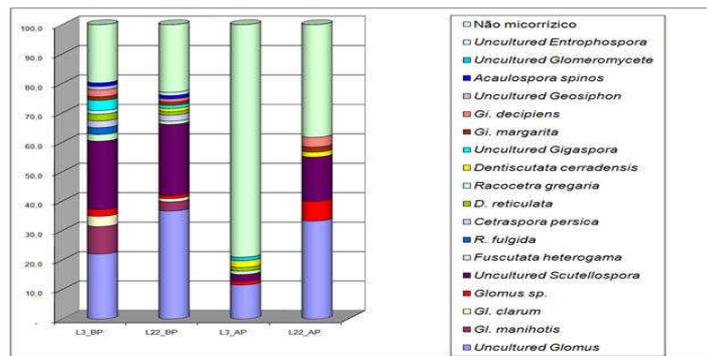
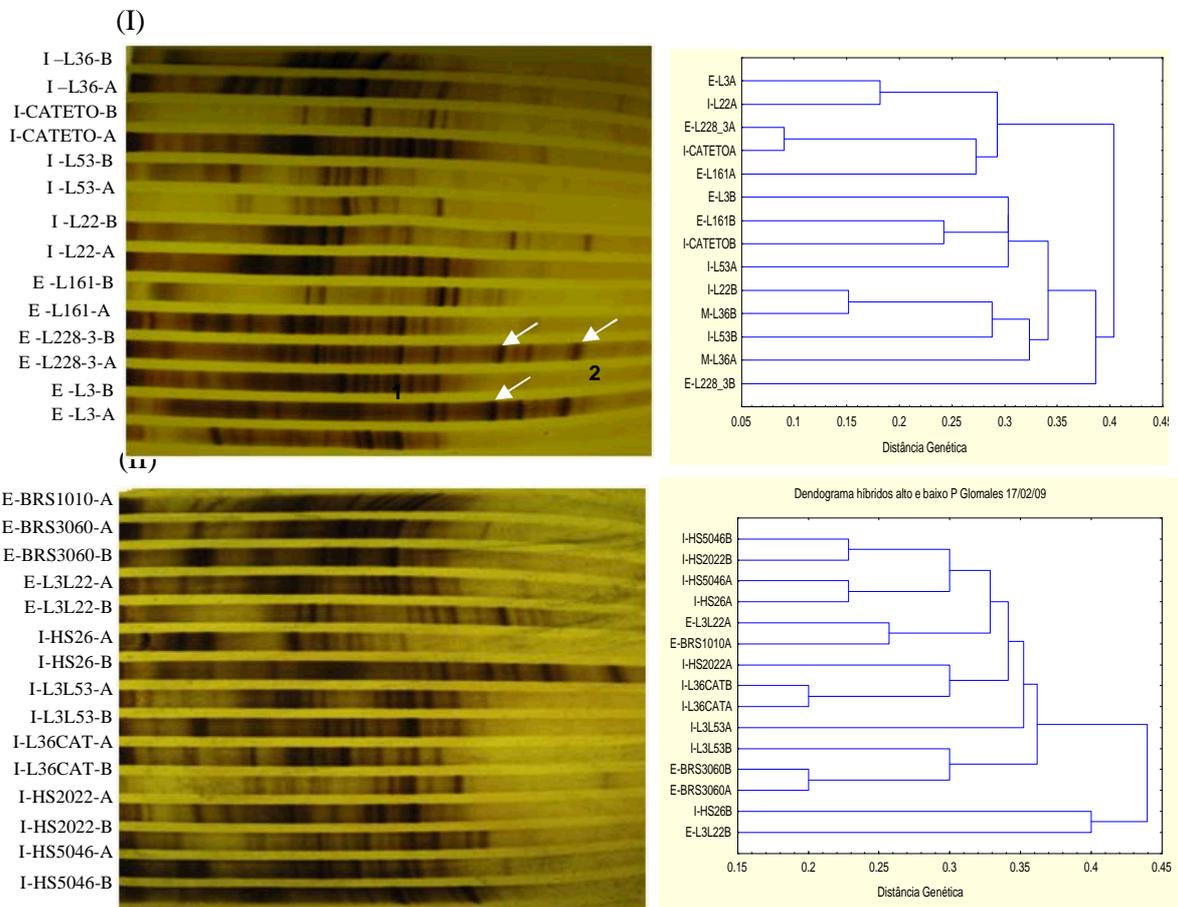


Tabela 2. Análise estatística das quatro bibliotecas obtidas das linhagens L3 e L22 de milho cultivadas em solos com baixo e alto teor de P

Biblioteca	Estimador Chao	Estimador Ace	Índice de Shannon	Equitabilidade (Evenness)	Cobertura
L3BP	171,00	161,64	3,50	0,92	0,48
L22BP	52,00	52,92	2,76	0,83	0,78
L3AP	25,00	41,65	2,20	0,79	0,56
L22AP	28,00	27,31	2,41	0,87	0,76