

## Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares associada às raízes de duas linhagens de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo

Eliane A. Gomes<sup>1</sup>, Ubiraci G. P. Lana<sup>1</sup>, Flávia A. S. Oliveira<sup>2</sup> e Francisco A. de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970.

<sup>2</sup> Centro Universitário UNIFEMM, Sete Lagoas, MG, 35701-242.

Palavras-chave: fósforo, fungos micorrízicos arbusculares, genótipos contrastantes, milho.

### Introdução

Os solos do Cerrado brasileiro geralmente são altamente intemperizados, ácidos e distróficos, expondo as plantas cultivadas nestes ambientes a várias formas de estresses durante seu ciclo de crescimento. Um dos fatores limitantes da expansão agrícola no Cerrado é a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade deste nutriente para as plantas (MARSCHNER et al., 2006). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm uma importante função na aquisição e mobilização de nutrientes do solo, principalmente P, pois formam uma extensa malha de hifas, que se estendem a partir das raízes, permitindo à planta explorar um grande volume de solo, superando limitações impostas pela baixa difusão de fósforo inorgânico no solo (SMITH; READ, 1997).

As plantas de milho têm uma alta taxa de crescimento e uma alta demanda por nutrientes, apresentando, frequentemente, interações com fungos micorrízicos. No entanto, existe pouca informação sobre os efeitos de genótipos de milho contrastantes quanto à eficiência de uso de P na dinâmica do desenvolvimento de FMA. O reconhecimento, identificação e quantificação dos FMAs envolvidos na associação com plantas de milho é uma etapa difícil porque esses fungos não crescem em meio de cultura, requerendo vários meses de crescimento em cultura-armadilha, junto com plantas hospedeiras, sob condições de casa de vegetação. Estas diferem das condições do campo e podem interferir com a sobrevivência do fungo. Como resultado, a distribuição da população no campo pode ser interpretada erroneamente (SIMON et al., 1992).

O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises do DNA favoreceu os estudos ecológicos das populações nativas de fungos micorrízicos presentes nas áreas de cultivo. Dentre estas técnicas, clonagem e sequenciamento, que analisa fragmentos de PCR do rDNA (DNA ribossômico) amplificados por *primers* específicos, está entre as mais utilizadas atualmente para se estudar as variações intra e interespecíficas e as relações filogenéticas entre FMA (SOUZA et al., 2004; SANTOS-GONZÁLEZ et al., 2007; LI et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a população de fungos micorrízicos nativa presente nas raízes de duas linhagens de milho, contrastantes quanto à eficiência no uso de fósforo, cultivadas em solos com baixa e alta disponibilidade deste nutriente pela técnica de clonagem e sequenciamento de DNA.

### Material e Métodos

**Genótipos:** Foram utilizadas duas linhagens de milho (*Zea mays*), L3 eficiente e L22 ineficiente no uso de P, previamente selecionadas dentro do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O experimento foi conduzido em campo em um delineamento em blocos casualizados completos, com três repetições, em um latossolo vermelho distrófico, fase



Cerrado, com baixo ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e alto nível de P ( $29 \text{ mg kg}^{-1}$ ), sem limitação dos demais nutrientes, perfazendo quatro tratamentos, L3 e L22 alto (AP) e baixo (BP) fósforo respectivamente, L3BP, L22BP, L3AP e L22AP. Amostras do ápice radicular dos genótipos de milho foram coletadas aos 60 dias após o plantio, durante a fase de florescimento.

**Extração de DNA:** DNA total foi extraído das raízes, utilizando-se o protocolo descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações. Os fragmentos de rDNA (DNA ribossômico) 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 (resultados não publicados) específico para fungos micorrízicos, juntamente com NS31.

**Clonagem e sequenciamento de DNA:** Quatro bibliotecas foram geradas pela clonagem dos fragmentos de genes ribossômicos amplificados dos fungos micorrízicos no vetor pJET2.1 (Fermentas, USA) e transformação de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O DNA plasmidial recombinante foi extraído pelo método da lise alcalina e sequenciado utilizando-se o *primer* pJET2.1. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems, USA) de acordo com recomendações do fabricante e analisadas no sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

**Análise dos dados:** As sequências de DNA foram devidamente processadas e comparadas com as informações disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa Blast-N (ALTSCHUL et al., 1997) e agrupadas pelo programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). O número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), curva de rarefação e índices de diversidade foram calculados utilizando o programa Mothur v.1.10.0 (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2009).

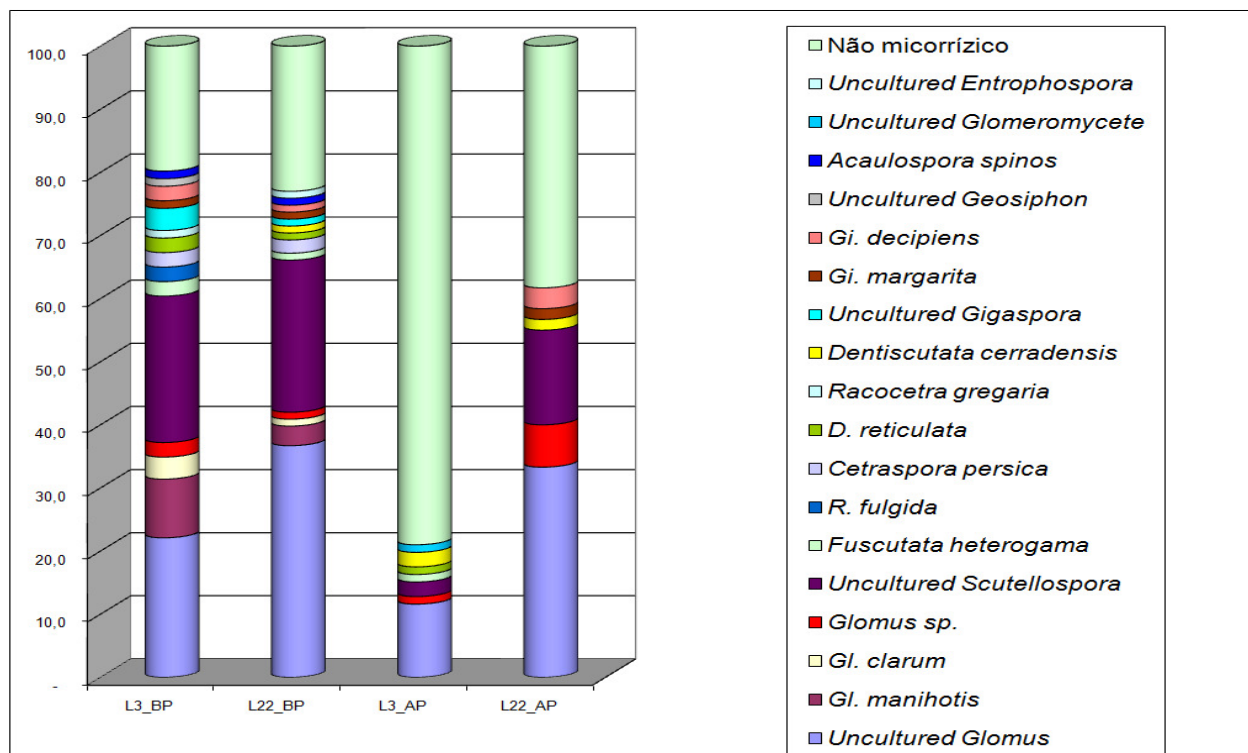
## Resultados e Discussão

O DNA extraído de três repetições das raízes das linhagens de milho L3 (eficiente no uso de P) e L22 (ineficiente) cultivadas com baixo e alto nível de P foi amplificado por reação de *nested* PCR, resultando em um total de 12 amostras. Foram obtidos fragmentos de 580 pares de bases utilizando os pares de *primers* NS31 e AM1 e fragmentos de, aproximadamente, 400 pb com os *primers* FM7 e NS31. Os produtos de PCR de cada repetição foram misturados e clonados como uma amostra única. Foram construídas quatro bibliotecas L3BP, L22BP, L3AP e L22AP, totalizando 361 clones sequenciados, dos quais 338 apresentaram sequências de qualidade (87, 97, 92 e 62 clones de cada biblioteca, respectivamente). As sequências foram comparadas com as existentes no banco de dados *GenBank* utilizando-se a ferramenta Blast-N (Figura 1). De um total de 338 sequências, 199 representaram fungos micorrízicos distribuídos da seguinte forma: L3BP (69 clones), L22 BP (74 clones), L3AP (18 clones) e L22 AP (38 clones).

A distribuição filogenética dos clones, com base no fragmento amplificado, variou entre as amostras analisadas. 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, sendo os gêneros *Glomus* e *Scutellospora sensu stricto* predominantes nas duas bibliotecas, com destaque para as espécies *G. manihotis* e *G. clarum* na linhagem eficiente L3 (Figura 1). No entanto, nas bibliotecas obtidas em alto teor de P, foi observada uma predominância de outros fungos endofíticos, como *Fusarium* do filo Ascomycota (Figura 1).

A seleção de um conjunto de primers adequados é um dos passos cruciais em estudos de comunidades de FMA que colonizam as raízes. Para uma boa caracterização da comunidade natural de FMA, o conjunto de *primers* utilizado deve amplificar a maioria das





**Figura 1.** Distribuição das porcentagens de fungos obtidos de cada uma das quatro bibliotecas com base na identificação feita pelo Blast-N.

famílias de FMA, mesmo aquelas pouco representadas naquela comunidade e excluir DNA de plantas e outros fungos. O par de primers AM1/NS31, que cobre uma região central de cerca de 580 pb da sub-unidade pequena do rDNA, tem sido largamente utilizado em estudos de diversidade molecular de FMA em prévios estudos. A falta de especificidade do primer AM1 já foi relatada na literatura (CLAPP et al., 2002; LI et al., 2010), portanto, a presença de sequências de fungos não micorrízicos nas bibliotecas não é surpresa. Neste estudo, foi utilizado um primer adicional (FM7) objetivando aumentar a especificidade da reação de PCR, mas este primer, apesar de mais seletivo, também amplifica sequências de Ascomycota. A proporção de sequências não micorrízicas amplificadas com AM1 pode variar para diferentes plantas hospedeiras e diferentes ambientes. Santos-González et al. (2007) em um estudo com raízes de milho detectaram que metade das sequências avaliadas era de Ascomycota.

A natureza das relações entre hospedeiros e fungos endofíticos ainda é pouca conhecida na maioria dos casos, podendo ir de patógenos a benéficos. Neste trabalho ainda não foi quantificada a colonização das raízes por FMA e outros endofíticos, mas foi observada uma presença constante de hifas de Ascomycota nas raízes visualizadas por microscopia (dados não mostrados).

Como neste trabalho, a presença de Ascomycota apresentou tendência de aumento (Figura 1) nas linhagens cultivadas em solos com alto teor de P em comparação com as mesmas linhagens cultivadas em baixo P. Uma possível explicação é que nos solos onde fósforo é abundante, a taxa de colonização micorrízica normalmente decresce, diminuindo a competição com outros endofíticos. Estes fungos podem ter encontrado, neste caso, um



ambiente propício para multiplicação e colonização das raízes. No entanto, podemos somente especular sobre o papel desses fungos Ascomycota nas raízes.

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 Chellius e Triplett (1999). 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 1). A biblioteca L3BP apresentou os maiores valores para os estimadores de riqueza Ace e Chao e também para o índice de Shannon que mede a diversidade da comunidade. Além disso, os valores de equitabilidade, que mostra a distribuição de indivíduos entre as espécies, foram maiores na biblioteca L3BP, indicando que esta biblioteca é a que apresenta a maior diversidade de FMA (Tabela 1).

**Tabela 1.** 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 <sup>a</sup>	Estimador Ace <sup>a</sup>	Índice de Shannon <sup>b</sup>	Equitabilidade <sup>c</sup> ( <i>Evenness</i> )	Cobertura <sup>d</sup>
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

<sup>a</sup> Estima a riqueza da comunidade (nº de espécies presentes de acordo com o nº de indivíduos amostrados)

<sup>b</sup> Estima a diversidade da comunidade

<sup>c</sup> Indica a distribuição dos indivíduos entre as espécies

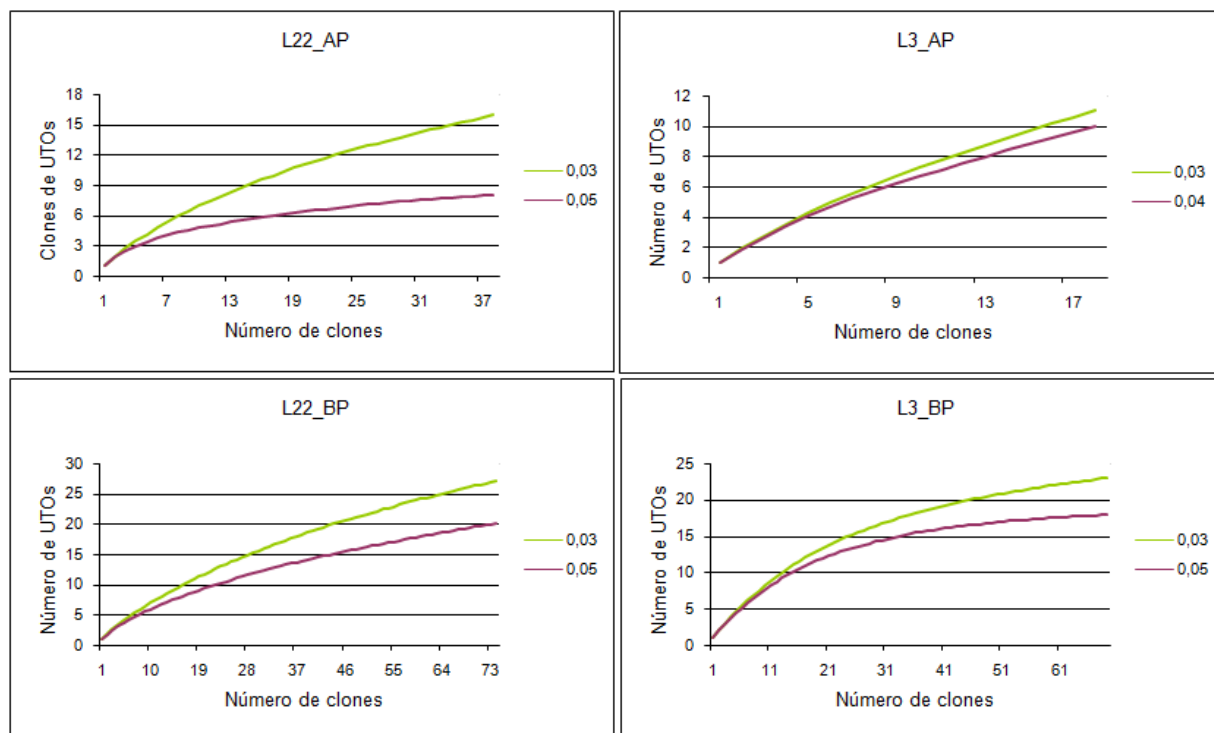
<sup>d</sup> Indica se o número de clones amostrados é suficiente para revelar a riqueza contida na amostra

Para determinar se a amostragem de clones obtidos em cada biblioteca era representativa foi feita uma curva de rarefação para cada biblioteca, com base nas UTOs definidas por dois níveis de similaridade (0,03 e 0,05) (Figura 2). Nas bibliotecas L3BP e L22BP, as curvas aparentam estar iniciando a sua estabilização, cobrindo bem a diversidade de sequências da comunidade na amostra, utilizando-se 97% e 95% de identidade entre as sequências. Já nas bibliotecas L3AP e L22AP esta tendência não é tão clara, já que as curvas não aparentam estar atingindo um platô. A biblioteca L3AP foi a que apresentou a maior porcentagem de clones de outros fungos endofíticos (80%), indicando que o número de clones amostrados parece ter sido insuficiente para demonstrar a diversidade total das sequências do fragmento do gene 18S rDNA dos FMA desta biblioteca.

Os resultados apresentados neste trabalho ainda são parciais, sendo evidente a necessidade de sequenciamento de um número maior de amostras em todas as bibliotecas, principalmente L3AP. Estes resultados também refletem a importância e a necessidade de mais estudos a respeito da biologia, ecologia e papel dos fungos endofíticos que colonizam as raízes das linhagens de milho, principalmente em condições de alto teor de P no solo. Estudos ecológicos experimentais têm revelado novas informações sobre os mecanismos de interação entre FMA e as comunidades de plantas, mas um desafio para o futuro continua sendo a



integração destas informações com um melhor conhecimento a respeito de outros grupos de fungos que colonizam as raízes e como estes grupos influenciam os padrões de colonização



**Figura 2.** Curva de rarefação com diferentes índices de similaridade para a definição de UTOs das bibliotecas obtidas com DNA de raízes de duas linhagens de milho cultivadas em solos com baixo e alto teor de fósforo. L22AP (linhagem L22 em alto P); L3AP (linhagem L3, alto P); L22BP (linhagem L22, baixo P) e L3BP (linhagem L3, baixo P).

por FMA. Outro desafio importante é o desenvolvimento de *primers* específicos para todas as famílias de FMA que excluam DNA de outros fungos endofíticos e de plantas.

### Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que:

1. Houve mudança na estrutura das comunidades de FMA em função do aumento da disponibilidade de P, com tendência de redução da diversidade e equitabilidade;
2. A frequência de clones de fungos não micorrízicos aumentou em função da maior disponibilidade de P;
3. A biblioteca L3BP apresentou os maiores valores para os estimadores de riqueza Ace e Chao e também para o índice de Shannon que mede a diversidade da comunidade. Além disso, os valores de equitabilidade, que mostram a distribuição de indivíduos entre as espécies, foram maiores na biblioteca L3BP, indicando que a linhagem L3 cultivada em solo com baixo P é a que apresenta a maior diversidade de FMA.

### 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

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- CHELLIUS, K. M.; TRIPLETT, E. W. Rapid detection of arbuscular mycorrhiza in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 9, p. 61-64, 1999.
- CLAPP, J. P.; HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; YOUNG, J. P. W. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SANDERS, I. R. (Ed.). **Mycorrhizal ecology**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 201-224.
- HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 384, n. 6692, p. 431, 1998.
- LI, L.-F.; LI, T.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z.-W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 71, p. 418-427, 2010.
- MARSCHNER P.; SOLAIMAN Z.; RENGEL Z. Rhizosphere properties of Poaceas genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 1477-1481, 1984.
- SANTOS-GONZÁLEZ, J. C.; FINLAY, R. D.; TEHLER, A. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5613-5623, 2007.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing MOTHUR: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.
- 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**, Washington, v. 54, p. 2908-2915, 1992.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1997.



SOUZA, F. A. de; KOWALCHUK, G. A.; LEEFLANG, P.; VAN VEEN, J. A.; SMIT, E. PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of the inter-and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1413-1424, 2004.

THOMPSON, J. D.; DIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

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. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

Apoio: FAPEMIG

