

Colonização e diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em linhagens de milho contrastantes para a eficiência no uso de P

**Amanda Bianchi da Silva Gonçalves¹, Ricardo Eustáquio Nogueira², Eliane Aparecida Gomes³, Ubiraci Gomes de Paula Lana³, Sylvia Morais de Sousa³,
Claudia Teixeira Guimarães³**

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei, Bolsista PIBIC/FAPEMIG; ² Universidade Federal de Ouro Preto, Doutorando em Genética UFMG/Embrapa; ³ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea, pertencente à família Poaceae, que possui grande importância no contexto social e econômico por fazer parte da alimentação humana e animal, além de ser utilizado em indústrias de alta tecnologia (FANCELLI, 2003). É o cereal mais produzido no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, com 67,0 milhões de toneladas na safra de 2015/2016 (CONAB, 2016).

Para atingir altos níveis de produtividade são necessárias altas doses de fertilizantes, sendo o fósforo (P) um dos mais importantes nutrientes para o desenvolvimento da planta. O P participa de processos como a fotossíntese, respiração e transferência de energia da célula, além da composição de ácidos nucleicos e fosfolípidos (GRANT et al., 2001). Mesmo sendo fundamental para o desenvolvimento das plantas, a disponibilidade de P no solo é extremamente baixa, pois interage com minerais da fração argila do solo, reduzindo sua mobilidade (SHEN et al., 2011).

Para superar as limitações de fósforo no solo, as plantas desenvolveram mecanismos que aumentam a eficiência na absorção desse nutriente, como modificações no sistema radicular, modificações químicas na rizosfera e interações com microrganismos (MAU; UTAMI, 2014). Dentro deste contexto, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos que apresentam uma interação benéfica à planta (BERBARA et al., 2006), pois produzem hifas, que são estruturas longas e finas, que interagem com as raízes permitindo que se tenha um maior volume de solo explorado, aumentando, conseqüentemente, a quantidade de P absorvido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Além da quantificação da colonização micorrízica das raízes, é importante avaliar a diversidade dos fungos encontrados nas raízes. Entre as técnicas utilizadas na

análise da diversidade genética de microrganismos, destaca-se o T-RFLP, que consiste na análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição. Essa técnica é simples e eficaz na avaliação da diversidade genética de populações de FMAs (DICKIE; FITZJOHN, 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a porcentagem de colonização micorrízica em linhagens de milho contrastantes para a eficiência no uso de P e avaliar a diversidade genética de FMAs utilizando a técnica de T-RFLP.

Material e Métodos

Materiais genéticos

Foram utilizadas linhagens de milho tropicais contrastantes quanto à eficiência no uso de P: L3 (eficiente) e L22 (ineficiente). Adicionalmente, foi utilizada a linhagem temperada de milho W22 e duas versões mutantes para o gene *STR2*, denominadas W22_Mut2 e W22_Mut3. O gene *STR2* está relacionado ao desenvolvimento de arbúsculos na associação micorrízica (ZHANG et al., 2010; GUTJAHR et al., 2012).

Experimento de campo

O plantio foi realizado em agosto de 2016, em condições de alto P (66,2 mg/dm³) e baixo P (3,9 mg/dm³) no solo. O sistema radicular das plantas foi coletado 45 dias após o plantio. Para cada linhagem em alto P, foram coletadas quatro repetições compostas por um bulk de cinco plantas. Em baixo P as linhagens tiveram o desenvolvimento comprometido e cada genótipo foi representado por um bulk de cinco plantas.

As raízes finas foram separadas e divididas em duas partes, uma para análise de colonização micorrízica e outra para a análise de diversidade genética por T-RFLP.

Coloração de raízes para análise da colonização micorrízica

As raízes finas foram lavadas e mantidas em etanol 50% (v/v) até o processamento. A coloração das raízes foi realizada segundo a metodologia de Koske e Gemma (1989) que resumidamente consistiu na incubação das raízes em solução KOH 10% (m/v) a 90 °C por 30 minutos, seguida da lavagem por três vezes com água deionizada e incubação em solução HCl 0,3 M por 30 minutos em temperatura ambiente. As raízes foram novamente lavadas três vezes e acondicionadas numa solução de trypan blue 0,1% (m/v) por 24 h. Após a coloração, as raízes foram transferidas para

lâminas de microscópio e visualizadas em lupa. As estruturas de vesículas e arbúsculos dos FMAs foram avaliadas em dez fragmentos de raízes e cada fragmento subdividido em 10 partes, gerando assim a porcentagem de arbúsculos e de vesículas.

Processamento das raízes para análise de T-RFLP

Para cada repetição, foram separadas 5,0 g de raízes finas em tubos cônicos de 50 mL. Às raízes foram adicionados 50 mL de solução de pirofostato de sódio 0,1% (m/v) e agitadas por 30 minutos a 130 rpm. Em seguida, as raízes foram retiradas, lavadas com água deionizada e transferidas para recipiente plástico. Os recipientes contendo as raízes foram expostos à luz UV por 5 minutos na capela de fluxo laminar. Posteriormente, as raízes foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL, sendo adicionados 35 mL de solução etanol 70% (v/v) por 3 minutos com agitação por inversão a cada minuto. O etanol foi descartado e foram adicionados 35 mL de solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), sendo as raízes incubadas por 5 minutos, agitando-se por inversão a cada minuto. Em seguida, a solução foi descartada e foram adicionados 35 mL de etanol 70% (v/v), que permaneceram em contato com as raízes em repouso por 30 minutos. O etanol foi retirado e as raízes lavadas 5 vezes com água deionizada. O excesso de água foi retirado e as amostras foram transferidas para papel alumínio, congeladas com nitrogênio líquido e acondicionadas a -80 °C. A extração de DNA das raízes foi realizada com o kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise de T-RFLP

Para a amplificação do gene 23S rRNA de FMAs foi utilizado nested-PCR a partir de reação com iniciadores LR1 e FLR2 (TROUVELOT et al., 1999). A reação inicial constituiu de 50 ng de DNA, 0,2 mM de primer, 5 µL de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), em 50 µL. Para a 2ª reação de PCR foram utilizados 2,5 µL do produto da 1ª reação e os iniciadores marcados com fluorescência FLR3 (6-FAM) e FLR4 (NED) (GOLLOTTE et al., 2004). As condições de PCR foram as mesmas utilizadas na 1ª reação. Em seguida, 10 µL do produto de PCR foram digeridos com 1 U da enzima de restrição *TaqI* e 2 µL de tampão 10X, em 20 µL. As amostras foram incubadas por 65 °C por 4 h.

Para avaliar os fragmentos de DNA gerados, 2 μ L do produto da digestão do DNA foram misturados a 9,8 μ L de formamida deionizada (Applied Biosystems, EUA) e 0,2 μ L de padrão ROX 500 (Applied Biosystems, EUA). A análise foi realizada no equipamento Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems, EUA) com o software GeneMapper 5.0. Posteriormente, os dados foram analisados no software online T-REX (CULMAN et al., 2009), possibilitando filtragem dos ruídos e alinhamento automático do tamanho dos fragmentos. Em seguida, os dados foram exportados em planilha binária e ordenados pela análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard utilizando o programa Past versão 3.04 (HAMMER et al., 2011).

Resultados e Discussão

Avaliação dos padrões de colonização micorrízica

Todas as raízes avaliadas apresentaram as estruturas dos FMAs, arbúsculos e vesículas, tanto em condições de alto quanto em baixo P. Como os arbúsculos são as estruturas principais no processo de colonização micorrízica, apenas a sua quantificação foi considerada na análise de colonização micorrízica.

Entre as linhagens tropicais contrastantes para a eficiência na utilização de P, a L3, eficiente, apresentou maior porcentagem de arbúsculos em relação à L22, que é considerada ineficiente na utilização de P (Figura 1). Oliveira et al. (2009) também observaram uma maior colonização micorrízica na linhagem L3 em comparação com a L22 em condições de campo. No entanto, Azevedo (2015) não observou diferença na porcentagem de colonização em condições de casa de vegetação com inoculação de duas espécies diferentes de FMAs. Assim, são esperadas variações no padrão de colonização micorrízica entre as condições de campo e de casa de vegetação com inoculação artificial.

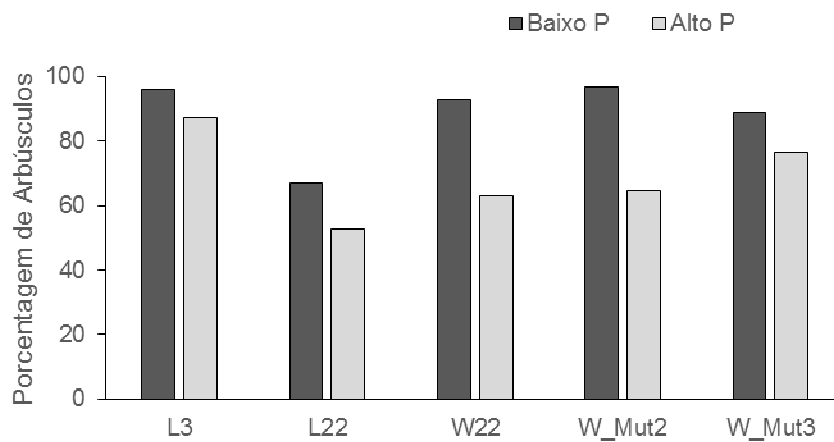
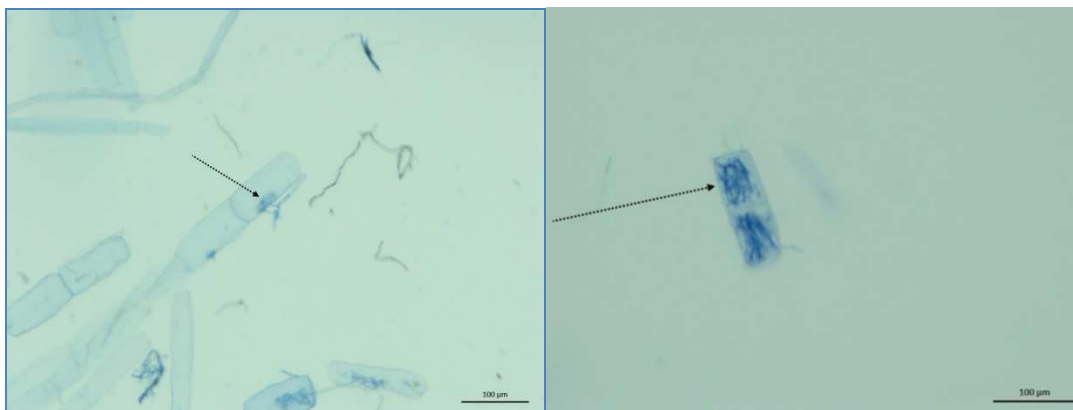


Figura 1. Porcentagem de arbúsculos de fungos micorrízicos em raízes de linhagens tropicais e temperadas de milho sob condições de alto e baixo P.

As linhagens temperadas também apresentaram altas porcentagens de arbúsculos micorrízicos em baixo P, não apresentando diferenças entre a linhagem selvagem (W22) e as linhagens contendo o gene *STR2* mutante (W_Mut2 e W_Mut3). No entanto, os arbúsculos das linhagens mutantes apresentaram um formato truncado (*stunted*) e menor quando comparados com a linhagem W22 e as demais linhagens tropicais (Figura 2).



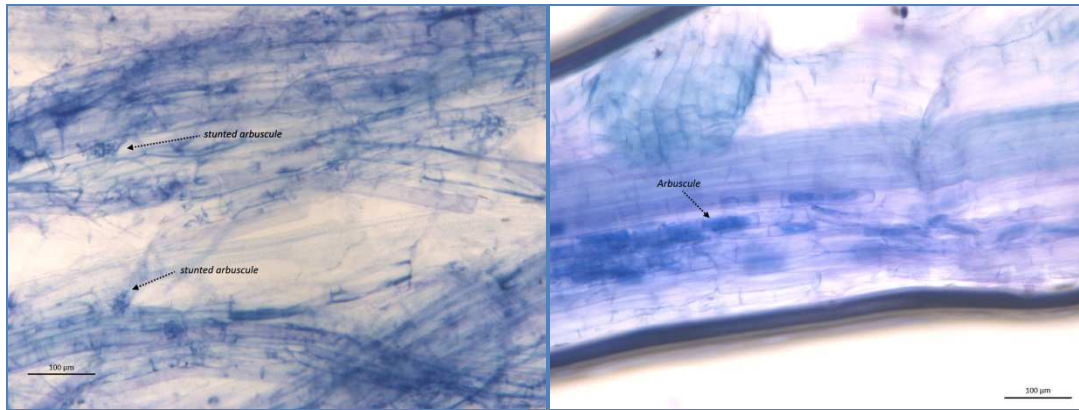


Figura 2. Comparação entre arbúsculos mutantes (*stunted*) à esquerda e normais à direita em raízes da linhagem de milho W22 mutante e selvagem para o gene *STR2*, respectivamente, cultivadas em condições de campo.

O arbúsculo mutante foi menor e não ocupava toda a extensão da célula, similar aos resultados com linhagens mutantes de arroz para os genes *STR1* e *STR2* (GUTJAHR et al., 2012). No entanto, apesar desse arbúsculo ser menor e com formato semelhante aos mutantes de arroz, sua porcentagem foi bastante elevada nas duas linhagens mutantes. Tais resultados sugerem que o gene *STR2* em milho também afeta a morfologia dos arbúsculos, mas não afeta a porcentagem de colonização em condições de campo. Esses são os primeiros resultados demonstrando arbúsculos truncados (*stunted*) em milho causados por mutações no gene *STR2*, à semelhança do efeito do gene em *Medicago truncatula* (ZHANG et al., 2010) e arroz (GUTJAHR et al., 2012), que codifica um transportador dimérico ABCG fundamental para a formação dos arbúsculos micorrízicos. Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos para caracterizar molecular e funcionalmente o efeito desse gene em milho.

Diversidade micorrízica nas raízes de milho temperado e tropical

A diversidade de FMAs nas raízes de linhagens de milho foi avaliada pela técnica de T-RFLP. A distribuição das comunidades dos fungos micorrízicos das raízes não mostrou qualquer estruturação populacional, nem em função dos diferentes genótipos nem em função da disponibilidade de P no solo, uma vez que grande parte da variabilidade genética foi verificada entre as amostras (Figura 3). Assim, a diversidade da população de FMAs nas raízes de milho não deve afetar a colonização micorrízica, pelo menos nas condições avaliadas no presente experimento.

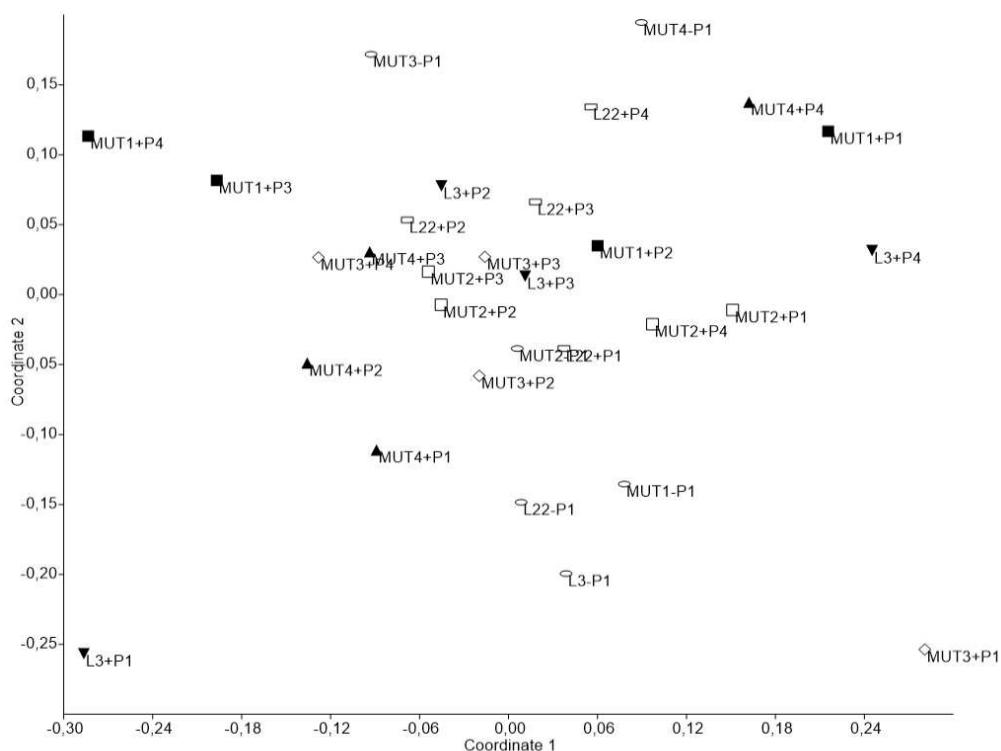


Figura 3. Diversidade genética da população de FMAs em raízes de milho avaliada por T-RFLP. +P: alto fósforo. -P: baixo fósforo. Os números indicados após o nível de P referem-se à repetição.

Estudos que visam conhecer a diversidade microbiana associada ao milho cultivado sob diferentes estresses podem auxiliar na identificação de microrganismos eficientes na promoção do crescimento, além de permitir um melhor entendimento da complexa interação entre plantas e microrganismos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fapemig, CNPq e Embrapa.

Referências

AZEVEDO, G. C. **Identificação de genes associados com a eficiência na aquisição de fósforo em milho, com foco nos genes PSTOL1, STR1 E SRT2.** 2015. 102 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A. de; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 53-88.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento safra brasileira de grãos**: safra 2015/16: décimo segundo levantamento. Brasília, DF, 2016. 180 p.

CULMAN, S. W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H. G.; CADILLOQUIROZ, H.; BUCKLEY, D. H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 171-180, 2009.

DICKIE, I. A.; FITZJOHN, R. G. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. **Mycorrhiza**, v. 17, p. 259-270, 2007.

FANCELLI, A. L. **Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 9 p.

GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, v. 14, p. 111-117, 2004.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. The importance of early season phosphorus nutrition. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, p. 211-224, 2001.

GUTJAHR, C.; RADOVANOVIC, D.; GEOFFROY, J.; ZHANG, Q.; SIEGLER, H.; CHIAPELLO, M.; CASIERI, L.; AN, K.; AN, G.; GUIDERDONI, E.; KUMAR, C. S.; SUNDARESAN, V.; HARRISON, M. J.; PASZKOWSKI, U. The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 69, p. 906-920, 2012.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. **PAST**: Palaeontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis: version. 1.37. 2011. Disponível em: <<http://nhm2.uio.no/norlex/past/download.html>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, p. 486-505, 1989.

MAU, A. E.; UTAMI, S. R. Effects of biochar amendment and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on availability of soil phosphorus and growth of maize. **Journal of Degraded and Mining Lands Management**, v. 1, p. 69-74, 2014.

MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

OLIVEIRA, C. A.; SÁ, N. M. H.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; SCOTTI, M. R.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing

gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 249-258, 2009.

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 997-1005, 2011.

TROUVELOT, S.; VAN TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZIPEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 203-206, 1999.

ZHANG, Q.; BLAYLOCK, L.; HARRISON, M. Two half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 1483-1497, 2010.