

Diversidade de Fungos Endofíticos em Folhas de Eucalipto⁽¹⁾.

Paulo Sérgio Balbino Miguel⁽²⁾; Julio Cesar Delvaux⁽²⁾; Júlio César Lima Neves⁽²⁾; Guilherme Luiz de Jesus⁽⁴⁾, Marcos Rogério Tótola⁽²⁾; Maurício Dutra Costa^(2,5), Arnaldo Chaer Borges⁽²⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Celulose Nipo-Brasileira S.A. e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; ⁽²⁾ Departamento de Microbiologia; Universidade Federal de Viçosa; Campus Universitário, Centro, Viçosa, MG, CEP: 36570-000; julio.delvaux@hotmail.com; ⁽³⁾ Departamento de Solos; Universidade Federal de Viçosa; Campus Universitário, Centro, Viçosa, MG, CEP: 36570-000; ⁽⁴⁾ Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento Florestal (GGF-P) Celulose Nipo-Brasileira S.A. - CENIBRA; Belo Oriente, Minas Gerais. ⁽⁵⁾ Bolsista CNPq

RESUMO: O eucalipto é de importância ambiental e econômica para o Brasil, gerando milhares de empregos e sendo alternativa à utilização de madeira de florestas nativas. Em ecossistemas florestais, as folhas das plantas são consideradas habitat comum para vários micro-organismos, mas pouco se conhece sobre a diversidade e distribuição da microbiota nesse ambiente. Nesse estudo foi avaliada a influência nas folhas da interrupção do fluxo de fotoassimilados para as raízes sobre a diversidade de fungos em eucalipto. Essa diversidade foi analisada por extração de DNA das folhas, amplificação da subunidade rRNA 18S e DGGE. As comparações dos perfis eletroforéticos por DGGE dos fragmentos mostrou a presença de diferentes UTOs nas folhas analisadas. A análise de UPGMA revelou que os padrões dos perfis referentes a árvores aneladas e não aneladas compartilham menos de 30 % de similaridade e formam grupos distintos. O anelamento das árvores provocou mudanças no perfil da comunidade fúngica das folhas.

Termos de indexação: DGGE, diversidade microbiana, anelamento, comunidade fúngica.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 516 milhões de hectares de florestas naturais e plantadas, o que corresponde, aproximadamente, a 60,7 % do seu território (BRASIL, 2010). Em sua maioria, as florestas plantadas distribuem-se nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, com aumento significativo no Maranhão, Tocantins, Piauí e Mato Grosso do Sul (ABRAF, 2012). O aumento da área plantada com eucalipto tem sido acompanhado de ganhos em produtividade em razão das novas tecnologias de manejo, do melhoramento genético do eucalipto e da produção clonal (BRASIL, 2010).

As folhas são habitat comum para vários micro-organismos. É possível que as populações microbianas em interação com essa região sejam importantes na manutenção do equilíbrio dos ciclos

biogeoquímicos, fluxos de gases, entre outros processos determinantes no ecossistema (Lindow & Brandl, 2003). Além disso, representa nicho com grande significado agrônomo e ambiental, sendo que os micro-organismos que nela habitam podem afetar a adaptabilidade de populações de plantas, além da qualidade e produtividade das culturas (Rasche et al., 2006).

A investigação da diversidade fúngica na parte aérea das plantas pode ser realizada com o uso do DNA total da microbiota, extraído diretamente do ambiente, e seu processamento por técnicas de eletroforese (Clegg, 2006). Estudos com o emprego dessas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da estrutura da comunidade fúngica, proporcionando novas perspectivas e avanços em estudos ecológicos (Hoshino & Matsumoto 2007). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do fluxo de fotoassimilados para as raízes sobre a diversidade de fungos da parte aérea das plantas de *Eucalyptus urograndis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área e delimitação do Experimento

O trabalho foi realizado em áreas cultivadas com *Eucalyptus urograndis* pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), situadas nos municípios de Santa Bárbara e Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. O experimento foi instalado em dois blocos de plantas, o primeiro contendo árvores com 18 meses de idade e o segundo contendo plantas com 72 meses de desenvolvimento. Em ambos os blocos foram delimitadas duas áreas, a do tratamento controle e a com árvores aneladas. As áreas com 81 m² foram delimitadas na porção central dos talhões da floresta de eucalipto, estabelecida com espaçamento de 3 metros.

Amostragem das folhas

As folhas foram coletadas em 3 partes iguais das copas das árvores, nos terços superior, médio e inferior, e, em cada um desses terços, nas regiões proximal, média e distal. O material vegetal

amostrado foi acondicionado em caixas contendo gelo e armazenados em freezer a - 20° C para análises posteriores.

Extração do DNA da seiva e das folhas

A comunidade fúngica das folhas de eucalipto foi obtida pela desinfestação das mesmas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com lavagem em soluções ácidas, hipoclorito de sódio, tampão fosfato, álcool 70 %, água destilada e detergente seguidas de enxague em água esterilizada. Essa etapa é importante para a retirada de sujidades presentes nas folhas. Para a extração de DNA total, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e o macerado adicionado em tubos de polipropileno contendo tampão de extração, *beads*, SDS e fenol-clorofórmio. Esses tubos foram submetidos à agitação em homogeneizador por 10 minutos e, após agitação, aquecidos em banho-maria a 60°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15000g e o sobrenadante transferido para tubos de polipropileno contendo 400 µL de fenol-clorofórmio, seguindo centrifugação por 5 minutos na velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para tubos contendo 60 % de isopropanol e centrifugado durante 20 minutos, na velocidade máxima. O pellet foi lavado com etanol 70%, secado ao ar e ressuspenso em 100 µL de água mili-Q esterilizada e o DNA quantificado (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc).

PCR-DGGE

Os genes rRNA 18S foram amplificados utilizando-se *primer* universal. Os amplicons referentes à primeira PCR foram utilizados como molde em uma segunda reação, na qual utilizou-se *primer* com grampo GC adicionado à extremidade 5`.

A análise da diversidade genética da comunidade fúngica das folhas foi realizada por Eletroforese em gel de Ggradiente Ddesnaturante (DGGE), "DCode™ Universal Mutation Detection System" (Bio-Rad – Califórnia USA), segundo recomendações do fabricante.

Análise Estatística

A análise estatística dos perfis de bandas dos géis obtidos por DGGE foi realizada com uso do software Bionumerics v.6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A Riqueza foi estimada tendo por base uma matriz binária na qual a presença de bandas no gel foi assumida como correspondentes a

unidades taxonômicas operacionais (UTOs), sendo a presença da banda codificada como um (1) e a ausência com zero (0). A estrutura da comunidade de fungos foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) utilizado para análise dos agrupamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por DGGE dos fragmentos do rDNA 18S mostrou a presença de diferentes UTOs de fungos nas folhas analisadas.

A análise de UPGMA revelou que os padrões dos perfis referentes às árvores aneladas e não aneladas em cada uma das áreas amostradas compartilham menos de 30 % de similaridade e formam grupos distintos (**Figura 1**). Esses resultados mostram a existência do efeito do anelamento das árvores sobre o perfil da comunidade fúngica presente em folhas de *Eucalyptus urograndis*.

O anelamento das árvores provocou mudanças no perfil da comunidade fúngica (**Figura 1**), com tendência de agrupamento das amostras coletadas nas árvores aneladas, com valores de similaridade maiores que 30 %. O efeito de anelamento foi maior nas árvores da área II (**Figura 1**), com 72 meses de idade. Durante a interrupção de fotoassimilados pelo anelamento, ocorre aumento das concentrações de amido e açúcares nas folhas (De Schepper & Steppe, 2011), fontes de carbono prontamente assimiláveis para a atividade da microbiota e composição da comunidade microbiana.

Os índices de diversidade de Shannon para a área I variaram 1,6 a 2,8 e os de riqueza entre 6 a 16. A área II, por sua vez, apresentou índices variando entre 1,6 e 2,9 e de riqueza entre 5 e 18 (**Figura 1**). Essas semelhanças entre os índices de diversidade e riqueza indicam que a idade das plantas não afetou a diversidade de fungos. Em solo cultivado com eucalipto Delvaux (2012) encontrou índices de diversidade de fungos variando entre 1,7 e 3,2. O grande aporte de nutrientes liberados no solo na forma de resíduos e exsudatos, que fazem desse habitat complexo e rico em diversidade (Yarwood et al., 2009; Barret, 2011), pode explicar essa diferença.

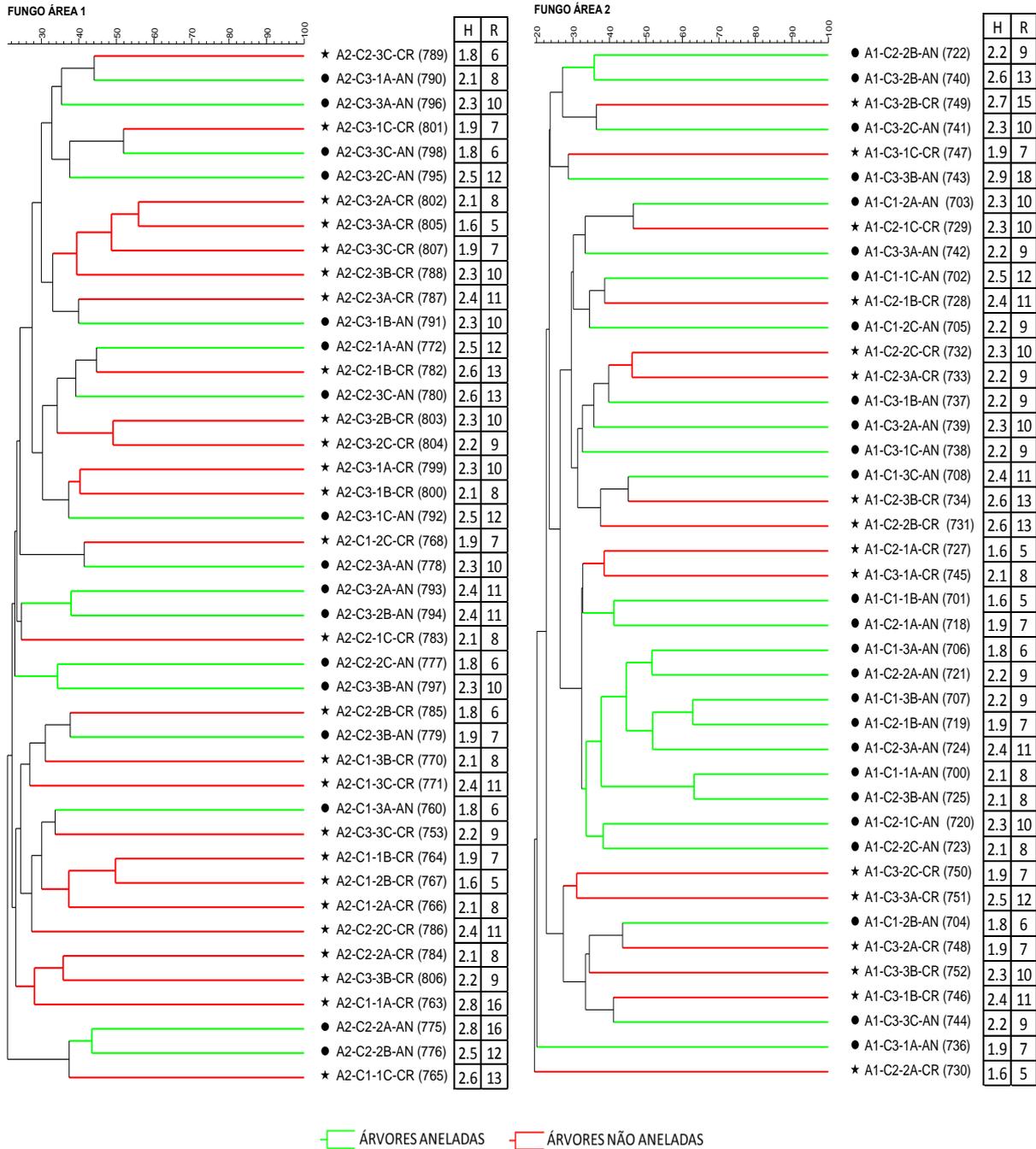


Figura 1: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 18S, índices de Diversidade de Shannon (H) e Riqueza de UTOs (R), detectados com base na separação de amplicons de comunidades de fungos presentes em folhas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; AN – Árvores Aneladas; CR –

CONCLUSÕES

Nas condições avaliadas, o anelamento das árvores de eucalipto exerce influência no perfil genético da comunidade fúngica presente nas folhas.

A idade da planta não afeta a diversidade de fungos presentes nas folhas de *Eucalyptus urograndis*.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA ABRAF: ano base 2010. Brasília, DF: ABRAF, 2012, 150p.

BARRET M.; MORRISSEY J. P.; O'GARA F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biology and Fertility of Soils*, 47:729–743, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Serviço Florestal Brasileiro de Florestas do Brasil em resumo – 2010: dados de 2005-2010./Serviço Florestal Brasileiro. Brasília: SFB, 2010. 152p.

CLEGG, C. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Applied Soil Ecology*, 31: 73- 82, 2006.

DELVAUX, J. C. Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral em Solos sob Florestas de Eucalipto em função do Anelamento das Árvores e Sazonalidade. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2012. 82f. (Dissertação de Mestrado).

DE SCHEPPER, V. & STEPPE, K. Tree girdling responses simulated by a water and carbon transport model. *Annals of Botany*. 108:1147–1154, 2011.

HOSHINO YT, MATSUMOTO N: Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. *Soil Science Plant Nutrition*, 53: 40–55, 2007.

LINDOW, S. E & BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1875–1883, 2003.

RASCHE F., KNAPP D., KAISER C., KORANDA M., KITZLER B., ZECHMEISTER-BOLTENSTERN S., RICHTER A. & SESSITSCH A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal

communities in soils of a temperate beech forest. *The ISME Journal*. 5:389-402, 2011.

YARWOOD S. A.; MYROLD D. D. & HÖGBERG M. N. Termination of belowground C allocation by trees alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*. 70: 151-162, 2009.