

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

MULTIPLICAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SISTEMAS DE CULTURA-ARMADILHA

¹ Juliana Weingartner Pernas (IC-UNIRIO); ² Orivaldo Saggin Júnior (pesquisador); ³ Camila Maistro Patreze (orientador).

1 - Departamento de Botânica; Instituto de Biociências; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Embrapa Agrobiologia; Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3 - Departamento de Botânica; Instituto de Biociências; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CAPES.

Palavras-chave: micorriza, cultura-isca, setária.

INTRODUÇÃO

O termo “micorriza” se refere à relação entre as raízes de plantas vasculares com diversos tipos de fungos onde é constatado o benefício mútuo entre os organismos. Estima-se que essa relação surgiu há mais de 400 milhões de anos (Schüßler et al., 2009) e contribuiu para a adaptação e crescimento das plantas terrestres e dos próprios fungos, onde a planta oferece substâncias energéticas ao fungo, que por sua vez, potencializa a absorção de nutrientes do solo à hospedeira. Dentre os tipos de micorrizas, o Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) é o mais disseminado e de maior importância econômica (Siqueira, 1994).

O fato de os FMAs dependerem da raiz metabolicamente ativa para o fornecimento de carboidratos impossibilita a manutenção desse organismo fora da planta hospedeira, formando um empecilho na manutenção das coleções, tanto de pesquisa como didática e limitação para o desenvolvimento de inoculantes comerciais. Uma alternativa é a multiplicação em vasos dos propágulos recolhidos no campo, processo chamado iscagem ou cultura-armadilha (Stutz e Morton, 1996). As plantas mais conhecidas com potencial de multiplicação de esporos dos FMA estão presentes nas Poaceae. Essa família possui uma representante que está sendo proposta como modelo para a biologia molecular: a *Setaria viridis* (Brutnell et al., 2010) para estudos envolvendo plantas de metabolismo C4. Esta espécie é uma planta originária das regiões mediterrâneas, que tem seu ciclo de vida rápido, pequeno porte, fácil reprodução e genoma relativamente pequeno (510 Mb), o que favorece o uso desta planta como modelo genético (Brutnell et al., 2010). *S. viridis* estabelece associações micorrízicas nas primeiras fases de crescimento (Boullard 1963). Os fungos *Glomus mosseae*, *G. coronatum* e *G. intraradices* colonizam *S. viridis* (Rinaudo et al. 2010). O estabelecimento da associação FMA-setária poderá ser útil para a compreensão genética e molecular de sinalização e desenvolvimento das associações micorrízicas em geral. O presente projeto visa estabelecer o cultivo de *S. viridis* e verificar a capacidade de inoculação por FMAs.

OBJETIVO

Esse projeto visa à padronização do sistema de cultura-armadilha no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Fungos da UNIRIO, usando a espécie vegetal *S. viridis* inoculada com o fungo micorrízico *G. clarum*. Este estudo objetiva dar suporte a outros projetos para multiplicação de esporos provenientes de amostras ambientais e futuramente, estudos moleculares sobre a interação planta-FMAs.

METODOLOGIA

Antes de iniciar o experimento, foi necessário realizar a quebra de dormência das sementes de *S. viridis*. Este procedimento consistiu em deixar as sementes descascadas embebidas em água destilada, dentro de uma placa de petri com papel filtro umedecido, durante duas semanas em geladeira. Após a quebra de dormência, as sementes foram germinadas em dois sistemas de cultivo: (A) em condições controladas em incubadora (EletoLab EL 202/4) e (B) em condições ambientais (casa de vegetação). No sistema A, as sementes foram germinadas em substrato comercial e cultivadas em tubos de ensaios contendo o mesmo substrato, previamente autoclavados. Na casa de vegetação (B), as sementes foram germinadas em tubetes contendo solo argiloso padrão utilizado para cultivo armadilha usando a planta capim brizantão pelo Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia.

Em ambos os sistemas, houve a inoculação de FMAs com 14 dias após a semeadura, e inoculação do substrato do inóculo filtrado no tratamento controle, visando introduzir a microbiota do inóculo neste tratamento. No sistema A, a temperatura e o fotoperíodo foram controlados, sendo admitida uma variação de 20°C a 25 °C; e tendo 16h de luz/8h de escuro. Houve a inoculação de apenas uma espécie de FMA (*Glomus clarum*), já reportada como associativa com *S. viridis*. Esta inoculação consistiu em 2g de inóculo, contendo aproximadamente 132 esporos. No sistema B, dez espécies provenientes da coleção de FMAs da Embrapa Agrobiologia foram testadas, sendo elas: *Acaulospora leavis*, *A. morrowiae*, *A. delicata*, *Glomus etunicatum*, *Kuklospora colombiana*, *K. spinosa*, *Scutellospora gregaria*, *S. heterogama*, *S. pellucida* e *Gigaspora calospora*.

Após o desenvolvimento das plantas e término do experimento, o substrato de cada planta foi separado para extração de esporos pelo método de peneiramento via úmida (Gerdeman e Nicolson 1963), seguido de centrifugação em gradiente de sacarose 50% (Lopes et al. 1983); depositados em frascos de vidro com água e mantidos sob refrigeração até o momento da montagem das lâminas. As raízes foram fixadas e coradas segundo o método Philips e Hayman. (1970); Abbot e Robson(1981), com algumas modificações.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RESULTADOS

O experimento em incubadora resultou em 50% de germinação e foi finalizado quando as plantas completaram 66 dias após semeadura. Em casa de vegetação, o término do experimento ocorreu aos 52 dias. No experimento em incubadora, com condições controladas, as plantas cresceram atingindo alturas entre 10cm e 15cm (Figura 1a). Em contrapartida, na casa de vegetação, o padrão observado para todos os tratamentos com diferentes espécies de FMAs e plantas controle (não inoculadas) foi um crescimento lento, de até 5cm do eixo principal da planta (Figura 1b). Desta maneira, foi perceptível que as condições padrão em casa de vegetação adotada para cultivo armadilha com capim brizantão não são adequadas para *S. viridis*. Segundo Holm et al. (1991), a altura da *S. viridis* pode variar de 10cm até 100cm, dependendo das suas condições de crescimento.



Figura 1. (A) Plantas de *S. viridis* no sistema A (incubadora), (B) Plantas de *S. viridis* na casa de vegetação da EMBRAPA.

Em fotoperíodos mais longos, a *S. viridis* tem apresentado ciclo de vida mais lento, levando mais tempo para florescer, sendo 62 dias com fotoperíodo de 16h e 64 dias com fotoperíodo de 20h, sendo que o florescimento ocorre em 28 dias com fotoperíodo de 8 horas (Halvorson 2003). Por ser um experimento com FMAs, nós selecionamos o fotoperíodo longo (16h luz/8h escuro) com o objetivo de prolongar o ciclo de vida para aumentar a possibilidade de multiplicação dos esporos. Além disso, foram adicionadas lâmpadas fluorescentes tipo led, a fim de atingir 300 Lux.

No experimento A, as plantas apresentaram as folhas de aspecto saudável durante todo o ciclo vegetativo, tornando-se amareladas na fase de senescência (a partir do 28º dia). Neste experimento 90 plantas foram desenvolvidas, distribuindo-se entre os tratamentos (plantas controle não inoculadas e plantas inoculadas com *Glomus clarum*).

Nas raízes das plantas pôde ser observada a proliferação de hifas (Figura 2), mas estruturas como vesículas não se desenvolveram durante o experimento. A falta dessas estruturas pode estar associada com a riqueza nutricional do substrato comercial utilizado e o curto ciclo de vida da *S. viridis*. A contagem avaliando a multiplicação dos esporos foi baixa, com um número muito perto do que foi inoculado, contendo apenas 135 esporos.

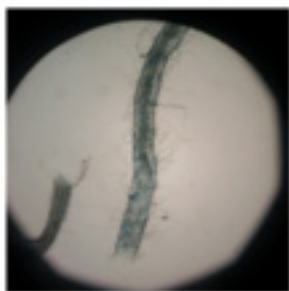


Figura 2. Raiz da *S. viridis* obtidas no experimento A, após coloração evidenciando hifas, vistas sob microscópio com aumento de 400x.

CONCLUSÃO

O experimento estabeleceu as condições ideais de crescimento da *S. viridis* no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Fungos da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, porém para a multiplicação satisfatória de esporos ainda se faz necessário a padronização das condições ideais do sistema setária-FMAs. A próxima etapa será o crescimento de plantas de *S. viridis* em incubadora, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade estabelecidas aqui, porém utilizando de uma nova composição de substrato, visando para favorecer o FMA e aumentar a taxa de multiplicação dos esporos.

REFERÊNCIAS

HOLM, L.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHÓ, J.; HERBERGER, J. New York: John Wiley & Sons, Inc; World weeds: natural histories and distribution. 1997.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- RINAUDO, V., BARBERI, P., GIOVANNETTI, M. e VAN DER HEIJDEN, M. Fungos micorrízicos eliminar ervas daninhas agrícolas agressivos. *planta eo solo* 333 : 7-20, 2010.
- BRUTNELL, T. ; SWARTWOOD, A. ; GOLDSCHMIDT, A.; JACKSON, D.; ZHU, X.; KELLOGG, E.; ECK, J. *Setaria viridis* as a model system to explore C4 photosynthetic differentiation, *The Plant Cell*, Vol. 22: 2537–2544 Nova York, 2013.
- STUTZ, J. C.; MORTON, J. B. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems, *Canadian Journal Botany*, v. 74, p. 1883-1889, 1996.
- BOULLARD, B. Les mycorrhizes des Graminées. *Journal Agric. Trop. Bot. Appl.* 10:411-437, 1963.
- SCHÜBLER, A. Glomales SSU rRNA gene diversity. *New Phytol.*, 144:205-207, 1999. SIQUEIRA, J.O., MAHMUD, A.W., HBBEL, D.H. Comportamento diferenciado de fungos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares em relação à acidez do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 10, p. 11-14, 1986.
- SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Editora UFLA. v. 6, p. 15-17, 2010.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Micorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. 1997.
- SOUZA, F.A. & SILVA, E.M.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In *Avanços em fundamentos e aplicação de micorriza UFLA/DCS e DCF*, Lavras, p.255-290, 1996.
- ABBOTT, L. K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 159, p. 69-78, 1994.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans Br Mycol Soc*, London, v.55, p.158-161, 1970.