

115

**Circular
Técnica**

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2009

Autores

Maria José Vilaça de
Vasconcelos, Farmacêu-
tica Bioquímica, PhD,
Pesquisadora da
Embrapa Milho e Sorgo
mjose@cnpmis.embrapa.br

Michel Castellani da
Rocha, Bioquímico,
MSc., Universidade
Federal de Viçosa

Glauco Vieira Miranda,
Engenheiro Agrônomo,
DSc., Professor Adjunto
da Universidade Federal
de Viçosa

Robert Eugene Schaffert,
Geneticista, PhD,
Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo



Metodologia de avaliação de exsudados radiculares em linhagens de sorgo submetidos ao estresse de fósforo

O sorgo é uma importante cultura do agronegócio nas regiões do Cerrado e do Nordeste do Brasil. Essa cultura apresenta uma grande variabilidade genética na absorção de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento. Uma das características da grande variabilidade é a absorção de fósforo em solos pobres neste elemento, como os de Cerrado brasileiro (SCHAFFERT et al., 2001). Durante o processo natural de sua evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação para uma gama de condições ambientais, o que resultou em uma extensa variabilidade genética para tolerância a diversos estresses (TUINSTRAN et al., 1997). As plantas apresentam vários mecanismos e processos que contribuem para o uso eficiente dos nutrientes que se encontram pouco disponíveis no solo. Esses mecanismos e processos estão relacionados com a expressão de características morfológicas e fisiológicas desejáveis (FAGERIA, 1998). A exsudação radicular de compostos orgânicos e a associação simbiótica com fungos micorrízicos são estratégias ligadas aos mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelas plantas para aumentar a absorção de fósforo (NAGAHASHI; DOUDS, 2000).

Dentro desse contexto, a associação dos fungos micorrízicos arbusculares (AM) com as plantas é uma das mais antigas e ecologicamente importantes relações simbióticas entre plantas superiores e microrganismos. Mas os mecanismos nos quais os fungos detectam a presença das plantas hospedeiras ainda é pobremente entendido. Estudos anteriores mostram que essas associações aumentam a absorção de nutrientes com pouca mobilidade na solução do solo, particularmente o fósforo, devido à exploração de um maior volume de solo, a solubilização de fosfatos orgânicos pelas fosfatases produzidas pelas hifas e a mobilização de fósforo inorgânico (YAO et al., 2001). Já para os exsudados radiculares de compostos orgânicos, existe uma considerável diferença na quantidade e na qualidade destes exsudados produzidos pelas raízes das plantas, havendo indicações de diversidade genética para a sua produção (CZARNOTA et al., 2003).

A rizosfera, zona restrita de solo imediatamente em torno do sistema radicular, é o ambiente em que as raízes estão ativamente em contato com o solo e microrganismos. Esse ambiente, criado e gerido pelas próprias raízes, é espacial e temporalmente heterogêneo devido à dinâmica, à complexidade e à biodiversidade do solo. As raízes não são manifestamente passivas para os organismos do solo, uma vez que os compostos secretados por elas

desempenham um importante papel de atraentes e de repelentes químicos na rizosfera (ESTABROOK; YODER, 1998; BAIS et al., 2006). Os produtos químicos secretados no solo pelas raízes são amplamente referidos como exsudatos radiculares.

Entre os compostos liberados pelas plantas como estratégias para adaptação em ambientes de baixo fósforo, estão os ácidos orgânicos, que possuem a capacidade de atuar favorecendo a solubilização de fósforo e as estrigolactonas, que são compostos sinalizadores para colonização de micorrizas (AKIYAMA et al., 2005).

Os compostos sinalizadores para colonização de fungos micorrízicos foram reportados por Hauck et al. (1992). Dentre eles, a sorgolactona, um composto da família das estrigolactonas, foi identificada pelos autores acima nos exsudados radiculares de sorgo. Foi demonstrado também que este exsudado possui um efeito estimulatório sobre o desenvolvimento de fungos arbusculo-micorrízicos (HAUCK et al., 1992). Dessa forma, acredita-se que o aumento da ramificação e do comprimento de hifas e a germinação de esporos são consequências fisiológicas dessa estimulação metabólica ocasionada pela ação da sorgolactona (BESSERER et al., 2006). Esses efeitos contribuem para o aumento da colonização das raízes, que exsudam maiores quantidades desse composto por fungos AM (NAGAHASHI; DOUDS, 2000). Entretanto, a sorgolactona também apresenta efeito sobre a germinação de sementes de *Striga*, uma planta parasítica muito comum em regiões da África e da Ásia e que ataca diversas culturas, como sorgo, milho e milheto (EJETA, 2007). Os genótipos de sorgo apresentam variação na quantidade e no tipo de estimulante

produzido (RICH et al., 2004) e os genótipos que produzem pouco ou nada dos compostos estimulantes da germinação têm se mostrado resistentes à *Striga* em campo (HESS et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi ajustar uma metodologia para crescimento das plantas e coleta de exsudados radiculares e posterior caracterização de linhagens de sorgo quanto à exsudação radicular de compostos produzidos quando cultivados sob estresse de fósforo.

Montagem do sistema de cultivo

O sistema consiste de um funil de Buchner, um Kitasato, lâ de vidro, um sistema de vácuo e cuidados especiais de assepsia. Para o preparo do sistema, deve-se lavar o funil de Buchner e secá-lo em estufa. Após retirar da estufa, vedar a parte inferior do funil com parafilme para evitar que os líquidos adicionados posteriormente à lâ de vidro passem para o Kitasato. Pesar 8 g de lâ de vidro em um béquer e transferir para cada um dos funis utilizados. Lavar o Kitasato, secar em estufa e montar o sistema adicionando o funil (vedado) sobre o Kitasato. No dia da transferência das sementes germinadas para o funil, deve-se adicionar à lâ de vidro 100 mL de água destilada. Durante o processo, deve-se tomar bastante cuidado com o manuseio da lâ de vidro, usando luvas, máscara e óculos de proteção individual, pois a lâ de vidro pode ferir as pessoas durante a sua manipulação.

Preparo das sementes, germinação e transferência

As sementes das linhagens de sorgo selecionadas deverão ser esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,525% v/v) por 5 minutos no agitador horizontal e enxaguadas oito vezes com água destilada estéril. Após a esterilização, as sementes são colocadas para germinar em placas de

Petri com o fundo coberto com um papel de filtro umedecido. Adicionar aproximadamente de 10 a 15 mL de água destilada por placa e levar para câmara de crescimento ou de germinação. Quando iniciar o processo de germinação, as sementes devem ser transferidas para o sistema de cultivo. Antes da transferência das sementes, o sistema deve ser previamente umedecido.

Crescimento das plântulas e coleta dos exsudados

A partir do dia da transferência das sementes, o sistema deverá permanecer coberto com parafilme até que as plântulas comecem a se desenvolver e a fixar as raízes na lâ de vidro, o que ocorrerá em aproximadamente três dias. Após a fixação das raízes na lâ de vidro, descobrir o sistema e adicionar 50 mL de solução nutritiva com fósforo ou sem fósforo (+ P ou -P). Deve-se acompanhar o desenvolvimento, atentando-se para a umidade da lâ, podendo borrifar uma quantidade de água igualmente para todos os sistemas para manter a umidade. A solução nutritiva deverá ser acrescentada de três em três dias até a véspera da coleta dos exsudados. 24 horas antes da coleta dos exsudados, deve-se retirar o parafilme que cobre a parte inferior do funil e lavar a lâ de vidro com 150 mL de água destilada, utilizando uma bomba de vácuo simultaneamente para retirar toda a água e a solução anteriormente adicionada. Após essa lavagem, vedar novamente o funil com parafilme e adicionar 50 mL de solução nutritiva (+ P ou -P). Após 24 horas, retirar o parafilme e lavar a lâ com 150 mL de água destilada com auxílio da bomba de vácuo. Do extrato transferido para o Kitasato, deve-se extrair os compostos radiculares liberados. Na Figura 1, pode-se ver o sistema de cultivo proposto para crescimento e coleta dos exsudados radiculares de plantas de sorgo.



Figura 1. Sistema de cultivo adaptado para crescimento e coleta dos exsudados radiculares das plantas de sorgo

Extração e separação de exsudados

Os exsudados radiculares são extraídos do meio aquoso por partição, utilizando funil de separação e acetato de etila. Após separação, a fase orgânica é recolhida e reservada. Esse procedimento deve ser repetido três vezes para a completa extração dos exsudados. Em seguida, reunir os extratos de acetato de etila, evaporá-los em evaporador rotativo com banho a 23° C, quantificados por pesagem para determinação de exsudados totais liberados em cada linhagem e estocados em freezer a -20° C para posterior identificação dos exsudados. Os extratos de cada linhagem foram dissolvidos em 3 mL de uma mistura água:acetoneitrila (AcN) (70:30, v/v) e separados em seis frações utilizando cartuchos C18 Mega Bond Elut (Varian) de 6 mL, usando gradiente de concentração de AcN como fase móvel (BESSERER et al., 2006). Os compostos presentes na fração 6 (onde foi encontrada sorgolactona por BESSERER et al., 2006) de cada linhagem foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) em cromatógrafo marca Shimadzu, modelo LC10A, utilizando coluna de fase reversa C18 Hypurity Elite (Hypersil) com 25 cm X 4,6 mm X 5 µm de diâmetro de poro.

A separação ocorreu por meio de um gradiente de 70:30 H₂O:AcN para 100% AcN em um fluxo constante de 600 µL

min⁻¹. Para evitar a formação de bolhas, foi necessário adaptar a metodologia de Besserer et al. (2006), aumentando o fluxo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ para 600 $\mu\text{L min}^{-1}$, o que resultou em redução do tempo de retenção. Devido ao fato de não se possuir o padrão de sorgolactona, realizou-se a separação dos compostos da fração 6 seguindo os procedimentos utilizados por Besserer et al. (2006), sendo alterado apenas o fluxo de eluição das amostras. Assim, com base no tempo de retenção do padrão de sorgolactona (40 minutos - Figura 2) e do perfil cromatográfico da fração 6 de amostra, encontrados por esse autor, identificou-se a região do cromatograma onde possivelmente se encontra a sorgolactona (35 min). Verificou-se que, devido ao maior fluxo utilizado nas análises dos tratamentos, houve uma diferença de 5 min na eluição dos compostos quando comparados com o encontrado por Besserer et al. (2006).

Após ajustar a metodologia e identificar a região onde se encontra a sorgolactona, foi preparada uma mistura teste (MT), com maior quantidade de exsudados, a partir de coletas realizadas em outro experimento executado nas mesmas condições citadas, porém utilizando quatro sistemas de cultivo e três coletas, em intervalos de 24 horas. A fração 6 dessa mistura foi aplicada no HPLC e uma alíquota foi coletada na região de 26 a 40 min para confirmação de sorgolactona em análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Conclusão

Esta metodologia se mostra eficaz para o crescimento de plantas e a coleta dos exsudados radiculares, podendo ser empregada rotineiramente nos programas de pesquisa que visam à identificação de exsudados radiculares para identificar genótipos de sorgo superiores e adaptados ao estresse de fósforo.

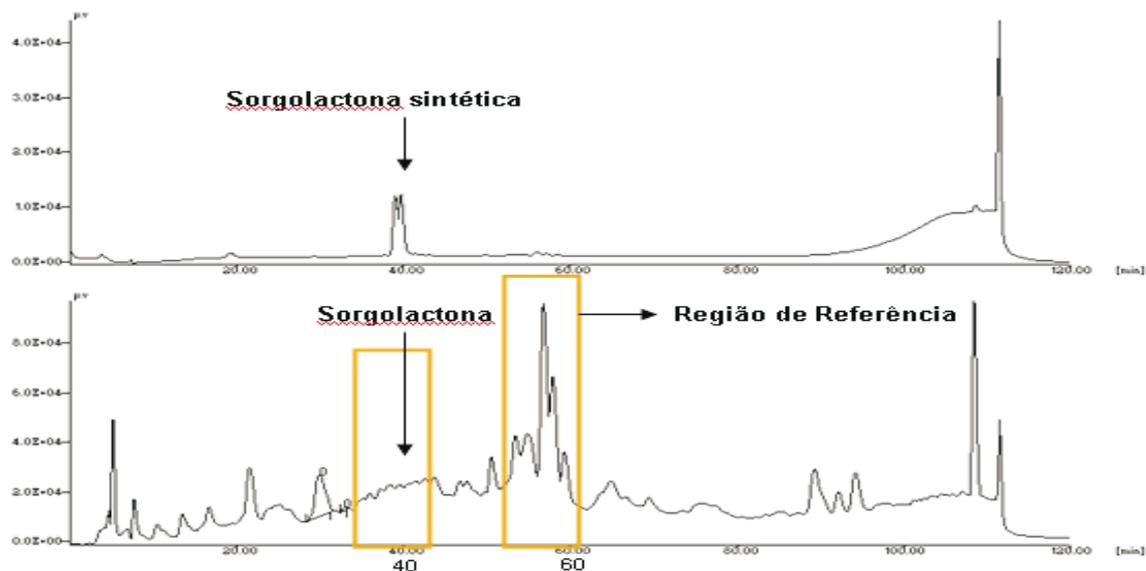


Figura 2. A - Perfil cromatográfico de análise em HPLC da sorgolactona sintética e da fração 6 de amostra encontradas por Besserer et al. (2006)

Referências

- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature, London*, v. 435, p. 824-827, 2005.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology, Palo Alto*, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BESSERER, A.; PUECH-PAGÈS, V.; KIEFER, P.; GOMEZ-ROLDAN, V.; JAUNEAU, A.; ROY, S.; PORTAIS, J. C.; ROUX, C.; BÉCARD, G.; SÉJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *Plos Biology, San Francisco*, v. 4, n. 7, p. 1239-1247, 2006.
- CZARNOTA, M. A.; RIMANDO, A. M.; WESTON, L. A. Evaluation of seven Sorghum (*Sorghum* sp.) accessions. *Journal of Chemical Ecology, New York*, v. 29, p. 2073-2083, 2003.
- ESTABROOK, E. M.; YODER, J. I. Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiology, Bethesda*, v. 116, p. 1-7, 1998.
- FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional das culturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental, Campina Grande*, v. 2, p. 6-16, 1998.
- EJETA, G. Breeding for *Striga* resistance in sorghum: exploitation of an intricate host-parasite biology. *Crop Science, Madison*, v. 47, n. 3, p. 216-227, 2007.
- HAUCK, C.; MÜLLER, S.; SCHILDKNECHT, H. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *Journal of Plant Physiology, Stuttgart*, v. 139, p. 474-478, 1992.
- HESS, D. E.; EJETA, G.; BUTLER, L. G. Selecting sorghum genotypes expressing a quantitative biosynthetic trait that confers resistance to *Striga*. *Phytochemistry, New York*, v. 31, p. 493-497, 1992.
- NAGAHASHI, G.; DOUDS, D. D. Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research, Cambridge*, v. 104, p. 1453-1464, 2002.
- RICH, P. J.; GRENIER, C.; EJETA, G. *Striga* resistance in the wild relatives of sorghum. *Crop Science, Madison*, v. 44, p. 2221-2229, 2004.
- SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; PITTA, G. V. E.; BAHIA FILHO, A. F. C.; SANTOS, F. G. Genetic variability in sorghum for P efficiency and responsiveness. In: INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM, 2001, Netherlands. *Plant nutrition: food security and sustainability of agro-ecosystems: proceedings*. Dordrecht: Kluwer, 2001. p. 72-73.
- TUINSTRRA, M. R.; GROTE, E. M.; GOLDSBROUGH, P. B.; EJETA, G. Genetic analysis of post-flowering drought tolerance and components of grain development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Molecular Breeding, Dordrecht*, v. 3, n. 6, p. 439-448, 1997.
- YAO, Q.; LI, X.; FENG, G.; CHRISTIE, P. Mobilization of sparingly soluble phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Soil, The Hague*, v. 230, p. 279-285, 2001.
- YOKOTA, T.; SAKAI, H.; OKUNO, K.; YONEYAMA, K.; TAKEUCHI, Y. Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry, New York*, v. 49, p. 1967-1973, 1998.

**Circular
Técnica, 115**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): 200 exemplares

**Comitê de
publicações**

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos
Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune
Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana
e Clenio Araujo

Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo
Normalização Bibliográfica: Rosângela L. de Castro
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa