

Avaliação de Linhagens de Sorgo Cultivadas em Estresse de Fósforo para a Liberação de Compostos Radiculares

Michel C. da Rocha¹, Glauco V. Miranda², Lidianne A. Silva³, Fabrício Rodrigues³, Geraldo A.C. Júnior³, Paulo E.A. Ribeiro⁴, Flavio D. Tardin⁵, José A. Rodrigues⁵, Maria J.V. Vasconcelos⁵ e Robert E. Schaffert⁵

¹Mestrando em Fitotecnia, UFV, e Bolsista Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, michelcastelani@yahoo.com.br, ²Professor Associado UFV, ³Bolsista Embrapa Milho e Sorgo, UFV, ⁴Analista Embrapa Milho e Sorgo, ⁵Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor*, estresse abiótico, morfologia de raiz, mecanismos de adaptação, aquisição de fósforo.

Durante o processo natural de evolução, as plantas de sorgo desenvolveram mecanismos de adaptação para uma gama de condições ambientais, resultando em uma extensa variação genética para tolerância a diversos estresses (Tuinstra et al., 1997). O sorgo, apesar de ser uma importante cultura do agronegócio nas regiões do cerrado e do nordeste, apresenta variabilidade na absorção de fósforo em solos pobres neste elemento.

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 associação simbiótica com fungos micorrízicos são estratégias ligadas aos mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelas plantas para aumentar a absorção de fósforo (Nagahashi et al., 2000). O aumento da absorção de nutrientes com pouca mobilidade na solução do solo, particularmente fósforo, devido às associações micorrízicas, ocorrem por meio da exploração de um maior volume de solo, da solubilização de fosfatos orgânicos pelas fosfatases produzidas pelas hifas e pela mobilização de fósforo inorgânico (Yao et al., 2001). Segundo Czarnota et al. (2003), existe considerável diferença na quantidade e na qualidade de exsudados produzidos pelas raízes de sorgo, havendo indicações de diversidade genética para a produção desses exsudados.

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).

A sorgolactona é uma estrigolactona que foi identificada nos exsudados radiculares de sorgo (Hauck et al., 1992) e possui grande efeito estimulatório sobre o desenvolvimento de fungos arbúsculo-micorrízicos (AM). Desta forma, acredita-se que o aumento da ramificação e do comprimento de hifas, e a germinação de esporos são conseqüências fisiológicas dessa estimulação metabólica ocasionada pela ação da sorgolactona (Besserer et al., 2006). Estes efeitos contribuem para o aumento da colonização das raízes que exsudam maiores quantidades deste composto por fungos AM (Nagahashi et al., 2000).

Os objetivos deste trabalho foram adaptar metodologia para crescimento das plantas e coleta de exsudados radiculares e caracterizar linhagens de sorgo quanto à exsudação radicular de compostos produzidos quando cultivadas em estresse de fósforo.

Foram avaliadas quatro linhagens de sorgo (L1, L2, L3 e L4), com três repetições, crescidas em sistema de cultivo acrescido de solução nutritiva sem fonte de fósforo, em câmara de crescimento na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG. Oitenta sementes de cada linhagem de sorgo foram transferidas para cada um dos sistemas de cultivo formado por um funil de buchner de 15 cm de diâmetro esterilizado contendo lã de vidro umedecida com 100 mL de água destilada, sendo este funil encaixado em um kitasato de 500 mL. Os exsudados foram coletados aos 14, 15 e 16 dias de cultivo, em intervalos de 24 horas. Para coleta, a lã de vidro foi lavada com 150 mL de água destilada e, com auxílio de uma bomba de vácuo, o extrato foi transferido para o kitasato.

Os exsudados radiculares foram extraídos do meio aquoso por partição, utilizando 50 mL de acetato de etila. Após agitação e separação, a fase orgânica foi recolhida e reservada. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, os três extratos de acetato de etila foram reunidos, evaporados em evaporador rotativo com banho a 23 °C e estocados em freezer a -20 °C. Em seguida, os exsudados totais dos dias 14, 15 e 16 foram dissolvidos em acetonitrila, misturados, evaporados e quantificados por pesagem para determinação de exsudados totais liberados por cada linhagem. Os extratos de cada linhagem foram dissolvidos em 3 mL de uma mistura água:acetonitrila (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 de cada linhagem foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) em cromatógrafo marca Shimatzu, 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. Foi necessário adaptar a metodologia de Besserer, aumentando o fluxo de 200 µL/min para 600 µL/min para evitar a formação de bolhas, o que resultou em redução do tempo de retenção. Devido ao fato de não se possuir o padrão de sorgolactona, realizou-se os procedimentos de separação 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) e do perfil cromatográfico da fração 6 de amostra, encontrados por este autor, identificou-se a região do cromatograma onde possivelmente se encontra a sorgolactona nas frações 6 das amostras (35 minutos). Com isto, verificou-se que devido ao maior fluxo utilizado nas análises dos tratamentos, houve uma diferença de 5 minutos na eluição dos compostos quando comparados com o encontrado por Besserer et al. (2006).

Depois de identificar esta região, 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 4 repetições e 3 coletas, em intervalos de 24 horas. A fração 6 desta MT foi aplicada no HPLC e uma alíquota foi coletada na região de 26 a 40 minutos para tentativa de confirmação de sorgolactona em análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Em seguida, 5 µL desta alíquota da MT e das frações 6 dos tratamentos foram analisadas em cromatógrafo a gás da marca Shimatzu, modelo QP2010plus, acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS). As amostras, de cada linhagem, foram secas em rotavapor e diluídas para 3 mL de acetonitrila, sendo que destes foi injetado 5 µL em uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm) utilizando gás hélio como carreador. A temperatura inicial da

coluna foi de 130 °C nos primeiros 1,5 min, elevada para 270 °C em uma taxa de 16 °C por min, permanecendo nesta temperatura por 5 min.

Pode-se verificar que houve diferenças significativas entre os valores de exsudados totais liberados pelas plantas de sorgo cultivadas em estresse de fósforo (Figura 1). Das quatro linhagens estudadas, a L1 foi a que apresentou maiores quantidades de exsudados totais, sendo que ela foi 2,8 vezes maior que a L3, que menos exsudou. Isto indica que há diferenças nas respostas fisiológicas das linhagens de sorgo estudadas quando cultivadas em estresse de fósforo, confirmando, portanto, que há variabilidade genética para a exsudação de compostos em sorgo cultivado em estresse de fósforo, conforme observado também por Czarnota et al. (2003).

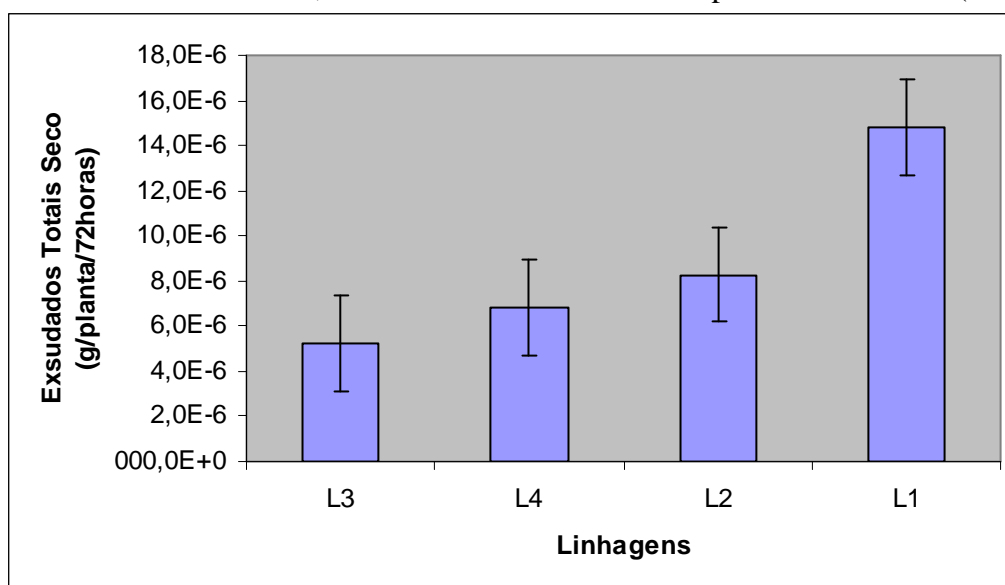


Figura 1 – Quantidade de exsudados totais liberados por plantas de sorgo aos 14, 15 e 16 dias de cultivo (72 horas) em estresse de fósforo. As diferenças nas repostas fisiológicas apresentadas pelas linhagens são evidentes pela superior quantidade de exsudados totais apresentadas pela L1 sobre as demais.

A análise dos compostos separados pela cromatografia gasosa da alíquota coletada no tempo de 26 a 40 minutos da MT (analisada em HPLC) e das linhagens cultivadas em estresse de fósforo pelo espectrômetro de massas nos indicou um pico na região eluída no tempo de 6,8 minutos como provavelmente um fragmento de estrigolactona. O espectro de massas do composto eluído neste tempo apresentou um pico molecular 97 m/z de intensidade de 30 %, indicando a possibilidade de presença de um fragmento estável (anel D) presente nas estrigolactonas. As moléculas de estrigolactonas apresentam uma fácil hidrólise da ligação dos anéis C e D (Akiyama et al., 2005) sendo a alta temperatura usada no processo de separação por cromatografia gasosa capaz de fragmentar essas moléculas de estrigolactonas. Como o anel D possui considerável estabilidade, pode ser identificado em GC/MS (Yokota et al., 1998).

Com base na intensidade dos picos no tempo de 6,8 minutos verifica-se que houve diferenças na quantidade encontrada do composto eluído neste tempo para as linhagens de sorgo. A L1 foi a que apresentou maior quantidade do composto sendo, entretanto, pouco superior a L2. A L3 apresentou quantidades um pouco menor, mas ainda assim, superior a L4, que apresentou uma quantidade eluída tão pequena que o sistema de cromatografia não foi capaz de integrar o seu pico cromatográfico. Segundo Rich et al., (2004) a L4 é tolerante a *Striga*, uma daninha

parasítica muito comum nas regiões da África e que apresentam germinação estimulada pela liberação de estrigolactonas (Besserer et al., 2006). Assim, era esperado que esta linhagem produzisse pouca ou nenhuma estrigolactona, o que condiz com o encontrado para o composto eluído no tempo de 6,8 minutos, aumentando assim a probabilidade deste composto ser o fragmento de estrigolactonas. Trabalhos realizados na Embrapa Milho e Sorgo mostram que linhagens de sorgo apresentam colonização por micorrizas de forma diferenciada, indicando uma variação na liberação dos compostos sinalizadores (estrigolactonas) em sorgo cultivados em estresse de fósforo (comunicação pessoal).

A metodologia adaptada se mostra eficaz para o crescimento das plantas e coleta dos exsudados radiculares de plantas de sorgo, podendo ser empregada rotineiramente nos programas de pesquisa e melhoramento. A L1 apresenta-se superior as outras três linhagens testadas em relação à exsudação total de compostos, indicando a existência de resposta fisiológica diferenciada entre estas linhagens quando cultivadas em estresse de fósforo. Para a caracterização e quantificação das estrigolactonas presente nos exsudados radiculares de sorgo é fundamental a utilização de compostos purificados como padrões nas análises cromatográficas. Os resultados obtidos em cromatografia gasosa indicam a existência de variabilidade genética entre as linhagens de sorgo cultivadas em estresse de fósforo para exsudação de compostos relatados como sinalizadores (estrigolactonas) para a colonização de fungos micorrízicos.

Referências Bibliográficas:

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature** 435: 824-827.

Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, et al. (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. **PLoS Biology** 4(7): e226.DOI: 10.1371/journal.pbio.0040226.

Czarnota MA, Rimando AM, Weston LA (2003) Evaluation of seven Sorghum (*Sorghum sp.*) accessions. **Journal Chemical Ecology** 29:2073-2083.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 2, p. 6-16, 1998.

Hauck C, Müller S, Schildknecht H (1992) A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. **Journal of Plant Physiology** 139: 474-478.

Nagahashi G, Douds DD (2000) Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. **Mycological Research** 104: 1453-1464.

Rich PJ, Grenier C, Ejeta G (2004) *Striga* resistance in the wild relatives of sorghum. **Crop Science**. 44:2221–2229.

Tuinstra MR, Grote EM, Goldsbrough PB, Ejeta G (1997) Genetic analysis of post-flowering drought tolerance and components of grain development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

Molecular Breeding V3, N6, 439-448.

Yao Q, Li X, Feng G, Christie P (2001) Mobilization of sparingly soluble phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Soil** 230: 279–285.

Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y (1998) Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. **Phytochemistry** 49: 1967–1973.