

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBSCULARES ASSOCIADOS A CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DE SOLO

Fabiana Iurk de Souza¹, Sabrina Pariz², Raíssa Fernanda Matias³, Mariane Castardo Araujo⁴, Edneia Aparecida de Souza Paccola⁵, Fracielli Gasparotto⁶

¹Acadêmica do Curso de Agronomia, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- UniCesumar. fabianayurk7@gmail.com

^{2,3}Acadêmicas do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. sa_pariz@hotmail.com, raissa.feernanda@hotmail.com

⁴Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. castardomari96@gmail.com

⁵Coorientadora, ⁶Orientadora, Professoras Doutoradas do Curso de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR. Pesquisadoras do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. edneia.paccola@unicesumar.edu.br, fracielli.gasparotto@unicesumar.edu.br

RESUMO

O emprego de práticas conservacionistas auxilia na manutenção da estrutura do solo, conserva a água, reduz os riscos de erosão e flutuações na temperatura, além de melhorar a qualidade do solo. Mudanças nas práticas de manejo podem acarretar alterações na população de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), influenciar na saúde do solo e na produção agrícola. Desta forma, objetiva-se avaliar a diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares associados às raízes da cultura de cana-de-açúcar submetida ou não ao sistema de terraceamento do solo. A pesquisa será desenvolvida em megaparcels instaladas no município de Atalaia, onde está sendo cultivada cana-de-açúcar, com e sem terraços. Serão coletadas amostras de raízes das plantas de cana-de-açúcar em 15 pontos distintos por megaparcels, distribuídos em grid e georreferenciados. Serão utilizadas 50 mg de raízes para extração do DNA. Após a extração serão realizadas diluições para realização da reação de polimerase em cadeia. O DNA ribossomal da região ITS será amplificado por um termociclador e os produtos obtidos serão separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Então serão verificadas as correspondências entre o padrão de bandamento de DNA dos FMAs que colonizavam as raízes em áreas com terraço e sem terraço. Espera-se determinar o impacto da retirada de terraços de áreas de cultivo agrícola sob a população de fungos micorrízicos arbusculares associados as culturas de cana-de-açúcar na Mesorregião Noroeste do Paraná.

PALAVRAS-CHAVE: Sustentabilidade Agrícola; Simbiose; Terraços.

1 INTRODUÇÃO

O solo é um recurso natural complexo e heterogêneo, essencial à manutenção do meio ambiente e ecossistemas, é formado a partir de um material semiconsolidado oriundo do processo de intemperismo físico, químico e biológico sofrido pelas rochas. Este desempenha funções ecológicas, como por exemplo o acúmulo da energia solar na forma de matéria orgânica, reciclagem da água e nutrientes, suporte para o crescimento de inúmeras espécies da fauna e flora, regulador dos ciclos de elementos químicos, como carbono, nitrogênio, potássio, enxofre e fósforo, e matéria-prima para artefatos humanos (AHLAWAT et al., 2020).

Sarkar et al. (2020) apontam que um terço do solo da Terra apresenta condições severas de degradação relacionada a vários processos, por exemplo: a intensificação agrícola, a poluição do solo, a erosão do solo, e a má gestão de recursos e desertificação. Uma alternativa para monitorar estas alterações se dá por meio do acompanhamento da variação da população microbiana do solo, entre os organismos que podem ser avaliados destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares.

Estes organismos apresentam simbiose essencial para o crescimento das plantas, dando a planta acesso a nutrientes pouco solúveis e baixa difusão por meio de redes de hifas (FERROL et al., 2019). Quando associados as raízes das plantas, esses fungos proporcionam benefícios contribuindo com a nutrição de plantas, diminuindo o consumo de fertilizantes, promovendo maximização do equilíbrio ecológico, maior crescimento, aumento de produção, preservação ambiental, maior tolerância a estresses abióticos, melhor

potencial hídrico, respostas positivas a déficit hídrico (DURAZZINI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018). Estudos com esses microrganismos tem demonstrado seu uso na recuperação de áreas degradadas pela mineralização e recuperação de solos com forte erosões (CHAER et al., 2011), além do seu papel já conhecido em disponibilizar compostos nitrogenados às plantas em troca de fotoassimilados (DALL'AGNOL et al., 2017).

Desta forma, pesquisas que visem avaliar as mudanças na população de fungos micorrízicos desencadeadas por alterações nas práticas de manejo do solo, como a retirada dos terraços, em áreas produtivas agrícolas são de suma importância, visando verificar a qualidade dos solos e manter a sustentabilidade da produção agrícola e a saúde do solo. Assim, objetiva-se avaliar a diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares associados à raiz da cultura de cana-de-açúcar submetida ou não ao sistema de terraceamento do solo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDOS E AMOSTRAS

O projeto será desenvolvido em duas megaparcelas instaladas no município no município de Atalaia, onde está sendo cultivada cana-de-açúcar. A área experimental é composta por 2 megaparcelas de 2,0 ha cada sendo: Megaparcela I: Plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima e sem o emprego de práticas mecânicas de controle do escoamento (sem terraços) e Megaparcela II: Plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima, associado a práticas mecânicas de controle do escoamento (com terraços em nível).

Será realizada uma amostragem de raízes por meio da coleta de 15 pontos distintos por megaparcela, distribuídos em grid e georreferenciados. As amostras serão embaladas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de análises agronômicas (AgroLab) para processamento.

2.2 SELEÇÃO DAS RAÍZES E EXTRAÇÃO DE DNA

Serão selecionadas raízes, para, por meio da extração do DNA e amplificação com primers ITS, tentar obter correspondência entre o padrão de bandamento de DNA dos FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) que colonizavam as raízes em áreas com terraço e sem terraço.

Para isso serão utilizadas 50 mg de raízes colonizadas para extração do DNA de cada amostra, as raízes serão selecionadas em microscópio, sendo a colonização evidenciada pela presença de arbúsculos ou vesículas coradas em azul de tripano. Na seleção serão amostrados diferentes tipos de micélio interno (fino e grosso) e a presença de vesículas.

O DNA será extraído segundo metodologia proposta por Bonito et al. (1995), onde, para a retirada de água, as raízes serão centrifugadas a 12.000 g durante 1 minuto e então, maceradas em 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1M, pH 8,5). Ao extrato será adicionada a resina Chelex 100, a uma concentração final de 5% do volume do tampão de extração.

A mistura será homogeneizada em vórtex e então fervida em banho-maria por 15 minutos. Então, a resina e os fragmentos das raízes serão removidos por centrifugação a 12.000 g por 30 segundos, e o sobrenadante será então coletado e imediatamente utilizado ou armazenado a -20°C. Para a PCR serão realizadas diluições em série em água com concentrações de 1:10 a 1:10.000(vol:vol).

2.3 PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

A reação da PCR consistirá de 5 µL do extrato cru contendo DNA das raízes, adicionados ao mix para um volume final de 50 µL. A concentração final na reação deverá ser de 125 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer, 7,5 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de Taq polimerase. Os primers ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') serão utilizados combinados.

O DNA ribossomal da região ITS será amplificado por um termociclador, programado para 95°C por três minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 50°C para anelamento, 1 minuto a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final. Em todos os experimentos serão usados tratamentos-controle, em que nenhum DNA será adicionado. Todos os tubos e materiais utilizados na composição das soluções e nomanuseio serão previamente esterilizados.

Os produtos obtidos serão separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Os fragmentos de DNA resultantes serão visualizados mediante coloração com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se determinar o impacto da retirada de terraços de áreas de cultivo agrícola sob a população de fungos micorrízicos arbusculares associados a cultura de cana-de-açúcar na Mesorregião Noroeste do Paraná. E espera-se que ocorra maior diversidade de fungos micorrízicos arbusculares na área cultivada com cana-de-açúcar de forma sustentável, com terraços. Tal informação técnica e potencial incentivo à adoção do emprego de terraços como prática conservacionista nas propriedades rurais da Mesorregião Noroeste certamente contribuiriam para tornar a produção agrícola mais expressiva e sustentável.

REFERÊNCIAS

AHLAWAT, U.; ANU; SINGH, V. K.; SHARMA, V.; SHEKHAWAT, N.; RAI, R. K. Soil organic matter and its importance for soil health. **Food and Scientific reports**, v. 1, issue 10, 2020.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers Microbiology**, v.6, p.1-13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>. Acesso em: 19 Jul. 2021.

BONITO, R.D.; ELLIOT M.L.; DES JARDINS, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2809-2810, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2809-2810.1995>. Acesso em: 18 Jul. 2021.

CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq116>. Acesso em: 10 Jul. 2021.

DURAZZINI, A. M. S.; TEIXEIRA, M. A.; ADAMI, A. A. V. Quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo sob diferentes cultivos de cafeeiros.

Revista Agrogeoambiental, v. 8, n. 4, p. 83-91, 2016. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v8n42016923>. Acesso em: 19 jul. 2021.

FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>. Acesso em: 19 jul. 2021.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. de A. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. *Ciência Florestal*, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2018. Disponível em:
<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/31572>. Acesso em: 17 Jul. 2021.

SARKAR, D.; KAR, S. K.; CHATTOPADHYAY, A.; SHIKHA; RAKSHIT, A.; TRIPATHI, V. K.; DUBEY, P. K.; ABHILASH, P. C. Low input sustainable agriculture: A viable climate-smart option for boosting food production in a warming world. **Ecological Indicators**, v. 115, 106412, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106412>. Acesso em: 19 Jul. 2021.