

Altura de plantas de milho em diferentes métodos de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*

Marlo Markus Lopes⁽¹⁾; Luciano Zucuni Pes⁽²⁾; Lúcio de Paula Amaral⁽³⁾; Biane de Castro⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão (PPGAP); Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Santa Maria, Rio Grande do Sul; marlomarkus@hotmail.com; ⁽²⁾ Professor; PPGAP - Colégio Politécnico da UFSM; lucianopes@politecnico.ufsm.br; ⁽³⁾ Professor; Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Rurais da UFSM; amaralufsm@gmail.com; ⁽⁴⁾ Extensionista rural; Associação Rio-grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural/Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural (Emater/RS-Ascar); bianedecastro@gmail.com.

RESUMO: As bactérias diazotróficas possuem a capacidade de se associar com diversas espécies de Poaceae, fixando nitrogênio e aumentando a eficiência de utilização de fertilizantes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do emprego de diferentes métodos de inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* na altura das plantas de milho na fase de maturação dos grãos. O experimento foi conduzido em Cruzeiro do Sul – RS com a semeadura mecanizada do híbrido Velox TL[®] de ciclo superprecoce, na safra 2015/2016, mediante a inoculação direta das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); controle, com aplicação de nitrogênio e sem inoculação (T2) e inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T3). O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (inoculação de sementes, sem inoculação e aplicação dirigida no sulco) e zonas de relevo (alta, média e baixa), com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. A inoculação dirigida no sulco e o tratamento de sementes proporcionaram, alturas médias de plantas de 236,06 cm e 229,00 cm respectivamente, superiores às plantas do tratamento controle, que obtiveram apenas 207,56 cm de altura. Não houve influência do relevo na altura média final das plantas. A inoculação das sementes de milho com *A. brasilense*, tanto por meio do método de aplicação dirigida no sulco, como pelo tratamento de sementes, favorece a altura média final das plantas.

Termos de indexação: bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP); nitrogênio; pulverizador de inoculação dirigida.

INTRODUÇÃO

A produção de milho (*Zea mays* L., Poaceae) durante a safra 2000/2001 no RS foi de 6.134.207 t em 1.672.923 ha, com rendimento médio de 3,67 t ha⁻¹. Na safra 2013/2014, foram colhidas 5.389.520 t de milho, em uma área de somente 924.363 ha, evidenciando a redução da área plantada e o aumento da produtividade, alcançando o rendimento médio da ordem de 5,83 t ha⁻¹ (IBGE, 2016).

O milho é uma espécie diplóide e alógama, sendo um dos vegetais superiores mais estudados (GUIMARÃES, 2007). Devido ao alto custo dos fertilizantes industrializados e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente, existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), as quais também podem incrementar a produtividade. As BPCP *Azospirillum brasilense* são endofíticas facultativas (HUERGO et al., 2008), denominadas diazotróficas ou fixadoras de N₂ por aportarem nitrogênio às plantas via fixação biológica e aumentarem a eficiência de utilização dos fertilizantes. Associam-se em diferentes graus de especificidade às espécies de Poaceae e Fabaceae, como ocorre, respectivamente, com o milho e a soja, o que representa uma estratégia viável economicamente para essas culturas, além dos benefícios ambientais associados à redução do uso de fertilizantes (HUNGRIA et al., 2015).

Para o sucesso da inoculação destas bactérias, é importante a escolha de genótipos adaptados às condições locais e propensos à colonização. Além da concentração de microrganismos no inoculante, a forma de inoculação também pode interferir na resposta

destes tipos de bactérias benéficas. As BPCP necessitam de um acondicionamento ideal para a sobrevivência das colônias, de modo a garantir um número de microrganismos viáveis e propiciar que ocorra de forma satisfatória a colonização nos tecidos das plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Desse modo, a utilização de pulverizadores de inoculação dirigida é uma ferramenta mecanizada para esse processo, que proporciona um acondicionamento favorável para a manutenção da viabilidade dos insumos biológicos e a dinamização dos processos de aplicação destes insumos (DENARDIN, 2006; PINHEIRO et al., 2013). Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do emprego de diferentes métodos de inoculação de BPCP *A. brasilense* na altura final das plantas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma lavoura comercial de milho de 2,5 ha no município de Cruzeiro do Sul – RS, na safra 2015/2016. O solo predominante da região é classificado como Chernossolo Háptico Órtico típico (STRECK et al., 2008).

A variedade híbrida de milho Velox TL[®] (Syngenta) de ciclo superprecoce foi semeada, em sistema de plantio direto, no dia 09 de agosto de 2015, com espaçamento de 0,80 m x 0,21 m, totalizando uma densidade de 75.000 plantas ha⁻¹. Os tratamentos foram constituídos por inoculação direta das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); controle com a aplicação de nitrogênio e sem a realização de inoculação (T2); e inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T3).

A fertilização da área foi realizada de acordo com as recomendações do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Foram aplicados 280 kg ha⁻¹ da fórmula NPK 9-25-15 na adubação de base e 350 kg ha⁻¹ de ureia (45% de N) na adubação de cobertura do milho, durante o estágio fenológico vegetativo de seis folhas desenvolvidas (V6).

Foi utilizado o inoculante comercial da marca Simbiose[®], composto pelas cepas Ab-V5 e Ab-V6 de BPCP *A. brasilense*, produto apresentado na concentração de 5x10⁸ células por mL e inoculado na mesma data da semeadura. Para a inoculação direta das sementes (T1), foram aplicados 100 ml ha⁻¹ do inoculante comercial, distribuídos de maneira uniforme às sementes. Para a realização da inoculação dirigida no sulco (T3), foi utilizada uma concentração quatro vezes maior do que a concentração empregada na inoculação direta

das sementes (T1), correspondendo a 400 ml ha⁻¹ aplicados diretamente no sulco de semeadura. O equipamento utilizado para realizar a inoculação dirigida no sulco (T3) foi o pulverizador de inoculação H₃M KSP 250[®], que contém um tanque com capacidade para 250 l de volume de calda. A aplicação da calda foi fracionada à dose de 20 l ha⁻¹ em oito linhas de semeadura.

Foram coletados 27 pontos amostrais no centro de cada repetição dos respectivos tratamentos e aferidos com trena métrica a altura das plantas, compreendida pela medida entre a superfície do solo e a inserção da panícula superior, na fase de maturação dos grãos, em 29 de dezembro de 2015. Nesses pontos também foram registradas as coordenadas geográficas, através do aplicativo CR Campeiro - C7 GPS Dados, sendo classificadas as zonas de relevo em: alta (Z3), compreendida entre 82 m a 98 m de altitude; média (Z1), de 87 m a 102 m de altitude; e baixa (Z2), com valores entre 86 m e 101 m de altitude.

O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (inoculação das sementes, sem inoculação e aplicação dirigida no sulco) e zonas de relevo (alta, média e baixa), com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no caso de diferença significativa. As análises estatísticas, precedidas dos testes de homogeneidade de variâncias de Bartlett e de normalidade de Shapiro-Wilk, aos quais os dados atenderam, foram realizadas com o uso do programa estatístico Assistat 7.7 Beta[®] (SILVA e AZEVEDO, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação dirigida no sulco (T3) e o tratamento de sementes (T1) proporcionaram, respectivamente, alturas médias de 236,06 cm e 229,00 cm (Tabela 1), superiores às plantas testemunha (T2) que obtiveram apenas 207,56 cm de altura (dms de 11,82 cm). Não houve influência significativa das zonas de relevo, bem como da interação entre os fatores avaliados na estatura final das plantas. Santos (2013) não detectou diferença no estande final das plantas de milho semeadas manualmente em Vitória da Conquista – BA, após a inoculação com outras bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae*, estirpe ZAE94) e isolados nativos, porém este parâmetro foi beneficiado pela adubação nitrogenada. Ao realizar semeadura manual, Mello (2012) também não verificou influência da inoculação de *A. brasilense*

na altura de plantas de milho na fase de maturação dos grãos em cultivo em Passo Fundo - RS, sendo influenciada apenas pelas doses de nitrogênio. O presente trabalho realizou a semeadura mecanizada, condição experimental que favorece a celeridade do processo de implantação, bem como pode ter propiciado condições térmicas mais favoráveis e de proteção das BPCP contra os raios ultravioletas, sendo indiferente se as sementes foram inoculadas pelo método tradicional ou dirigido no sulco.

Tabela 1. Altura das plantas de milho da cultivar Velox TL[®] semeadas em diferentes relevos e sistemas de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*.

Tratamento	Altura das Plantas de Milho (cm)	
	Método de Inoculação	Zonas de Relevo
T1 - inoculação da semente	236,05 a	228,28 ^{ns}
T2 - testemunha	207,55 b	218,72
T3 - inoculação dirigida no sulco	229,00 a	225,61

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Tukey.
^{ns} Não significativo na coluna.

Por outro lado, Quadros et al. (2014) inocularam com as BPCP *A. brasilense* e realizaram semeadura manual em Eldorado do Sul – RS, porém com o emprego do “saraquá”. Os autores detectaram que a inoculação aumentou o teor relativo de clorofila e o rendimento da matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, o peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e a estatura de planta do híbrido AS 1575. Foi sugerido que o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, sendo necessário o estudo de híbridos de milho que tenham boa resposta agrônômica à inoculação e que sejam feitas mais comparações em diferentes regiões edafoclimáticas, fatores que também afetam a relação entre a planta e as BPCP.

A semeadura mecanizada do híbrido Velox TL[®] de ciclo superprecoce submetido às condições edafoclimáticas de Cruzeiro do Sul e mediante a inoculação das sementes com *A. brasilense*, tanto por meio do método de aplicação dirigida no sulco como pelo tratamento de sementes, propiciaram maior altura das plantas na fase de maturação dos grãos, do que nas plantas em que não se adotou a inoculação. Assim, pode-se inferir que tanto o genótipo cultivado, como as metodologias de

aplicação do inoculante utilizadas e as condições edafoclimáticas foram favoráveis para o desenvolvimento das BPCP.

CONCLUSÕES

A inoculação com *A. brasilense* dirigida no sulco e no tratamento das sementes de milho híbrido superprecoce Velox TL[®], após semeadura mecanizada, proporcionou maior altura média final das plantas, quando comparadas ao manejo tradicional, sem a utilização de inoculação das sementes.

REFERÊNCIAS

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, Piracicaba, USP/ESALQ, v. 5, p. 35-37, 2006.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical Subtropical) – Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2007.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Córdoba, Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-28.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, p. 811-817, 2015.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contém informações sobre a produção de milho brasileira**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agrop/ecuaria/lspa/> >. Acesso em: 26 jun. 2016.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

PINHEIRO, M. S.; SOUZA, J. B.; FEITOZA, R. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Resistência de estirpes de rizóbios isoladas do Semiárido a elevadas temperaturas. In: Congresso Brasileiro do Feijão-caupi. 3., 2013. **Anais...** Recife: Instituto Agronômico de Pernambuco, 2013. Disponível em: < <http://www.conac2012.org/resumos/pdf/216b.pdf>>. Acesso em 30 de abril de 2016.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, R. F.; VIEIRA, P. M.; ROEHRS, V. D.; CAMARGO, D. O.; ANASTÁCIO, F. Desempenho agronômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

SANTOS, J. S. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho cultivados em Vitória da Conquista – BA**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2013.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, 2006. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS, 2004. 394 p.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.



Altura de plantas de milho em diferentes métodos de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*

Marlo Markus Lopes⁽¹⁾; Luciano Zucuni Pes⁽²⁾; Lúcio de Paula Amaral⁽³⁾; Biane de Castro⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão (PPGAP); Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Santa Maria, Rio Grande do Sul; marlomarkus@hotmail.com; ⁽²⁾ Professor; PPGAP - Colégio Politécnico da UFSM; lucianopes@politecnico.ufsm.br; ⁽³⁾ Professor; Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Rurais da UFSM; amaralufsm@gmail.com; ⁽⁴⁾ Extensionista rural; Associação Rio-grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural/Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural (Emater/RS-Ascar); bianedecastro@gmail.com.

RESUMO: O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do emprego de diferentes métodos de inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* na altura das plantas de milho na fase de maturação dos grãos em diferentes zonas de relevo. O experimento foi conduzido em Cruzeiro do Sul – RS com a semeadura mecanizada do híbrido Velox TL[®] de ciclo superprecoce, na safra 2015/2016, mediante a inoculação direta das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T2); controle com aplicação de nitrogênio e sem inoculação (T3). O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (inoculação de sementes, sem inoculação e aplicação dirigida no sulco) e distintas zonas de relevo, com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. A inoculação dirigida no sulco e o tratamento de sementes proporcionaram, alturas médias de plantas de 236,06 cm e 229,00 cm respectivamente, superiores às plantas do tratamento controle, que obtiveram apenas 207,56 cm de altura. Não houve influência do tipo de inoculação na quantidade de grãos por planta, nem o relevo para a altura final das plantas de milho. A inoculação das sementes de milho com *A. brasilense*, tanto por meio do método de aplicação dirigida no sulco, como pelo tratamento de sementes, favorece a altura média final das plantas.

Termos de indexação: bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP); nitrogênio; pulverizador de inoculação dirigida.

A produção de milho (*Zea mays* L., Poaceae) durante a safra 2000/2001 no RS foi de 6.134.207 t em 1.672.923 ha, com rendimento médio de 3,67 t ha⁻¹. Na safra 2013/2014, foram colhidas 5.389.520 t de milho, em uma área de somente 924.363 ha, evidenciando a redução da área plantada e o aumento da produtividade, alcançando o rendimento médio da ordem de 5,83 t ha⁻¹ (IBGE, 2016).

O milho é uma espécie diplóide e alógama, sendo um dos vegetais superiores mais estudados (GUIMARÃES, 2007). Devido ao alto custo dos fertilizantes industrializados e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente, existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), as quais também podem incrementar a produtividade. As BPCP *Azospirillum brasilense* são endofíticas facultativas (HUERGO et al., 2008), denominadas diazotróficas ou fixadoras de N₂ por aportarem nitrogênio às plantas via fixação biológica e aumentarem a eficiência de utilização dos fertilizantes. Associam-se em diferentes graus de especificidade às espécies de Poaceae e Fabaceae, como ocorre, respectivamente, com o milho e a soja, o que representa uma estratégia viável economicamente para essas culturas, além dos benefícios ambientais associados à redução do uso de fertilizantes (HUNGRIA et al., 2015).

Além da concentração de microrganismos no inoculante, a forma de inoculação também pode interferir na resposta destes tipos de bactérias benéficas. As BPCP necessitam de um acondicionamento ideal para a sobrevivência das colônias, de modo a garantir um número de microrganismos viáveis e propiciar que ocorra de forma satisfatória a colonização nos tecidos das

INTRODUÇÃO

plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Desse modo, a utilização de pulverizadores de inoculação dirigida é uma ferramenta mecanizada para esse processo, que proporciona um acondicionamento favorável para a manutenção da viabilidade dos insumos biológicos e a dinamização dos processos de aplicação destes insumos (DENARDIN, 2006; PINHEIRO et al., 2013). Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do emprego de diferentes métodos de inoculação de BPCP *A. brasilense* na altura final das plantas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma lavoura comercial de milho de 2,5 ha no município de Cruzeiro do Sul – RS, na safra 2015/2016. O solo predominante da região é classificado como Chernossolo Háplico Órtico típico (STRECK et al., 2008).

A variedade híbrida de milho Velox TL[®] (Syngenta) de ciclo superprecoce foi semeada, em sistema de plantio direto, no dia 09 de agosto de 2015, com espaçamento de 0,80 m x 0,21 m, totalizando uma densidade de 75.000 plantas ha⁻¹. Os tratamentos foram constituídos por inoculação direta das sementes e aplicação de nitrogênio (T1), controle com a aplicação de nitrogênio e sem a realização de inoculação, (T2); e inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio, (T3).

A fertilização da área foi realizada de acordo com as recomendações do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Foram aplicados 280 kg ha⁻¹ da fórmula NPK 9-25-15 na adubação de base e 350 kg ha⁻¹ de ureia (45% de N) na adubação de cobertura do milho, durante o estágio fenológico vegetativo de seis folhas desenvolvidas (V6).

Foi utilizado o inoculante comercial da marca Simbiose[®], composto pelas cepas Ab-V5 e Ab-V6 de BPCP *A. brasilense*, produto apresentado na concentração de 5x10⁸ células por mL e inoculado na mesma data da semeadura. Para a inoculação direta das sementes (T1), foram aplicados 100 ml ha⁻¹ do inoculante comercial, distribuídos de maneira uniforme às sementes. Para a realização da inoculação dirigida no sulco (T3), foi utilizada uma concentração quatro vezes maior do que a concentração empregada na inoculação direta das sementes (T1), correspondendo a 400 ml ha⁻¹ aplicados diretamente no sulco de semeadura. O equipamento utilizado para realizar a inoculação dirigida no sulco (T3) foi o pulverizador de inoculação H₃M KSP 250[®], que contém um tanque com capacidade para 250 l de volume de calda. A

aplicação da calda foi fracionada à dose de 20 l ha⁻¹ em oito linhas de semeadura.

Foram coletados 27 pontos amostrais no centro de cada repetição dos respectivos tratamentos e aferidos com trena métrica a altura das plantas, compreendida pela medida entre a superfície do solo e a inserção da panícula superior, na fase de maturação dos grãos, em 29 de dezembro de 2015. Nesses pontos também foram registradas as coordenadas geográficas, através do aplicativo CR Campeiro - C7 GPS Dados, sendo classificadas as zonas de relevo em: (Z1), de 87 m a 102 m de altitude; (Z2), com valores entre 86 m e 101 m de altitude; e (Z3), compreendida entre 82 m a 98 m de altitude. Com os pontos coletados em cada amostra conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Pontos coletados em cada amostragem das plantas de milho, com coordenadas geográficas de latitude sul e coordenadas geográficas de longitude oeste, com seus respectivos tratamentos.

O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (inoculação das sementes, sem inoculação e aplicação dirigida no sulco) e distintas zonas de relevo (Z1, Z2 e Z3), com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no caso de diferença significativa. As análises estatísticas, precedidas dos testes de homogeneidade de variâncias de Bartlett e de normalidade de Shapiro-Wilk, aos quais os dados atenderam, foram realizadas com o uso do programa estatístico Assistat 7.7 Beta® (SILVA e AZEVEDO, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação dirigida no sulco (T2) e o tratamento de sementes (T1) proporcionaram, respectivamente, alturas médias de 229,00 cm e 236,06 cm (Tabela 1), superiores às plantas testemunha (T3) que obtiveram apenas 207,56 cm de altura (dms de 11,82 cm). Não houve influência significativa das zonas de relevo, bem como da interação entre os fatores avaliados na estatura final das plantas. Santos (2013) não detectou diferença no estande final das plantas de milho semeadas manualmente em Vitória da Conquista – BA, após a inoculação com outras bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae*, estirpe ZAE94) e isolados nativos, porém este parâmetro foi beneficiado pela adubação nitrogenada. Ao realizar semeadura manual, Mello (2012) também não verificou influência da inoculação de *A. brasilense* na altura de plantas de milho na fase de maturação dos grãos em cultivo em Passo Fundo - RS, sendo influenciada apenas pelas doses de nitrogênio. O presente trabalho realizou a semeadura mecanizada, condição experimental que favorece a celeridade do processo de implantação, bem como pode ter propiciado condições térmicas mais favoráveis e de proteção das BPCP contra os raios ultravioletas, sendo indiferente se as sementes foram inoculadas pelo método tradicional ou dirigido no sulco.

Tabela 1. Altura das plantas de milho da cultivar Velox TL® semeadas em diferentes relevos e sistemas de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*.

Tratamento	Altura das Plantas de Milho (cm)	
	Método de Inoculação	Zonas de Relevo
T1 - inoculação da	236,05 a	228,28 ^{ns}

Tratamentos	Latitude(S)	Longitude(W)
T ₁ Z ₁ R ₁	29°29'45,39"	52°07'50,35"
T ₁ Z ₁ R ₂	29°29'46,68"	52°07'50,18"
T ₁ Z ₁ R ₃	29°29'52,68"	52°07'50,35"
T ₁ Z ₂ R ₁	29°29'53,32"	52°07'50,37"
T ₁ Z ₂ R ₂	29°29'53,90"	52°07'50,30"
T ₁ Z ₂ R ₃	29°29'62,03"	52°07'49,84"
T ₁ Z ₃ R ₁	29°29'62,66"	52°07'49,85"
T ₁ Z ₃ R ₂	29°29'62,67"	52°07'49,86"
T ₁ Z ₃ R ₃	29°49'63,35"	52°07'50,33"
T ₂ Z ₁ R ₁	29°49'45,18"	52°07'48,50"
T ₂ Z ₁ R ₂	29°49'46,30"	52°07'48,32"
T ₂ Z ₁ R ₃	29°49'47,43"	52°07'48,46"
T ₂ Z ₂ R ₁	29°49'54,62"	52°07'48,57"
T ₂ Z ₂ R ₂	29°49'56,44"	52°07'48,48"
T ₂ Z ₂ R ₃	29°49'57,51"	52°07'48,40"
T ₂ Z ₃ R ₁	29°49'63,34"	52°07'47,90"
T ₂ Z ₃ R ₂	29°49'65,14"	52°07'47,83"
T ₂ Z ₃ R ₃	29°49'66,20"	52°07'47,94"
T ₃ Z ₁ R ₁	29°49'45,86"	52°07'46,85"
T ₃ Z ₁ R ₂	29°49'46,37"	52°07'46,89"
T ₃ Z ₁ R ₃	29°49'47,41"	52°07'46,86"
T ₃ Z ₂ R ₁	29°49'53,95"	52°07'46,93"
T ₃ Z ₂ R ₂	29°49'54,11"	52°07'46,78"
T ₃ Z ₂ R ₃	29°49'55,43"	52°07'46,71"
T ₃ Z ₃ R ₁	29°49'62,96"	52°07'46,73"
T ₃ Z ₃ R ₂	29°49'63,48"	52°07'46,24"
T ₃ Z ₃ R ₃	29°49'63,65"	52°07'46,29"

semente

T2 - inoculação dirigida no sulco	229,00 a	225,61
T3 - testemunha	207,55 b	218,72

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Tukey.

^{ns} Não significativo na coluna.

Por outro lado, Quadros et al. (2014) inocularam com as BPCP *A. brasilense* e realizaram semeadura manual em Eldorado do Sul – RS, porém com o emprego do "saraquá". Os autores detectaram que a inoculação aumentou o teor relativo de clorofila e o rendimento da matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, o peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e a estatura de planta do híbrido AS 1575. Foi sugerido que o

genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, sendo necessário o estudo de híbridos de milho que tenham boa resposta agrônômica à inoculação e que sejam feitas mais comparações em diferentes regiões edafoclimáticas, fatores que também afetam a relação entre a planta e as BPCP.

Dados mundiais acumulados indicam que o *Azospirillum* é capaz de promover o rendimento de culturas agronomicamente importantes, em diferentes solos e regiões climáticas. Hormônios vegetais sintetizados por *Azospirillum* influenciam a planta na taxa de respiração, no metabolismo e na proliferação da raiz e, portanto, melhoram a absorção de minerais e de água em plantas inoculadas, contribuindo para uma maior estatura das plantas (OKON & ITZIGSOHN, 1995).

Experimentos comprovam a eficiência da inoculação com *A. brasilense*, como observado no trabalho conduzido por Barros Neto (2008) no qual a inoculação proporcionou aumento significativo no rendimento de grãos de milho de 9.021 kg ha⁻¹ para 9.814 kg ha⁻¹, ou seja, aumento médio de 9%.

Para a variável número de grãos por planta, o teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, $\chi^2_{calculado} (21,61410) < \chi^2_{tabulado} (15,50731; p. 0,05; gl 26)$, e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados não possuem normalidade, $W = 0,81519 (p.0,00025)$. Para esta variável não houve significância.

A semeadura mecanizada do híbrido Velox TL[®] de ciclo superprecoce submetido às condições edafoclimáticas de Cruzeiro do Sul e mediante a inoculação das sementes com *A. brasilense*, tanto por meio do método de aplicação dirigida no sulco como pelo tratamento de sementes, propiciaram maior altura das plantas na fase de maturação dos grãos, do que nas plantas em que não se adotou a inoculação.

CONCLUSÕES

A inoculação com *A. brasilense* dirigida no sulco e no tratamento das sementes de milho híbrido superprecoce Velox TL[®], após semeadura mecanizada, proporcionou maior altura média final das plantas, quando comparadas ao manejo tradicional, sem a utilização de inoculação das sementes. Não houve significância estatística para a variável número de grão por planta.

REFERÊNCIAS

BARROS NETO, C. R. de. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* no rendimento de grãos de milho.**

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná. 29p. 2008.

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, Piracicaba, USP/ESALQ, v. 5, p. 35-37, 2006.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais.** 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina.** Córdoba, Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-28.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, p. 811-817, 2015.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contém informações sobre a produção de milho brasileira.** Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/> >. Acesso em: 26 jun. 2016.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v.13, n.3 p.415- 424, 1995

PINHEIRO, M. S.; SOUZA, J. B.; FEITOZA, R. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Resistência de estirpes de rizóbios isoladas do Semiárido a elevadas temperaturas. In: Congresso Brasileiro do Feijão-caupi. 3., 2013. **Anais...** Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2013. Disponível em: <<http://www.conac2012.org/resumos/pdf/216b.pdf>>. Acesso em 30 de abril de 2016.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, R. F.; VIEIRA, P. M.; ROEHRS, V. D.; CAMARGO, D. O.; ANASTÁCIO, F. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

SANTOS, J. S. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho cultivados em Vitória da Conquista – BA.** 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2013.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, 2006. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** 10. ed. Porto Alegre: SBCS, 2004. 394 p.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul.** 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.



Análise “*in silico*” de genes de resistência ortólogos nos genomas de *Sorghum bicolor*, *Zea mays* e teosinto.

Ronaldo Omizolo de Souza⁽¹⁾; Isabella da Cruz Franco⁽¹⁾; Ramir Bavaresco Junior⁽¹⁾; Kamila Savala Pereira⁽¹⁾; Liliam Silvia Candido⁽²⁾; Rodrigo Matheus Pereira⁽²⁾.

⁽¹⁾ Graduando(a) em Biotecnologia; Universidade Federal da Grande Dourados; Dourados, MS; *ronaldo_omizolo@hotmail.com; ⁽²⁾ Professor(a) Adjunto; Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS;

RESUMO: Durante a domesticação da cultura do milho (*Zea mays* L.) pode ter ocorrido a transferência de genes de resistência (R) das espécies ancestrais e entre espécies aparentadas. Os genes R podem ser classificados em cinco classes, a CNL, TNL, RLP, RLK e outros. O objetivo deste trabalho foi identificar, *in silico*, genes R comuns entre a espécie *Zea mays* subsp. *mays* com *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Teosinto* e *Sorghum bicolor*. As sequências foram coletadas de bancos de dados biológicos e a análise foi realizada com o auxílio de ferramentas da bioinformática. No entanto, não foi possível encontrar o transcriptoma completo de todas as espécies nos bancos de dados biológicos consultados. Somente os transcriptomas do *Sorghum bicolor* e *Zea mays* subsp. *mays* foram obtidos integralmente. Para as outras duas espécies, foram utilizadas informações parciais encontradas no GenBank e no European Nucleotide Archive (ENA). Foi possível a identificação de 1085 genes R comuns entre o transcriptoma de *Zea mays* subsp. *mays* e as sequências utilizadas de cada uma das espécies. A comparação com o *Sorghum bicolor* retornou 930 genes R divididos em todas as classes. A comparação entre *Zea mays* subsp. *mays* e *Zea mays* subsp. *parviglumis*, possível ancestral do milho, totalizou 109 genes R comuns, enquanto que a análise com o *Teosinto* retornou 44 genes R. Também foram encontrados dois genes ortólogos entre todas as espécies. Assim, os resultados obtidos neste estudo poderão servir como base para futuros estudos sobre o compartilhamento de genes de resistência entre estas espécies.

Termos de indexação: Bioinformática, Gramíneas, Genômica, Milho, Sorgo, Teosinto.

INTRODUÇÃO

Há mais de 8000 anos o milho é cultivado em diversas partes do mundo e graças a sua adaptabilidade, representada por vários genótipos, pode ser cultivado desde o Equador até o limite das terras temperadas. Possui importância econômica, devido sua utilização para alimentação humana e animal (Barros & Calado, 2014).

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma *Poacea* originária da África, utilizado principalmente na alimentação animal, na cadeia produtiva da suinocultura e avicultura. Também pode ser utilizado para a fabricação de bebidas alcoólicas. (Purcino, 2011).

O sorgo é um parente próximo do milho (*Zea mays*) e da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) (Springer et al., 1989). Entre estes, o milho é o melhor caracterizado geneticamente, possuindo um mapa genético bem desenvolvido (Beavis & Grant 1991; Burr et al., 1988). O sorgo e o milho apresentam o mesmo número de cromossomos (n=10). Entretanto o milho contém, no mínimo, três vezes mais DNA nuclear do que o sorgo (Michaelson et al., 1991).

O milho é uma planta cultivada de grande versatilidade. Os programas de melhoramento genético vêm desenvolvendo ao longo das décadas tipos diversificados de cultivares, entre outras razões, devido a existência de alta variabilidade genética do germoplasma da espécie. Com o advento da biotecnologia foram desenvolvidas tecnologias que permitem acesso a novas e variadas fontes de variabilidade genética, além das existentes naturalmente. Em especial, é possível citar o aprimoramento da tecnologia do DNA recombinante e da bioinformática (Coulter, 2014; Oliveira, 2010).

Nos últimos 10 anos, o mapeamento comparativo entre espécies tem fornecido evidências para uma conservação importante de marcadores e a ordem de genes entre genomas similares, o que resultou no surgimento das técnicas

de comparação de genomas. Estudos comparativos realizados com gramíneas demonstraram consistência em relação à colinearidade entre os genomas dentro da família (Feuillet & Keller, 2002). A maioria destas análises foi realizada com gramíneas de importância econômica, como arroz, trigo, cevada, milho, milheto, aveia e o sorgo (Gale & Devos, 1998; Bennetzen, 2000; Keller & Feuillet, 2000).

A utilização de recursos aplicados à seleção de sequências de DNA unidos as técnicas de bioinformática tornaram-se um pré-requisito para construção de modelos teóricos e experimentais. (Saeys et al., 2007).

Alguns estudos indicam que algumas variedades de teosinto, possível ancestral de *Zea mays*, são citologicamente indistinguíveis do milho e, portanto, são capazes de formar híbridos completamente férteis com o milho (Doebley, 2004).

Vários trabalhos têm discutido e pesquisado as diferenças entre estas espécies, alguns com análises moleculares identificaram uma variação de teosinto (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) como o progenitor do milho (Doebley, 2004; Barros & Calado, 2014).

As plantas expressam genes de resistência (R) para reconhecer invasores e evitar a disseminação de agentes patogênicos. As plantas que não têm células imunológicas especializadas devem ser capazes de reconhecer de forma autônoma possíveis proteínas efetoras. Em resposta a proteínas efetoras liberadas por patógenos, as plantas necessitam manter um grande número de genes R que, direta ou indiretamente reconhecem os efetores e iniciam uma resposta efetiva de disparo de imunidade (ETI) (McDowell & Simon, 2008).

Os genes de resistência têm um importante papel para o reconhecimento de proteínas específicas, que são expressas por genes de avirulência (*Avr*) durante um possível ataque de micro-organismos ou pragas, e podem ser agrupados em cinco distintas classes funcionais, com base na presença de domínios específicos (Bent, 1996; Van Ooijen et al., 2007; Kim et al., 2012): a classe CNL compreende genes de resistência que codificam proteínas com pelo menos um domínio de filamento helicoidal, um nucleotídeo local de ligação e uma repetição rica em leucina (CC-NB-LRR); a classe TNL inclui aqueles que apresentam receptor com um domínio do tipo Toll-interleucina, um sítio de ligação de nucleotídeos e uma repetição rica em leucina (TIR- NB-LRR); a classe RLP, sigla de proteína do tipo receptora, grupo este, que contém um receptor com um domínio do tipo serina-treonina-quinase, e uma repetição extracelular rica em leucina (Ser/Tre -

LRR); a classe RLK contém aqueles com um domínio de cinase, e uma repetição extracelular rica em leucina extracelular (Kin-LRR); a classe "Outros" inclui todos os outros genes que têm sido descritos como conferindo resistência através de mecanismos moleculares diferentes, por exemplo Mlo e ASC-1. O grupo de genes R "Unknown" representa aqueles genes cuja função exata ou tipo ainda não foram estabelecidos (Sanseverino et al., 2012; Hammond-Kosack & Jones, 1997; Chisholm et al., 2006).

Devido a forte relação entre a função dos genes R e sua complexidade no genoma das plantas, uma comparação de conteúdos de genes R entre diferentes espécies, por meio de ferramentas da bioinformática, poderá fornecer informações úteis para aplicações práticas e importantes descobertas quanto à presença destes genes em diferentes espécies (Kim et al., 2012).

Levando este fato em consideração, esse trabalho foi realizado com o objetivo de verificar, *in silico*, a presença de genes de resistência comuns entre *Zea mays* subsp. *mays* em relação a *Zea mays* subsp. *Parviglumis*, *Teosinto* e *Sorghum bicolor*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho foram utilizadas as informações dos seguintes genomas: *Sorghum bicolor*, *Teosinto* e *Zea mays* subsp. *pavirglumis*. Sendo que os genomas dessas espécies foram comparadas com *Zea mays* subsp. *mays* na busca de genes de resistências comuns. As comparações realizadas foram feitas uma a uma, ou seja, os genes R identificados em *Zea mays* subsp. *mays* foram pesquisados entre os genes de resistência encontrados em cada uma das espécies comparadas.

As sequências de dados biológicos, no formato FASTA, foram obtidas de diversas fontes, sendo os transcriptomas do *Sorghum bicolor* e *Zea mays* subsp. *mays*, obtidos do banco de dados Phytozome V11.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>); sequências de *Zea mays* subsp. *pavirglumis*, obtidas do European Nucleotide Archive (ENA) (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) e sequências de *Teosinto*, obtidos do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

As sequências de dados biológicos das espécies foram alinhadas contra sequências FASTAS do banco de dados biológicos PRG-Wiki (<http://prgdb.crg.eu>), um banco de dados de genes de resistência de plantas, utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), uma ferramenta de

alinhamento local de sequências. Para realizar o alinhamento entre as sequências similares foi utilizado o parâmetro de nota de corte para e-value de pelo menos $1e-5$, sendo o e-value a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso. O alinhamento resultou em um conjunto de informações tabuladas.

Em seguida, criou-se um banco de dados local, utilizando o MySQL, uma ferramenta de gerenciamento de banco de dados gratuita. Foi adicionada uma tabela com informações anotadas sobre os genes R de plantas, obtida do PRG-Wiki para consecução de anotação dos dados alinhados.

Foram criadas novas tabelas no banco de dados com genes ortólogos entre *Zea mays* subsp. *mays* e as demais espécies utilizadas neste trabalho. Na sequência, informações provenientes da tabela Annotation (tabela que contém informações anotadas sobre os genes de resistência) foram adicionadas às tabelas de genes ortólogos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos entre os alinhamentos realizados de cada uma das espécies com as informações do BLAST de *Zea mays* subsp. *mays*, verificou-se a necessidade de filtrar as informações repetidas nos arquivos. Na **tabela 1** está o comparativo entre o número de sequências de entrada, o número de resultados obtidos demonstrando sequências de genes de resistência similares, bem como o resultado da comparação entre as demais espécies com *Zea mays* subsp. *mays*.

A partir disto, foi possível observar o número final de resultados obtidos após a filtragem de sequências repetidas que foi realizada. Durante a busca pelas informações biológicas do milho e demais espécies nos diferentes bancos de dados, não foi possível encontrar o transcriptoma completo de todas as espécies, informação especialmente importante para que as comparações fossem realizadas. Entretanto, foi possível utilizar os transcriptomas completos de *Sorghum bicolor* e *Zea mays* subsp. *mays*. Para as outras espécies utilizadas na comparação foram utilizadas todas as informações de sequências biológicas encontradas a partir dos bancos de dados biológicos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e do ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

Tabela 1. Distribuição do número de sequências obtidas em bancos de dados biológicos para a realização das análises *in silico*.

Espécies e	Nº de	Nº após	Nº	Nº
------------	-------	---------	----	----

(Banco de dados)	sequências de entrada	BLAST vs Genes R	sequências sem repetição	sequências filtradas vs <i>Z. mays</i> subsp. <i>mays</i>
<i>Z. mays</i> subsp. <i>mays</i> (Phytozome)	88760	10951	3032	-
<i>S. bicolor</i> (Phytozome)	47205	10086	2581	930
<i>Teosinto</i> (GenBank)	21395	1994	64	44
<i>Z. mays</i> subsp. <i>pavirglumis</i> (ENA)	23139	3226	145	109
TOTAL	180499	26257	5822	1085

Apesar destas limitações foram encontrados os resultados, apresentados na **tabela 1**. Conforme as análises foram sendo executadas foi possível filtrar as informações para a conferência de quais e quantos genes de resistência estão similarmente compartilhados entre *Zea mays* subsp. *mays* e as outras espécies. A **tabela 2** apresenta os resultados encontrados quando a comparação entre *Zea mays* subsp. *mays* e as outras espécies foi realizada. Cada um dos genes de resistência similares foi dividido nas diferentes classificações. O número total de genes R somando todas classificações encontradas na comparação também foi obtido.

Foram encontrados 1085 genes de resistência compartilhados entre o transcriptoma de *Zea mays* subsp. *mays* e as sequências utilizadas das outras espécies estudadas (**tabela 1**). Os resultados de comparação mais expressivos foram os encontrados com *Sorghum bicolor*, que mostrou ter genes R de todas as classes compartilhados com *Zea mays* subsp. *mays*, num total de 930 genes. A comparação entre *Zea mays* subsp. *mays* e *Zea mays* subsp. *pavirglumis*, que é considerado o ancestral do milho atual, resultou em 109 genes R compartilhados, pertencentes à todas as classes, excluindo as do tipo Mlo-like e T. Para o *Teosinto* também foram encontrados a presença de 44 genes R ortólogos, podendo ser resultado de uma possível ancestralidade. A comparação realizada entre as quatro espécies demonstrou a presença de 2 genes R em comum, ortólogos, porém ambos de classe ainda desconhecida.

Para todas as plantas estudadas, foi observado o prevaletamento para presença dos genes R das classes CNL, N, NL e RLP entre as sequências das plantas comparadas com *Zea mays* subsp. *mays*. Ambas as classes TNL e CNL visam especificamente proteínas efetoras patogênicas no interior da célula hospedeira, o que inicia a resposta imune desencadeada (ETI) (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Já as classes RLP e RLK são receptores padrões de reconhecimento do patógeno/micro-organismo que desencadeia a imunidade para permitir o reconhecimento de uma

ampla gama de agentes patogênicos, como vírus e bactérias (Chisholm et al., 2006). Enquanto que na classe "Outros" estão os genes responsáveis por facilitar a comunicação entre os meios intracelular e extracelular, embora não contenham domínios completos do tipo RLP, NBS ou RLK. Por isso o termo "Outros" ou oth-R foi proposto por Sanseverino et al. (2012), e é utilizado para classificar estes tipos peculiares de análogos de genes de resistência.

CONCLUSÕES

Foi possível encontrar dois genes de resistência ortólogos a todas as plantas estudadas, porém estes genes ainda não possuem informações completas com relação à sua funcionalidade, além disso, algumas das espécies estudadas continham poucas sequências, ou não continham os transcriptomas disponíveis nos bancos de dados biológicos.

A anotação manual, realizada *in silico*, dos genes de resistência encontrados possibilitou a observação de genes de resistência ortólogos a todas as plantas. Isso poderá servir como guia para se iniciar um processo de validação em laboratório sobre as espécies avaliadas no trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A Cultura do Milho**. Universidade de Évora- Escola de Ciências e Tecnologia- Departamento de Fitotecnia, 2014.
- BEAVIS, W. D.; GRANT, D. A linkage map based on information from four F2 populations of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, n. 5, p. 636-644, 1991.
- BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant molecular biology**, v. 42, n. 1, p. 251-269, 2000.
- BENT, Andrew F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1757, 1996.
- CHISHOLM, Stephen T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006.
- COULTER, J. Advance corn hybrid selection with new trial results. **Minnesota Crop News**. University of Minnesota. Minnesota. 2014.
- DOEBLEY, J. The Genetics of Maize Evolution. University of Wisconsin. **Annual Reviews of Genetics**, 38:37-59, 2004.
- FEUILLET, C.; KELLER, B. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. **Annals of botany**, v. 89, n. 1, p. 3-10, 2002.
- GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 1971-1974, 1998.
- HAMMOND-KOSACK, Kim E.; JONES, Jonathan DG. Plant disease resistance genes. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 575-607, 1997.
- KELLER, Beat; FEUILLET, Catherine. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in plant science**, v. 5, n. 6, p. 246-251, 2000.
- KIM, Jungeun et al. A genome-wide comparison of NB-LRR type of resistance gene analogs (RGA) in the plant kingdom. **Molecules and cells**, v. 33, n. 4, p. 385-392, 2012.
- MCDOWELL, John M.; SIMON, Stacey A. Molecular diversity at the plant-pathogen interface. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 736-744, 2008.
- MICHAELSON, Martin J. et al. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. **American journal of botany**, p. 183-188, 1991.
- OLIVEIRA, E. C. Marcadores ISSR na formação de grupos heteróticos e na inferência evolutiva de milho pipoca. **Universidade Estadual do Norte Fluminense**. Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro – RJ. 2010.
- PURCINO, A.A.; Sorgo sacarino na Embrapa: Histórico, importância e usos. **AGROENERGIA Ano II**, Edição nº, p 6-7, 2011.
- SAEYS, Y.; INZA, I.; LARRAÑAGA, P. A review of feature selection techniques in bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2507-2517, 2007.
- SANSEVERINO, Walter; ERCOLANO, Maria Raffaella. In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.
- SPRINGER, P. S.; ZIMMER, E. A.; BENNETZEN, J. L. Genomic organization of the ribosomal DNA of sorghum and its close relatives. **Theoretical and applied genetics**, v. 77, n. 6, p. 844-850, 1989.
- VAN OOIJEN, G., VAN DEN BURG, H. A., CORNELISSEN, B. J., TAKKEN, F.L. Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. **Annual Review of Phytopathology**, 45, 43-72. 2007.
- Tabela 2.** Distribuição de classes de genes R encontradas nas espécies *S. bicolor*, *Zea mays* subsp. *parviglumis* e *Teosinto* comparadas a *Zea mays* subsp. *mays*.

Espécies comparadas com Zea mays	TNL	CN	CNL	Mlo-like	N	NL	RLK	RLK-GNK2	RLP	T	Outros	Unknown	Total
<i>S. bicolor</i>	18	10	38	5	48	59	2	15	111	5	3	616	930
<i>Teosinto</i>	1	-	2	-	4	2	8	-	-	-	-	27	44
<i>Z. mays</i> subsp. <i>pavirglumis</i>	3	1	10	-	5	3	2	1	15	-	3	66	109
Comum à todos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
TOTAL													1085



Bento Gonçalves - RS

Avaliação do crescimento de milho co-inoculado com microrganismos solubilizadores de fósforo, fungos micorrízicos e *Azospirillum*

Fabrizio Nascimento Ferreira⁽¹⁾, Vitória Palhares Ribeiro⁽²⁾, Isabelle Gonçalves Melo⁽²⁾, Ivanildo Evódio Marriel⁽³⁾, Francisco Adriano de Souza⁽³⁾, Christiane Abreu de Oliveira⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista CNPq/ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG· fabricionascimento92@hotmail.com

⁽²⁾Mestranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, MG

⁽³⁾Pesquisador (a) Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG

RESUMO: Microrganismos do solo têm sido usados como biofertilizantes por aumentarem a aquisição de nutrientes em culturas de grãos. Entretanto os produtos inoculantes gerados contêm, na maioria das vezes, um tipo de microrganismos com funcionalidade específica. O uso combinado de microrganismos com diferentes funcionalidades (co-inoculação) tem tido destaque, devido ao efeito sinérgico no aumento de produção em algumas culturas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da co-inoculação de microrganismos solubilizadores de fósforo (*Bacillus* sp.), fungos micorrízicos e *Azospirillum* no cultivo de milho adubado com fontes de fósforo de diferente solubilidade. Foram utilizados 25 tratamentos provenientes da combinação de 4 tipos de inoculação e 3 fontes de P e o controle não inoculado e sem adubação fosfatada. Como inoculantes, foram utilizados dois microrganismos solubilizadores de fosfato; dois *Azospirillum* e dois fungos micorrízico arbuscular co-inoculados ou não. As fontes de P foram: fosfato de rocha Araxá; superfosfato triplo e a mistura das duas fontes. A inoculação com os 3 tipos de inoculantes proporcionou maior altura da planta de milho adubado com fosfato de araxá. Quanto ao aumento da biomassa de milho, somente a inoculação com o inoculante E1 (*Bacillus*) foi eficiente na presença de meia dose - ST+ FA. Há potencial da combinação destes microrganismos estudados com funcionalidades diversas para o aumento do crescimento de plantas. Futuramente se avaliará o acúmulo de nutrientes na planta de milho e o efeito em testes de campo.

Termos de indexação: inoculantes multifuncionais, biossolubilização de fosfato, *Penisetum glaucum*.

INTRODUÇÃO

Para alcançar uma produtividade de grãos satisfatória nas regiões de cerrado, é necessário corrigir a carência de fósforo através da utilização de fertilizantes. Dentre as opções de fonte de P disponíveis no mercado, os fertilizantes fosfatados totalmente acidulados ocupam posição de destaque, sendo frequentemente utilizados para a correção do solo (PROCHNOW et al., 2004). No entanto, o uso crescente de adubos fosfatados solúveis reduz a sustentabilidade e ameaça a segurança ambiental das culturas brasileiras. Em virtude disso, a busca por produtos que proporcionem à agricultura brasileira uma maior autonomia no mercado mundial de insumos tem aumentado. Os microrganismos são alternativas atrativas e comprovadamente prováveis para vários usos como substitutos parciais ou absolutos de insumos químicos (OGBO, 2010; VASSILEV et al., 2009) em gramíneas.

Muitos microrganismos do solo têm sido usados como biofertilizantes em plantas cultivadas de forma isolada ou em interação (Bagyaraj et al. 2015). O uso conjunto de microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) e fungos micorrízicos (FMA), promoveu efeito sobre o crescimento das plantas de milho quando as MSP *Agrobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp. foram inoculadas nas sementes de milho tratadas com fungos micorrízicos. Esta co-inoculação resultou em aumento de matéria seca e absorção de fósforo. Em razão disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da co-inoculação de microrganismos solubilizadores de P (MSP), *Azospirillum* (AZO) e fungo micorrízico (FMA) no cultivo de milho adubado com fontes de P de diferente solubilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas/MG (19°28'S e 44°15'W), com sementes de milheto (*Pennisetum glaucum*), variedade BRS 1501, em vasos de 5kg. O substrato dos vasos foi composto de solo de cerrado natural não desinfestado. Foram utilizados 25 tratamentos combinados com 4 tipos de inoculação e 3 tipos de adubação fosfatada além de um tratamento controle sem fósforo. Como inoculantes, foram utilizados dois *Bacillus* sp microrganismos solubilizadores de fosfato (E1); duas cepas de *Azospirillum* E11; *Azospirillum* 2146 (E2) e duas cepas de fungo micorrízico arbuscular (E3). Estes microrganismos pertencem à coleção de microrganismos de Embrapa Milho e Sorgo. Foram adicionados 4 tratamentos como controle, onde não foi adicionado adubação fosfatada (PO) e nem inoculante (EO). Os tipos de adubação fosfatada foram fontes de P com diferentes graus de solubilidade de P: fosfato de rocha Araxá (FA); superfosfato triplo (ST) e a mistura das duas fontes (ST+FA).

Para preparo do inoculante, os microrganismos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido. Posteriormente, cada estirpe foi transferida para cultivo em caldo de soja triplicaseína, durante 72 h, à temperatura de 29 °C, sob agitação de 350 rpm. Após 72h de crescimento, os inóculos foram centrifugados por 10 minutos, a 6000 rpm. As suspensões microbianas foram ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl] e ajustadas para a absorvância igual ou superior a 1, em comprimento de onda igual a 550 nm, correspondente a concentração de 10^9 células mL⁻¹. O inoculante com fungo micorrízico foi preparado com uma suspensão de esporos em casca de arroz.

Aos dez dias após a semeadura, efetuou-se o desbaste, deixando-se 8 a 10 plantas por vaso. Na coleta, aos 40 dias após a germinação, na fase de florescimento, mediu-se a altura de plantas (m) e foi feita a coleta da parte aérea e do solo para avaliação do peso seco e análise de macro e microelementos.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por meio do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa de estatística SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreu diferença estatística entre os valores de altura de plantas nos tratamentos inoculados com as 3 estirpes (FA+E1+E2+E3) com relação ao controle não inoculado (FA+EO) quando o milheto foi adubado com FA (Figura 1). Vários outros trabalhos também relatam a interação entre inoculantes contendo MSP, fungos micorrízicos e diazotróficos, como *Azospirillum*, por exercerem ações cooperativas (Barea et al., 2005; Bagyaraj 2014) promovendo o crescimento. Outros relatam o efeito combinado de biofertilizantes contendo MSP, FMA e diazotróficos como *Azospirillum* em milho (Wu et al., 2005; Mohamed et al., 2014), com relação ao aumento da biomassa e produção de grãos.

Neste trabalho, somente a inoculação com o inoculante E1 (*Bacillus* solubilizador de fosfato) promoveu o aumento da biomassa de milheto de forma significativa na presença de meia dose dos fertilizantes (ST+FA), em relação ao tratamento sem inoculação (EO). Entretanto, não ocorreu diferença significativa no teste de média para os valores de acúmulo de massa seca (Figura 2) entre os tratamentos inoculados e não inoculados, de milheto adubado com FA. O menor valor de peso seco (0,85g/vaso) ocorreu no tratamento controle sem fósforo e o maior valor em milheto adubado com ST e inoculado com E1 (52,6g/vaso). Em condições de menor disponibilidade de P, com a adubação fosfatada com o fosfato de rocha araxá (FA), ocorreram ganhos expressivos de massa seca da parte aérea da planta de milheto de até 70% em relação ao tratamento controle não inoculado, nos tratamentos com inoculação de E3 e E2. E de 61,7% na co-inoculação com os 3 tipos de inoculantes (E1+E2+E3) e de 59,6% com E1 +E3.

A co-inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato e *Azospirillum*, proporcionou menor ganho de peso seco dentre as combinações avaliadas (17%). Na aplicação do inoculante de forma isolada, dentre os 3 tipos de inoculantes, o fungo micorrízico parece ter estimulado mais o crescimento do milheto, quando este foi adubado com fonte de P de baixa solubilidade (FA). Ocorreram aumentos de massa seca da parte aérea de 47,3% em relação ao controle não inoculado com a inoculação de E3 e de 33% e 13% na inoculação com E1 e E2 respectivamente.



Bento Gonçalves - RS

CONCLUSÕES

A co-inoculação com *Azospirillum*, *Bacillus* solubilizador de fosfato e fungos micorrízicos, proporcionou maior altura da planta de milho adubado com fosfato de araxá. Quanto ao aumento da biomassa de milho, somente a inoculação com o inoculante E1 (*Bacillus*) foi eficiente na presença de meia dose - ST+ FA.

AGRADECIMENTOS

A Fapemig, ao CNPq, pelos recursos financeiros. A Embrapa Milho e Sorgo pela infraestrutura e para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, M. P.; MAITI, D. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. **Current Science**, Bangalore, v. 108, n. 7, p. 1288-1293, 2015.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

MOHAMED, A. A.; EWEDA, W. E. E.; HEGGO, A. M.; HASSAN, E. A. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under greenhouse conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, p. 109-118, 2014.

OGBO, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4120-4124, 2010.

PROCHNOW, L. I.; ALCARDE, J. C.; CHIEN, S. H. Eficiência agronômica dos fosfatos totalmente acidulados. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. **Fósforo na**

agricultura brasileira. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 605-663.

SILVA, E. C. da; MURAOKA, T.; VILLANUEVA, F. C. A.; ESPINAL, F. S. C. Aproveitamento de nitrogênio pelo milho, em razão da adubação verde, nitrogenada e fosfatada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 118-127, fev. 2009.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, London, v. 89, n. 5, p. 913-933, 2010.

WU, S. C.; CAO, Z. H.; LI, Z. G.; CHEUNG, K. C.; WONG, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, p. 155-166, 2005.



Bento Gonçalves - RS

Figura 1. Altura de planta de milho nos tratamentos com microrganismos solubilizadores de fosfato (E1); *Azospirillum* (E2) e fungo micorrízico arbuscular (E3), combinação dupla (E1+E2; E1+E3; E2+E3), tripla (E1+E2+E3) e tratamentos controle, onde não foi adicionado adubação fosfatada (PO) e nem inoculante (EO). As fontes de fósforo: fosfato de rocha Araxá (FA); superfosfato triplo (ST) e a mistura das duas fontes (ST+FA). Valores médios de 4 repetições seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Scott Knot, $p > 0,05$.



Bento Gonçalves - RS

Figura 2. Matéria seca da parte aérea de milho (g) nos tratamentos com microrganismos solubilizadores de fosfato (E1); *Azospirillum* (E2) e fungo micorrízico arbuscular (E3), combinação dupla (E1+E2; E1+E3; E2+E3), tripla (E1+E2+E3) e tratamentos controle, onde não foi adicionado adubação fosfatada (PO) e nem inoculante (EO). As fontes de fósforo: fosfato de rocha Araxá (FA); superfosfato triplo (ST) e a mistura das duas fontes (ST+FA). Valores médios de 4 repetições seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Scott Knot, $p > 0,05$.

Avaliação do Impacto de Eventos Comerciais de Milho Bt sobre a Microbiota do Solo

Ubiraci Gomes de Paula Lana^(1,2); Amanda Nayê Guimarães Tavares⁽³⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira⁽⁴⁾; Arley Figueiredo Portugal⁽¹⁾; Fernando Hercos Valicente⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; ubiraci.lana@embrapa.br; ⁽²⁾ Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; ⁽³⁾ Estudante, Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Eventos de milho geneticamente modificado (GM) expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido cultivados comercialmente no Brasil desde a safra 2008/2009. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sete eventos comerciais de milho Bt sobre a comunidade microbiana do solo. A qualidade biológica do solo foi avaliada utilizando-se as técnicas de Biolog (diversidade metabólica) e T-RFLP (diversidade genética) em amostras de solo não rizosférico e rizosférico dos eventos de milho DKB 390 YG, FORMULA TL, MORGAN 20A78HX, DKB 390 PRO X, 2B587 POWER CORE, DKB 390 PRO 2 e IMPACTO VIPTERA e seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com inseticida químico. As amostras foram coletadas aos 30 e 60 dias após a germinação em Janaúba - MG, safra 2015/2016. Após 72 h de incubação das placas de Biolog, foram observados valores elevados da atividade e da diversidade metabólica (Índice de Shannon) no solo rizosférico em comparação com solo não rizosférico. Entretanto não foram detectadas diferenças significativas entre os eventos transgênicos e os tratamentos convencionais. Além disso, também não foi observada diferença significativa na diversidade genética, avaliada por T-RFLP, das comunidades de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) entre genótipos convencionais e eventos GM. Foi verificada uma tendência de agrupamento baseada no período da coleta, mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da comunidade de FMA. Os eventos de milho Bt comercializados no Brasil avaliados neste trabalho não apresentam impacto significativo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e de FMA do solo, com base nos parâmetros estudados.

Termos de indexação: Monitoramento, Milho Transgênico Bt, Microrganismos do Solo.

INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 18 milhões de agricultores em todo mundo já adotam o cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, ocupando uma área de 44,2 milhões de hectares em 2015 (JAMES, 2016). Vários eventos comerciais de milho GM expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) estão sendo cultivados no Brasil.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o impacto de eventos de milho GM para resistência a insetos sobre a microbiota do solo (CASTALDINI et al., 2005; ZENG et al., 2014). Porém, os resultados obtidos por esses trabalhos são controversos e escassos em condições tropicais. A influência das proteínas Bt sobre a composição da microbiota ainda é pouco compreendida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sete eventos comerciais de milho Bt sobre a comunidade microbiana do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do solo rizosférico

Os genótipos comerciais de milho DKB 390 YG, FORMULA TL, MORGAN 20A78HX, DKB 390 PRO X, 2B587 POWER CORE, DKB 390 PRO 2, IMPACTO VIPTERA e seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com o inseticida químico Lannate® BR foram cultivados em triplicatas em Janaúba - MG safra 2015/2016. Aos 30 dias (fase vegetativa) e 60 dias (florescimento) após o plantio, foram coletadas raízes de cinco plantas de cada genótipo. Cinco gramas das raízes finas com o solo fortemente aderido (rizosférico) foram colocadas em tubos cônicos e o volume foi completado para 50 mL com solução de pirofosfato de sódio 0,15% (m/v). Após agitação a 130 rpm por 30 min, as raízes foram removidas e 5 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo para análise de diversidade metabólica. O restante da amostra foi centrifugado por 30 min a 10.000

rpm, o sobrenadante descartado e o pellet, solo rizosférico, foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Biolog

Para a determinação da atividade (AWCD) e diversidade metabólica por meio do índice de diversidade de Shannon (H) foram utilizadas placas Ecoplates com diferentes fontes de carbono (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Um volume de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) contendo solo da etapa anterior foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi diluído 50X. Cada poço da placa de Biolog foi inoculado com 120 μL da solução e as placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labstems, Multiskan, MS, EUA) com comprimento de onda de 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação. A leitura de 72 h (tempo médio) foi utilizada para estimar os valores de AWCD e H (ZAK et al., 1994), que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

T-RFLP

O DNA genômico do solo rizosférico foi extraído utilizando o kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO La., Inc., EUA). Para análise de bactérias, fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando os primers 8F marcado na posição 5' (6-FAM) e 1492R (LAMONTAGNE et al., 2002). Para a amplificação do gene 23S rRNA de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi utilizado *nested*-PCR a partir de reação com primers LR1 e FLR2 (TROUVELOT et al., 1999). Para a 2ª reação de PCR foram utilizados 2,5 μL do produto da 1ª reação e os primers FLR3 (6-FAM) e FLR4 (NED) (GOLLOTTE et al., 2004). Os fragmentos amplificados das regiões 16S e 23S rDNA foram digeridos com as enzimas restrição AluI e TaqI, respectivamente. Os fragmentos de DNA foram detectados no equipamento Genetic Analyzer 3500XL com GeneMapper 5.0. (Applied Biosystems) e analisados no software T-REX (CULMAN et al., 2009). Os dados foram ordenados por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard utilizando o programa Past versão 3.04 (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade e diversidade metabólica

As comunidades bacterianas apresentaram diferenças na utilização das fontes de carbono em função das fases de desenvolvimento da cultura

(coleta) e do material genético (genótipo). As diferenças foram significativas para atividade metabólica (AWCD) e para o índice de Shannon (H). Valores elevados de AWCD (2,2 - 2,6) e H (3,3 - 3,4) foram observados no solo rizosférico em comparação com solo não rizosférico (AWCD = 0,1; H = 2,2 - 2,6). Aos 30 e 60 dias do desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas dos eventos Bt e isogênicos tratados ou não com inseticida químico não apresentaram diferenças significativas na atividade e diversidade metabólica, diferindo apenas em relação ao solo não rizosférico (**Tabela 1**). No entanto, os métodos dependentes do cultivo *in vitro* de microrganismos, como o Biolog, apresentam limitações, uma vez que algumas bactérias não podem ser cultivadas, incorrendo em uma seletividade para determinados grupos de bactérias (ZAK et al., 1994). Portanto, para complementar as análises, a diversidade genética foi avaliada por T-RFLP, uma técnica que independe do cultivo dos microrganismos.

Diversidade genética

Para avaliarmos a influência dos diferentes eventos transgênicos sob a diversidade genética dos microrganismos presentes na rizosfera foi utilizada a técnica de T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism). Nesse estudo, as amostras de solo rizosférico distanciaram-se das amostras de solo não rizosférico na projeção bidimensional das comunidades bacterianas (**Figura 1**), indicando diferenças nítidas na estruturação das comunidades microbianas, que podem ser influenciadas por diversos fatores, como o tipo de solo e exsudação de compostos pela raiz, que podem influenciar no crescimento dos microrganismos da rizosfera (YANG; CROWLEY, 2000). Entretanto, os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento entre as comunidades bacterianas dos genótipos.

Foi verificada uma tendência de agrupamento de FMA baseada no período da coleta (**Figura 2**), mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da estrutura de FMA. Assim, os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento entre as comunidades bacterianas e de FMA dos genótipos de milho transgênico e convencional, em consonância com outros estudos (BECKER et al., 2014; ZENG et al., 2014; CHEEKE et al., 2015).

CONCLUSÕES

Os eventos de milho Bt comercializados no Brasil avaliados neste trabalho não apresentam impacto significativo sobre a estrutura das comunidades

bacterianas e de fungos micorrízicos arbusculares do solo, com base nos parâmetros estudados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Célio Ramos das Neves pelo auxílio na coleta das amostras e à Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BECKER, R.; BUBNER, B.; REMUS, R.; WIRTH, S.; ULRICH, A. Impact of multi-resistant transgenic Bt maize on straw decomposition and the involved microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 73, p. 9-18, 2014.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms, **Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- CHEEKE, T. E.; SCHUTTE, U. M.; HEMMERICH, C. M.; CRUZAN, M. B.; ROSENSTIEL, T. N.; BEVER, J. D. Spatial soil heterogeneity has a greater effect on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungal communities and plant growth than genetic modification with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. **Molecular Ecology**, Oxford, v.24, p. 2580-2593, 2015.
- CULMAN, S. W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H. G.; CADILLO-QUIROZ, H.; BUCKLEY, D. H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 171-180, 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 14, p. 111-117, 2004.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. **Past**: Palaeontological statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. 2011. Disponível em:<http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 28 mar. 2016.
- JAMES C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA, 2016.
- LAMONTAGNE, M. G.; MICHEL, JR.; HOLDEN, P. A.; REDDY, C. A. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p. 255-264, 2002.
- TROUVELOT, S.; Van TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence *in situ* hybridization. **Mycorrhiza**, Amsterdam, v. 8, p. 203-206, 1999.
- YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 66, p. 345-351, 2000.
- ZAK, J. C.; WILLING, M. R.; MOOREHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.
- ZENG, H.; TAN, F.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; SHU, Y.; WANG, J. Effects of cultivation and return of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize or the diversity of the arbuscular mycorrhizal community in soils and roots of subsequently cultivated conventional maize. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 254-263, 2014.

Tabela 1. Atividade (AWCD) e diversidade metabólica (Índice de Shannon - H) determinadas por BILOG da população bacteriana de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete genótipos comerciais de milho transgênico Bt e respectivos isogênicos, tratados (ISO + I) ou não (ISO) com o inseticida químico Lannate® BR coletadas no Município de Janaúba-MG, safra 2015/2016.

Genótipo	Transgene <i>Bt</i>	Atividade (AWCD)		Diversidade metabólica	
		Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
Solo não rizosférico	-	0,110 a	0,049 a	1,898 a	2,252 a
DKB 390 YG	<i>Cry1Ab</i>	2,535 b	2,407 b	3,389 b	3,348 b
ISO DKB 390	-	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
FÓRMULA TL	<i>Cry1Ab</i>	2,415 b	2,460 b	3,409 b	3,351 b
ISO FÓRMULA	-	2,638 b	2,489 b	3,406 b	3,372 b
ISO FÓRMULA + I	-	2,630 b	2,563 b	3,390 b	3,388 b
MORGAN 20A78 HX	<i>Cry1F</i>	2,428 b	2,444 b	3,398 b	3,357 b
ISO MORGAN	-	2,467 b	2,377 b	3,355 b	3,353 b
ISO MORGAN + I	-	2,555 b	2,478 b	3,398 b	3,347 b
DKB 390 PRO X	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2</i>	2,570 b	2,578 b	3,391 b	3,373 b
ISO DKB 390	-	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
2B587 POWER CORE	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F</i>	2,453 b	2,399 b	3,369 b	3,319 b
ISO 2B587	-	2,415 b	2,341 b	3,398 b	3,380 b
ISO 2B587 + I	-	2,543 b	2,393 b	3,383 b	3,373 b
DKB 390 PRO 2	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2</i>	2,532 b	2,345 b	3,412 b	3,345 b
ISO DKB 390	-	2,528 b	2,603 b	3,411 b	3,402 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
IMPACTO VIPTERA	<i>Vip3Aa20</i>	2,545 b	2,585 b	3,383 b	3,415 b
ISO IMPACTO	-	2,495 b	2,343 b	3,412 b	3,365 b
ISO IMPACTO + I	-	2,437 b	2,535 b	3,403 b	3,390 b

* Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

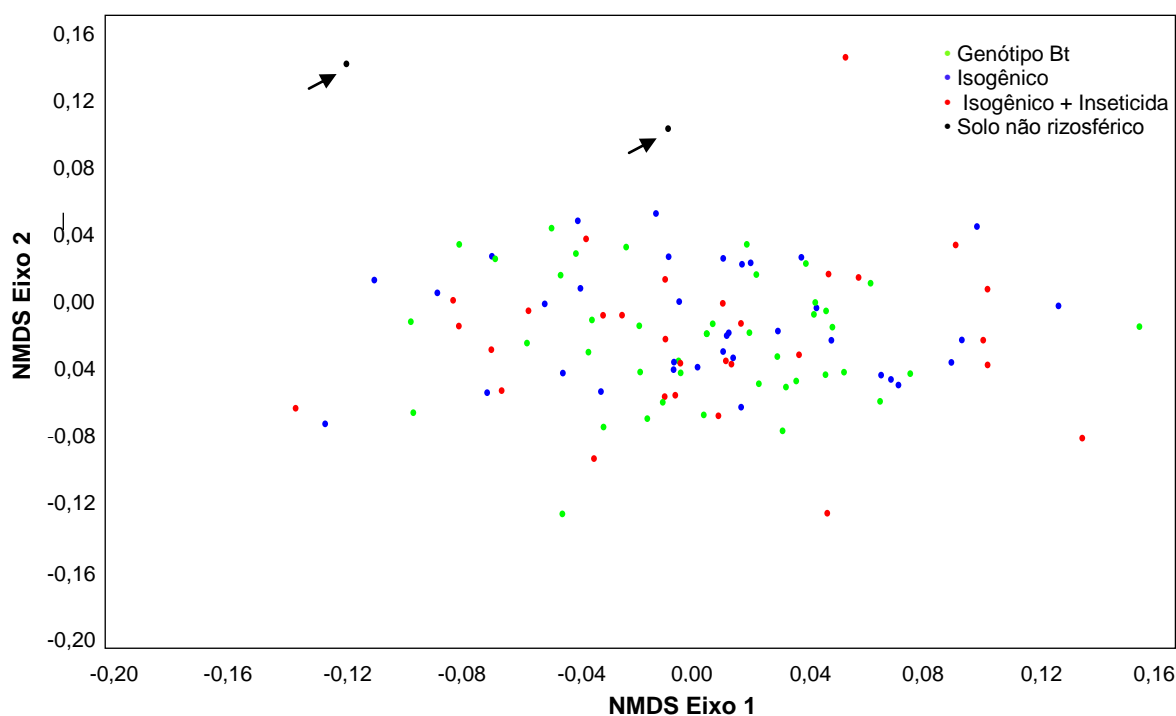


Figura 1. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de bactérias de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete genótipos de milho Bt e isogênicos tratados ou não com o inseticida químico Lannate® BR, coletadas aos 30 e 60 dias após plantio em Janaúba-MG, safra 2015/2016. As setas indicam as amostras de solo não rizosférico.

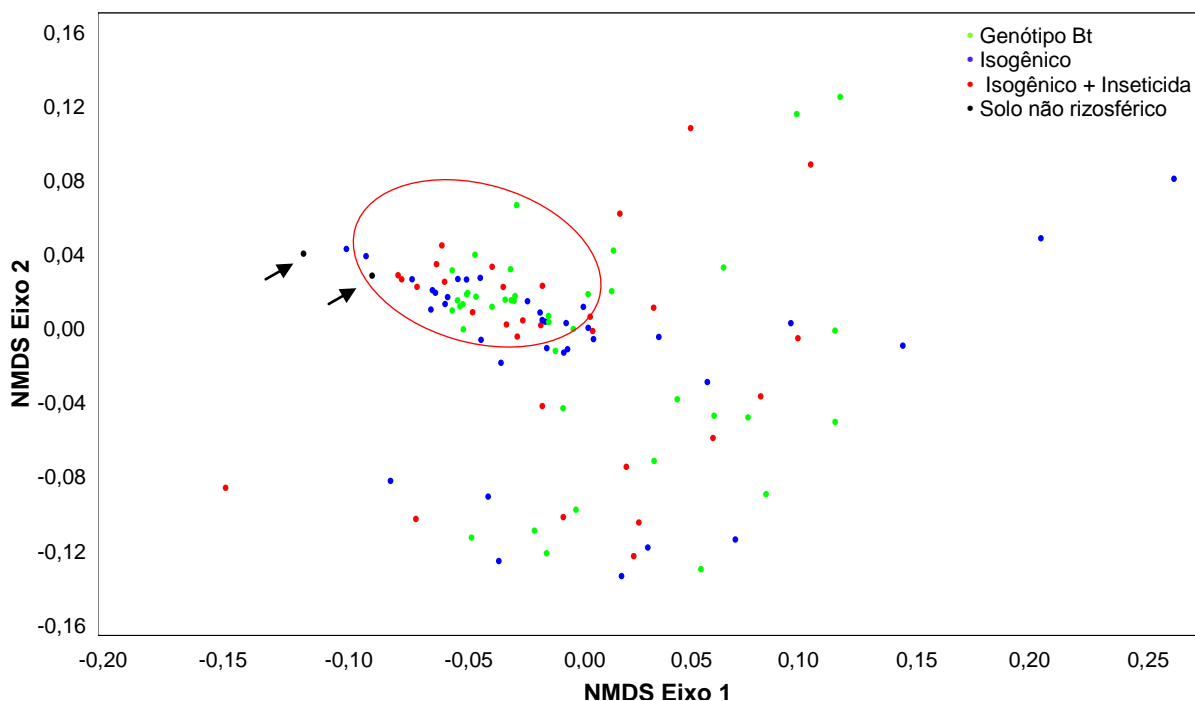


Figura 2. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de fungos micorrízicos arbusculares de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete

genótipos de milho *Bt* e isogênicos tratados ou não com o inseticida químico Lannate® BR, coletadas aos 30 e 60 dias após plantio em Janaúba-MG, safra 2015/2016. As setas indicam o solo não rizosférico e o círculo em vermelho destaca o agrupamento preferencial das amostras coletadas aos 60 dias após o plantio.

Avaliação do Impacto de Milho Transgênico Expressando o Gene de Tolerância ao Alumínio *SbMATE* sobre a Comunidade Bacteriana do Solo

Eliane Aparecida Gomes¹; Claudia Teixeira Guimarães¹; Uiraci Gomes de Paula Lana²; Ana Laura Verdolin³; Christiane Abreu de Oliveira¹

⁽¹⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; eliane.a.gomes@embrapa.br, ⁽²⁾ Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Bolsista FAPEMIG.

RESUMO: Mecanismos de tolerância ao Al em plantas atuam na ativação de transportadores de membrana que mediam a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes formando um complexo quelante não tóxico com o Al no solo. Buscando aumentar a tolerância ao Al, a linhagem-élite de milho L3 da Embrapa foi transformada com o gene *SbMATE* que codifica um transportador de citrato na raiz de sorgo, apresentando elevados níveis de exsudação de citrato em solução nutritiva contendo níveis tóxicos de Al. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do milho transgênico superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica da comunidade bacteriana da rizosfera em comparação com os genótipos convencionais cultivados em condições de campo. Estes parâmetros foram avaliados em três fases do desenvolvimento da planta pelo consumo de diferentes fontes de carbono em Ecoplates Biolog, que fornece informações sobre a atividade metabólica dos microrganismos. A atividade e a diversidade microbiana variaram durante o desenvolvimento da cultura, apresentando o pico máximo durante o período de florescimento, sendo mais elevadas nos híbridos do que nas linhagens. A atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior em relação ao solo rizosférico, sendo essa diferença mais acentuada aos 90 dias, que coincide com a fase de enchimento de grãos. Os parâmetros utilizados para avaliar a atividade e a diversidade metabólica não mostraram diferença significativa entre as comunidades bacterianas dos genótipos transgênicos e não transgênicos, indicando que o citrato exsudado pelas raízes de milho expressando o gene *SbMATE* não altera o metabolismo das comunidades microbianas do solo.

Termos de indexação: Microbiota, rizosfera, diversidade metabólica, Al

INTRODUÇÃO

O principal mecanismo de tolerância ao Al em plantas envolve ativação de transportadores de membrana responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos no ápice radicular, que formam complexos estáveis e não tóxicos com o alumínio (DELHAIZE et al., 2007). O gene *SbMATE* é um membro da família MATE (multidrug and toxic compound extrusion), que codifica um transportador de membrana, responsável pela exsudação de citrato ativada por Al³⁺ nos ápices radiculares de genótipos de sorgo tolerantes ao Al (MAGALHÃES et al., 2007). Buscando aumentar a tolerância ao Al em milho, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu uma linhagem transgênica que, além de superexpressar o gene *SbMATE* de sorgo, apresenta níveis elevados de exsudação de citrato em solução nutritiva (MITRE, 2014). Como o aumento na exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas de milho transgênicas pode levar a uma alteração na biodiversidade e na atividade da comunidade microbiana do solo, e por ser uma exigência dos órgãos regulamentares e da legislação de biossegurança, o desenvolvimento de pesquisas e metodologias para avaliar impacto do cultivo de plantas transgênicas sobre as comunidades microbiológicas no campo torna-se fundamental (VASCONCELOS; CARNEIRO, 2013). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos genótipos de milho transgênicos superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica de bactérias da rizosfera.

MATERIAL E MÉTODOS

Genótipos

Os genótipos utilizados foram L3T (linhagem L3 transgênica), L3 (linhagem L3 não transgênica),

L3TxL53 (híbrido transgênico) e L3xL53 (híbrido não transgênico). A linhagem transgênica L3 (L3T) foi gerada a partir de um evento transgênico no híbrido Hill (PÔSSA, 2010) introgredido na linhagem elite L3 por retrocruzamento assistido por marcadores.

Área Experimental para Liberação Planejada de Plantas Transgênicas

O experimento foi realizado em local de liberação planejada na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. O plantio das linhagens e dos híbridos foi realizado em subáreas separadas por bordadura de genótipos não transgênicos em alta (40 a 55%) e baixa saturação de AI (0 a 2%), com três repetições. A adubação de plantio seguiu as recomendações da cultura com base na análise de fertilidade do solo. As coletas de solo rizosférico foram realizadas aos 30 (fase vegetativa), 60 (florescimento) e 90 (enchimento de grãos) dias após o plantio. O sistema radicular de três plantas por linha foi coletado, sendo considerado como solo rizosférico aquele aderido às raízes. Após a coleta, 5 g de raízes finas e centrais que continham solo aderido a elas foram agitadas por 30 minutos em solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) em homogeneizador horizontal. Como controle, foi coletado na mesma área solo não rizosférico.

Atividade Metabólica dos Microrganismos

Para a determinação da atividade e diversidade metabólica foram utilizadas placas Ecoplates (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Um volume de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) contendo solo foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante obtido foi diluído 50 vezes. Cada poço da placa de Biolog foi inoculado com 120 µL da solução e as placas foram incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labstems, Multiskan, MS, EUA) com comprimento de onda de 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Esses dados foram utilizados para estimativa dos valores da atividade total (AWCD) e do índice de diversidade de Shannon (H) de acordo com Zak et al. (1994). Os resultados em AWCD e H foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade e teste de Scott-Knott, a 1% e 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Metabólica

O índice de atividade metabólica (AWCD) variou ao longo do tempo de incubação, atingindo o pico

máximo após 72 horas, para a maioria dos genótipos avaliados (**Figura 1**). Assim, essa leitura foi utilizada para cálculos dos componentes de diversidade metabólica.

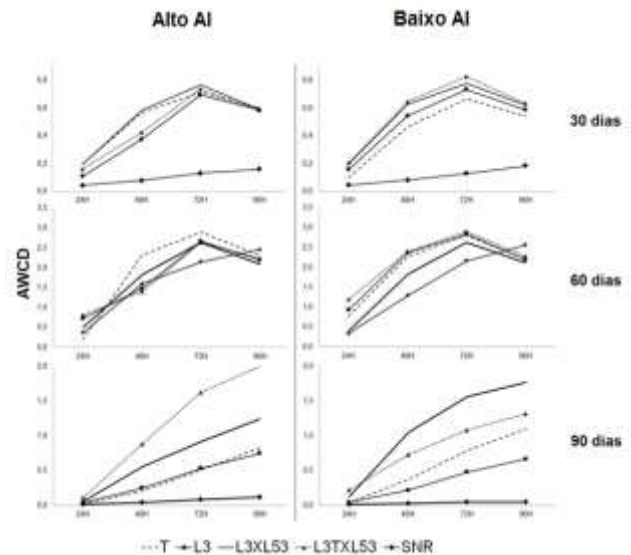


Figura 1. Medida de desenvolvimento de cor (AWCD) baseada no padrão de utilização dos substratos em placas Biolog Ecoplate das comunidades microbianas da rizosfera de milho. (L3T) linhagem L3 transgênica; (L3) linhagem L3 não transgênica; (L3xL53) híbrido não transgênico; (L3TxL53) híbrido transgênico e (SNR) solo não rizosférico.

Aos 30 e 60 dias do desenvolvimento da cultura, as comunidades bacterianas dos genótipos não apresentaram diferenças na atividade metabólica, diferindo apenas em relação ao solo não rizosférico (**Tabela 1**). No entanto, aos 90 dias, na fase de enchimento de grãos, a comunidade microbiana dos híbridos apresentou uma maior atividade metabólica em relação às linhagens, independentemente de os genótipos serem transgênicos ou não. Nota-se que a atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior ao solo rizosférico em todas as fases do desenvolvimento da cultura.

Tabela 1. Comparação das médias da atividade metabólica (AWCD) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

Genótipos	30 dias	60 dias	90 dias
L3TxL53	0,781 a	2,775 a	1,353 a
L3xL53	0,771 a	2,632 a	1,240 a
L3	0,771 a	2,754 a	0,507 b
L3T	0,690 a	2,846 a	0,651 b
SNR	0,128 b	2,157 b	0,067 c

*Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

A análise de regressão possibilitou a visualização do comportamento das comunidades microbianas ao longo do desenvolvimento da cultura (**Figura 2**). O pico máximo de atividade metabólica das comunidades bacterianas foi aos 60 dias, coincidindo com a fase de florescimento, sendo que as amostras de solo não rizosférico apresentaram atividade inferior ao longo de todo o desenvolvimento da cultura. Adicionalmente, a superioridade dos híbridos quanto à atividade metabólica em relação às linhagens foi observada apenas aos 90 dias após o plantio.

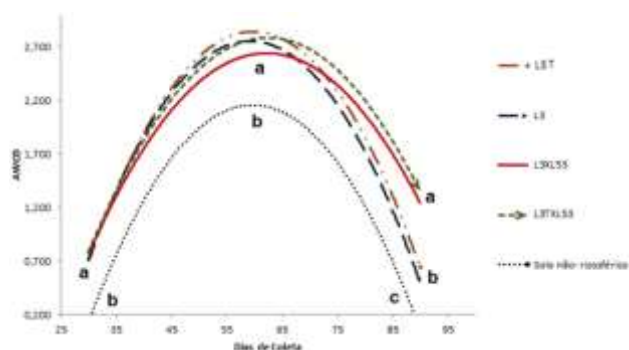


Figura 2. Análise de regressão baseada nos valores de atividade metabólica (AWCD), ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

Vários trabalhos têm relatado que na fase de florescimento ocorre a maior atividade microbiana, por causa da maior taxa de exsudação e liberação de fontes de carbono pela planta. A principal fonte de carbono para os microrganismos do solo são os exsudatos das raízes, que, no período de florescimento e frutificação das plantas, estão em pleno desenvolvimento e atividade e quando estes estágios vegetais ocorrem simultaneamente com temperatura e umidade favoráveis promovem o crescimento e atividade da biomassa microbiana (LYNCH; PANTING, 1982; PEIFFER; LEY, 2013).

Diversidade Metabólica Avaliada pelo Índice de Shannon

Os valores de AWCD obtidos pelo consumo de diferentes fontes de carbono em placas de Biolog foram convertidos em índice de diversidade de Shannon (H). O teste de média foi semelhante ao obtido com os valores de AWCD, exceto aos 60 dias, cuja diversidade metabólica das amostras de solo rizosférico e não rizosférico não apresentou diferença significativa. Aos 30 dias de desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas da rizosfera diferiram significativamente da amostra de solo não rizosférico. Aos 90 dias, as comunidades de solo rizosférico dos híbridos foram superiores às linhagens, independentemente de serem ou não transgênicos (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Comparação das médias da diversidade metabólica (Índice de Shannon) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

GENÓTIPOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
L3TxL53	3,354 a	3,396 a	2,917 a
L3xL53	3,371 a	3,390 a	2,948 a
L3	3,330 a	3,398 a	2,485 b
L3T	3,326 a	3,407 a	2,610 b
SNR	2,869 b	3,269 a	1,507 c

*Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

A análise de regressão com base no Índice de Shannon revelou um perfil da diversidade das comunidades microbianas da rizosfera ao longo dos três meses do desenvolvimento da cultura de milho semelhante ao obtido com os valores de AWCD. O pico máximo de diversidade foi aos 60 dias, sem diferença significativa entre as amostras. Aos 90 dias, houve uma diferenciação entre genótipos, em que os híbridos apresentaram maiores índice de diversidade, seguidos das linhagens e do solo não rizosférico (**Figura 3**).

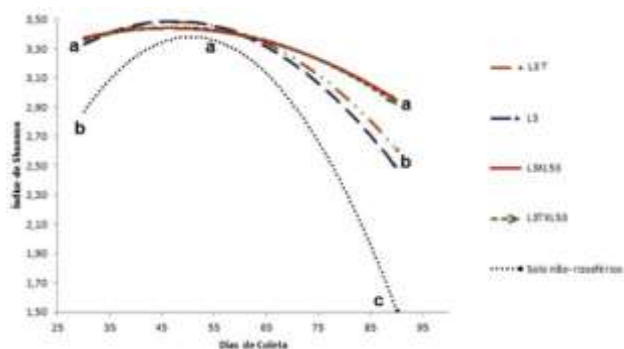


Figura 3. Análise de regressão baseada nos valores do Índice de Shannon ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

CONCLUSÕES

Os níveis contrastantes de Al no solo, a fase desenvolvimento da cultura e a presença de híbridos e de linhagens influenciaram a estrutura e a composição das comunidades bacterianas do solo.

As comunidades bacterianas coletadas em solo rizosférico apresentaram maior atividade e diversidade metabólica que as comunidades do solo não rizosférico.

A atividade e a diversidade metabólica das comunidades bacterianas da rizosfera de linhagens e híbridos de milho não foram afetadas em função da expressão do transgene *SbMATE*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa, Fapemig e ao Generation Challenge Program pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2255-2262, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Effects of season, cultivation and nitrogen fertilizer on the size of the soil microbial biomass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p.249-252, 1982.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MITRE, L. K. **Caracterização genética e morfofisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene *SbMATE* de sorgo.** 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene *SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio em sorgo.** 2010. 108 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEIFFER, J. A.; LEY, R. E. Exploring the maize rhizosphere microbiome in the field: a glimpse into a highly complex system. **Communicative and Integrative Biology**, v. 6, n. 5, p. e25177, 2013.

VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, A. A. **Metodologia de análise de biossegurança:** análise de risco de milho geneticamente modificado. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 201).

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MORRHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 26, p. 1101-1108, 1994.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"

Comportamento de Genótipos de Milho Inoculados com *Azospirillum brasilense*

Ana Carolina Costa Arantes⁽¹⁾; Anastácia Fontanetti⁽²⁾; Fernanda Zatti Barreto⁽³⁾;
Thais Borges de Oliveira⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Estudante de mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados; Universidade Federal de São Carlos/CCA; Araras, São Paulo; accarantes@gmail.com; ⁽²⁾ Professora; UFSCar/CCA; anastacia@cca.ufscar.br; ⁽³⁾ Estudante de Mestrado PPVBPA; UFSCar/CCA; fernandazbarreto@gmail.com; ⁽⁴⁾ Estudante de Mestrado PPVBPA; UFSCar/CCA; thais_borges5@hotmail.com

RESUMO: A otimização de processos biológicos, como a fixação biológica de nitrogênio aumentam a sustentabilidade dos sistemas produtivos. Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no crescimento e teor de clorofila em quatro genótipos de milho, visando o sistema orgânico de produção. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, e os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 4 x 2 com 4 repetições. O primeiro fator foi constituído por 4 cultivares de milho (Al Bandeirantes, Al Avaré, UFV e DKB 390). O segundo fator pela presença ou ausência da inoculação. Utilizou-se o inoculante comercial, com estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis ml^{-1} . As variáveis: altura de planta (cm), diâmetro de caule (mm), teor relativo de clorofila, área foliar total, massa seca do colmo e das folhas foram avaliadas nos estádios V4 e R1 do milho. Em todas as avaliações realizadas não houve efeito da aplicação de *Azospirillum brasilense*. Também não houve efeito da interação entre a inoculação e as cultivares de milho.

Termos de indexação: *Zea mays* L.; composto orgânico; agricultura orgânica.

INTRODUÇÃO

O uso de fertilizantes orgânicos, composto e esterco animais, para o cultivo de milho têm apresentado resultados satisfatórios quanto à produtividade de espigas e grãos (Santos et al., 2009; Maia & Cantarutti, 2004; Silva et al., 2004). Embora o composto orgânico, seja um dos fertilizantes mais empregados na agricultura

orgânica, sua utilização implica na realização da compostagem e requer meio de transporte e aplicação, o que eleva os custos de produção.

O mesmo raciocínio se aplica aos esterco de animais. De acordo com Souza et al. (2008), dependendo do volume aplicado, o composto orgânico pode representar cerca de 28,8% da entrada energética do sistema de produção orgânico. Fato que pode onerar os custos de produção e aumentar a dependência de insumos externos à propriedade.

Neste contexto, a otimização de processos biológicos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), podem reduzir as doses dos fertilizantes orgânicos, contribuindo para maior sustentabilidade do sistema.

O processo da FBN em gramíneas ocorre por meio de bactérias diazotróficas e especificamente para o milho, a *Azospirillum brasilense* é uma das bactérias que vem proporcionando resultados positivos (Basi, 2013). Entre os efeitos positivos, da interação entre *Azospirillum* e milho estão o aumento da produção de matéria seca e grãos, e também o maior acúmulo de nitrogênio nas plantas (Hungria et al., 2010).

Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre o crescimento, desenvolvimento e teor de clorofila foliar em quatro genótipos de milho, visando o sistema orgânico de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na UFSCar/CCA, Araras- SP, entre outubro de 2014 e fevereiro de 2015. O

delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 com 4 repetições:

1º fator: 4 cultivares de milho (3 variedades de polinização aberta o Al Bandeirantes, Al Avaré e UFV Soberano; e um híbrido simples DKB 390);
2º fator: presença ou ausência da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Utilizou-se inoculante comercial, com estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} . A parcela experimental foi formada por um vaso com volume 15 dm^3 , e uma planta de milho.

Anterior a inoculação com *A. brasilense*, as sementes de milho passaram por desinfecção, através da lavagem com álcool absoluto (99,9%) por 30 segundos, em seguida, imersão em hipoclorito de sódio (10%), por três minutos, e para finalizar, as sementes foram lavadas 10 vezes com água destilada e esterilizada (Costa et al., 2013).

O solo utilizado, Latossolo Vermelho Eutrófico de textura argilosa, foi coletado na camada arável. Com as características químicas: pH 4,9, P-resina 12 mg dm^{-3} , M.O. 22 g dm^{-3} , K $2,0 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, Ca $15 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, Mg $5 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, H+Al $45 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, Al $0 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, SB $22,4 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, CTC $67,4 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, V 33%.

Aos 90 dias, anteriores ao semeio do milho, foi realizada a calagem do solo, para a elevação da saturação de bases para 70%. Posteriormente, o solo foi peneirado, e o volume de 15 dm^3 por vaso, foi misturado com 300g de composto orgânico e 7g de biofósforo (fertilizante organomineral fosfatado que contém matéria orgânica, fornece e disponibiliza o P adsorvido no solo), sendo equivalente a dose de 1,2 g de P_2O_5 . As doses do composto e do biofósforo foram determinadas em função da análise química do solo e da recomendação de adubação para experimentação em vasos, segundo Malavolta (1980). Características químicas do composto orgânico: pH 7,7; C 8,1 %; N 1,10 %; P_2O_5 1,40 %; K_2O_5 0,98 %; CaO 4,04 %; MgO 0,50 %; SO_4 1,24 %.

Para a inoculação do produto comercial foi utilizada uma micropipeta automática e a dose, proporcional a recomendada pelo fabricante, concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} , foi aplicada sobre as sementes, com distribuição uniforme. Foram semeadas 3 sementes por vaso, que após a emergência, no estádio V2, foi realizado o desbaste,

permanecendo uma planta por vaso.

As variáveis analisadas foram: altura de planta (cm), diâmetro de caule (mm), teor relativo de clorofila, área foliar total, nos estádios fenológicos V4 e R1. Também avaliou-se a massa seca do colmo e das folhas do milho no estádio R1 (florescimento feminino). O teor relativo de clorofila na folha foi determinado utilizando-se um clorofilômetro eletrônico Falker e as leituras foram realizadas no terço superior da última folha completamente expandida de cada planta (Morais, 2013). A determinação de área foliar (AFT, cm^2) foi realizada com o integrador de aérea foliar portátil LI 3000C, em todas as folhas expandidas da planta.

As características avaliadas foram submetidas ao teste F da análise de variância, e as medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as avaliações realizadas não houve efeito da aplicação de *Azospirillum brasilense*. Também não houve efeito da interação entre a inoculação e as cultivares de milho (**Tabela 1 e 2**). Esses resultados corroboram com Repke et al. (2013), que não verificaram efeitos do *A. brasilense* no crescimento do milho. Os autores atribuíram o resultado a dois possíveis fatores: número ideal de unidades formadoras de colônia por semente e inibição do *A. brasilense* em função da aplicação de nitrogênio.

A legislação brasileira indica que a quantidade de células viáveis de *A. brasilense* deve ser de 200 milhões mL^{-1} (Hungria, 2011). Quantidade verificada no produto comercial utilizado nesse trabalho. Considerando a dose utilizada 100 mL ha^{-1} , a concentração bacteriana foi de aproximadamente 340 mil unidades formadoras de colônia semente $^{-1}$. De acordo com Arzac et al. (1990) a concentração bacteriana ótima é aproximadamente 17 mil unidades formadoras de colônia por semente, quantidade inferior a utilizada nesse trabalho. No entanto, Roberto et al. (2010) encontraram maior produção de massa verde da parte aérea e massa seca da raiz do milho utilizando 50, 75 e 100 % da dose

de 120 ml ha⁻¹, do mesmo produto comercial empregado.

Em relação à adubação com nitrogênio, Hungria (2011), verificou que nos tratamentos que receberam 100% de N na forma mineral de uréia, o efeito da inoculação com *A. brasiliense* foi em geral nulo. Nesse trabalho, aplicou-se o equivalente a 300 mg kg⁻¹ de N utilizando como fonte o composto orgânico, fato que pode ter afetado a eficiência do *A. brasiliense*.

Tabela 1. Resumo das análises de variâncias para as variáveis: altura de planta (ALT), diâmetro de colmo (DIAM), teor de clorofila (CLO), no estágio de desenvolvimento do milho, quatro folhas expandidas (V4)

Estádio de quatro folhas expandidas (V4)			
Fontes de variação	Quadrado médio		
	ALT	DIAM	CLO
Cultivares	1527,32 ^{ns}	0,027 ^{ns}	10,53 ^{ns}
Inoculação	1358,51 ^{ns}	0,14 ^{ns}	22,44 ^{ns}
Cult x Ino	697,76 ^{ns}	0,021 ^{ns}	15,16 ^{ns}
CV (%)	16,93	20,28	6,82

ns - Valores não significativos a 5% de probabilidade pelo teste F e Tukey.

Tabela 2. Resumo das análises de variâncias para as variáveis, área foliar total (AFT), altura de planta (ALT), diâmetro de colmo (DIAM), teor de clorofila (CLO), massa seca do colmo (MSC) e massa seca da folha (MSF) no florescimento feminino do milho (R1)

Estádio de florescimento feminino do milho (R1)					
Fontes de variação	Quadrado médio				
	ALT	DIAM	CLO	MSC	MSF
Cultivares	657,19 ^{ns}	283318 ^{ns}	95,58 ^{ns}	193,75 ^{ns}	77,36 ^{ns}
Inoculação	6,57 ^{ns}	146005 ^{ns}	60,22 ^{ns}	480,5 ^{ns}	30,03 ^{ns}
Cult x Ino	3143,95 ^{ns}	18314 ^{ns}	35,62 ^{ns}	110,25 ^{ns}	37,28 ^{ns}
CV (%)	8,50	22,03	17,07	33,24	24,16

ns - Valores não significativos a 5% de probabilidade pelo teste F e Tukey

A leitura média da clorofila no estágio R1 do milho, foi de 35,66, inferior ao valor de 50,34,

observado por Jordão et al. (2010) utilizando o *A. brasiliense* para a inoculação do milho. O teor de clorofila é um bom indicativo da quantidade de nitrogênio, pois mais de 50% do nitrogênio total das folhas são integrantes de compostos do cloroplasto e da clorofila das folhas (Chapman & Barreto, 1997).

CONCLUSÕES

A inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* não afetou o crescimento e a produção de massa seca. Não houve efeitos da interação da inoculação com os genótipos de milho.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq e CAPES

REFERÊNCIAS

- ARSAC, J. F.; LAMOTHE, C.; MULARD, D.; J.FAGES, J. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. **Agronomie**, Paris, v. 10, p. 640-654, 1990.
- BASI, S. **Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho**. 50p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava-PR, 2013.
- COSTA, M. R.; CAVALHEIRO, J. C. T.; GOULART, A. C. P.; MERCANTE, F. M. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.3, p.186-192, 2013.
- CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 89, n.1, p. 557-562, 1997.
- FERREIRA, D. F. Programa Sisvar.exe. **Sistema de Análises de Variância**. Versão 5.3. 2003.
- HUNGRIA M., CAMPO R. J., SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.**

Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F. de; LIMA, R. S.; MORETTI, A. E.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo. **Anais...** Guarapari, 2010.

MAIA, C.; CANTARUTTI, R. B. Acumulação de nitrogênio e carbono no solo pela adubação orgânica e mineral contínuas na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.8, n.1, 2004.

MORAIS, Tâmara Prado de. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho.** Dissertação. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitotecnia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. H. J. S.; SILVA, C. J. da; FIGUEIREDO, P. G.; SILVIO, J. B. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.12, n.3, p. 214-226, 2013.

ROBERTO, V. M. O.; SILVA, C. D. da; LOBATO, P. N. Resposta da cultura do milho a aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. **CD-Rom**

SANTOS, J. F. dos; GRANGEIRO, J. I. T.; OLIVEIRA, M. E. C. de; BEZERRA, S. A.; SANTOS, M. do C. A. Adubação orgânica na cultura do milho no brejo Paraibano. **Engenharia Ambiental**, Rio de Janeiro.6, p. 209-216, 2009.

SILVA, J.; SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, M.; SILVA, K. M. B. Efeito de esterco bovino sobre rendimentos de espigas verdes e de grãos de milho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p.326-331, 2004

Comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera de milho cultivado sob diferentes fontes de fosfato utilizando sequenciamento de nova geração

Ubiana Cássia Silva⁽¹⁾; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽²⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾; Sara Cuadros⁽⁴⁾; Julliane Dutra Medeiros⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁴⁾; Vera Lúcia dos Santos⁽⁵⁾

⁽¹⁾Estudante de Doutorado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG; ubiana.microb.ufmg@gmail.com; ⁽²⁾Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾Grupo de Genômica e Biologia Computacional /Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas Gerais, ⁽⁵⁾Professora, UFMG.

RESUMO: O Brasil se enquadra como o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), porém ainda é muito dependente da importação de insumos agrícolas, como os fertilizantes fosfatados. Para maior sustentabilidade da produção brasileira, tem-se estudado o emprego de fosfatos brasileiros juntamente com inoculantes microbianos capazes de disponibilizar o fósforo (P) dessas rochas no sistema solo-planta. Este trabalho objetivou investigar o perfil da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera do milho, cultivado com diferentes fontes de fosfato. O DNA extraído do solo rizosférico foi amplificado usando marcadores de bactéria (gene ribossomal 16S) e de fungo (região ITS). Os amplicons foram sequenciados na plataforma Miseq da Illumina e mapeados contra banco de dados para inferir a taxonomia. Os resultados demonstraram que o filo Proteobacteria foi dominante em todas as fontes de P avaliadas. Porém a família oxalobacteraceae foi enriquecida no tratamento com adição de fosfato de Araxá. O filo fúngico Ascomycota foi dominante em todas as fontes de P avaliadas, seguido de Glomeromicota que apresentou maior abundância nos tratamentos adicionados de fosfato de Araxá e supertríplo em comparação com o tratamento sem adição de P. Dado o exposto, pode-se concluir que as comunidades bacterianas e fúngicas do solo rizosférico de milho sofreram efeito da fonte de P, este estudo pode contribuir para maior compreensão do papel da comunidade microbiana na nutrição fosfatada do milho e direcionar a seleção de inoculantes microbianos para a melhoria do status nutricional dessa planta.

Termos de indexação: Comunidade microbiana, fosfato de rocha e rizosfera de milho.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas importantes para a agricultura, sendo o segundo cereal mais produzido em escala mundial.

Entretanto, para garantir a produtividade dessa cultura, os sistemas de produção são altamente dependentes de insumos químicos, especialmente fertilizantes. O fósforo (P) é o terceiro componente que limita o crescimento das plantas, estando abaixo apenas do nitrogênio e da água, atuando em inúmeros processos, incluindo fotossíntese, respiração, sinalização celular e síntese de ácidos nucleicos. Entretanto, o Brasil não possui reservas de rochas fosfáticas com teores de P adequados para o processamento convencional de síntese de adubos, o que o torna dependente do mercado externo de fertilizantes (Anda, 2016). Além disso, grande parte do fosfato solúvel adicionado ao solo na forma de fertilizantes fica retido aos óxidos de Ferro e Alumínio nos solos tropicais, como os do cerrado brasileiro (Novais & Smith, 1999).

Uma das alternativas para fertilização fosfatada no Brasil é o emprego de fosfatos de rocha extraídos a partir de minas brasileiras agregado ao uso de micro-organismos com capacidade de disponibilizar o P dessas rochas. Neste contexto, o estudo do perfil da comunidade microbiana com capacidade de crescer associada à planta nas condições estressantes, como a baixa disponibilidade de P, por métodos independentes de cultivo poderá auxiliar no entendimento do papel da microbiota na nutrição do milho, podendo direcionar a busca por micro-organismos eficientes na promoção do crescimento de plantas, propiciando o desenvolvimento de inoculantes microbianos eficazes no suprimento de nutrientes para a cultura do milho. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi de acessar a diversidade da comunidade microbiana associada ao milho cultivado em diferentes fontes de P por meio do sequenciamento de amplicons.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG (19°28'S 44°15'W), sendo composto por três tratamentos (T1:

Solo agrícola sem adição de P; T2: Solo agrícola com adição de P solúvel; T3: Solo agrícola com adição de fosfato de Araxá), sendo um total de nove parcelas, divididas em três blocos. O milho híbrido 30F35YH da Embrapa Milho e Sorgo foi plantado manualmente com matraca em linhas de 5 m de comprimento, espaçadas entre si em 70 cm. O tratamento com adubação fosfatada recebeu 100 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ a partir de trifosfato triplo e fosfato de Araxá aplicados a 5 cm de profundidade, através da abertura de sulcos com enxada abaixo e ao lado da linha de plantio. Após 60 dias do plantio, foram coletadas 5 plantas de cada repetição, totalizando 15 plantas por tratamento e 45 amostras totais. Estas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos de primeiro uso.

Coleta e processamento das amostras

Sub-amostras das raízes com o solo rizosférico aderido foram processadas para extração do DNA total. Inicialmente, as amostras recém colhidas no campo foram lavadas com água para retirar o excesso de solo. Em torno de 5g das raízes mais finas e com solo rizosférico aderido de cada amostra foram adicionadas a um tubo cônico contendo 30 mL de tampão fosfato (Para 1L: 6,33g de NaH₂PO₄.H₂O e 16,5g de Na₂HPO₄.7H₂O). Os tubos foram agitados por 15 s e as raízes transferidas para novo tubo de 50 mL contendo 30 mL do tampão fosfato. O solo obtido deste procedimento correspondeu a primeira fração. Em seguida, as raízes foram homogeneizadas e sonicadas em baixa frequência (50-60 Hz) por 5 min., sendo 5 vezes de sonicação de 30s, seguidos de 30s de descanso. As raízes foram transferidas para novo tubo contendo 30 mL do tampão fosfato e obteve-se a segunda fração de solo (Lundberg et al. 2012). As duas frações de solo rizosférico foram misturadas, centrifugadas e o pellet foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico do solo foi utilizado o kit Power Max soil DNA (MoBIO Laboratories, Inc., CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% e a quantificação realizada em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Preparo da biblioteca de amplicons e sequenciamento de DNA

A partir do DNA metagenômico de solo rizosférico, foi feita a reação de PCR para amplificar as regiões V3 e V4 da subunidade 16S do rDNA de bactéria, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores

341F e 806R (Klindworth, et al., 2013), e para a região ITS2 de fungo utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS3_KYO1-F e ITS4_KYO1-R (Toju et al., 2012). A reação da PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 5 µL de cada primer (1 pmol/µL) e 2,5 µL do DNA (15 ng/µL). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 seg., anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg. A extensão final foi conduzida a 72°C por 5 min. Os amplicons foram purificados com AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os amplicons foram ligados a um par de index (N7 e S5) específico para cada amostra durante uma segunda PCR: para um volume final de 25 µL, adicionou-se 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 3 µL de cada Nextera XT index, 2,5 µL do produto purificado da primeira PCR e 4 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguida de 8 ciclos a 95°C por 30 seg., anelamento a 55°C por 30 seg., extensão a 72°C por 30 seg. e extensão final a 72°C por 5 min. O produto da segunda PCR foi purificado com AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter, Danvers, MA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação da segunda PCR, os amplicons foram avaliados quanto a qualidade e tamanho das bandas utilizando Bioanalyzer DNA 1000 chip. Em seguida, as amostras foram quantificadas por qPCR utilizando o kit KK4824 – Kapa Biosystems e normalizadas. Foi feito um pool das amostras para o sequenciamento na plataforma MiSeq da Illumina utilizando o kit V3, usando 2 x 300 bp paired-end.

Análise das sequências e estatística

As sequências obtidas foram demultiplexadas para agrupar as amostras de acordo com o conjunto de index utilizado. Após a triagem inicial das sequências utilizando o filtro de qualidade do sequenciador, as análises seguintes foram baseadas no pipeline desenvolvido pelo Brazilliam Microbiome Project (Pylro et al., 2013). Brevemente, as sequências no formato fastq foram trimadas quanto a qualidade, utilizando o parâmetro phred e truncadas pelo tamanho de 400 pb para bactéria e 300 pb para fungo. Em seguida, foi feita a retirada das sequências únicas (singletons) e filtragem de sequências químicas utilizando o USEARCH. A classificação taxonômica foi feita utilizando o pacote QIIME (Caporaso et al., 2010). Foi feita também a análise de variância da abundância relativa das famílias de bactérias

dominantes (maior ou igual a 3 %) e para todos os filões de fungo encontrados nas três fontes de P avaliadas, seguida do teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A classificação taxonômica das sequências obtidas demonstrou que a fonte de fosfato influenciou no padrão de táxons tanto para bactérias quanto para os fungos da rizosfera do milho. Diferenças na composição da comunidade microbiana no nível de filo foram detectadas entre os tratamentos com as diferentes fontes de P adicionadas ao solo (**Figuras 1 e 2**). Para o grupo de bactéria houve predominância do filo Proteobacteria em todos os tratamentos (**Figura 1**). Outros trabalhos têm detectado também a predominância do filo Proteobacteria na comunidade rizosférica de milho (Peiffer et al., 2013; Johnston-Monje et al., 2016). Mesmo em regiões distantes ao longo do globo terrestre, bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria tem sido dominantes na região de solo rizosférico de cultivo de milho, como demonstrado no estudo que avaliou solos do Canadá, Brasil, Flórida e Illinois (Roesch et al., 2007).

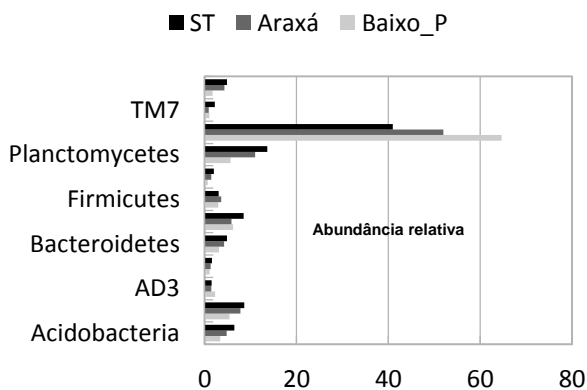


Figura 1: Abundância relativa dos filões de bactéria (maiores que 3%). Baixo P: sem adição de fosfato, Araxá: Adição de fosfato de Araxá e ST: adição de fosfato super triplo.

A família Oxalobacteraceae de Proteobacteria foi a mais abundante ($p < 0,05$) no tratamento adicionado de fosfato de Araxá (**Figura 2**), quando comparado aos demais. Gêneros dessa família são capazes de usar o oxalato e outros ácidos orgânicos como fonte de carbono e energia, o que sugere que este ácido esteja presente na rizosfera do milho cultivado com

fosfato de Araxá, podendo ser secretado por raízes de plantas, fungos filamentosos e bactérias presentes na rizosfera. O oxalato possui função importante já relatada na solubilização do fosfato de Araxá (Mendes et al. 2014; Silva et al. 2014).

A classificação taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) representativas do grupo de fungos mostrou que Ascomycota foi o filo dominante nos tratamentos para todas as fontes de P, seguido pelos filões Glomeromicota, Basidiomicota, Zigomicota e Chytridiomicota (**Figura 3**). De modo geral, e com exceção do filo Glomeromicota, todos os outros apresentaram abundância relativa com valores muito próximos entre as fontes.

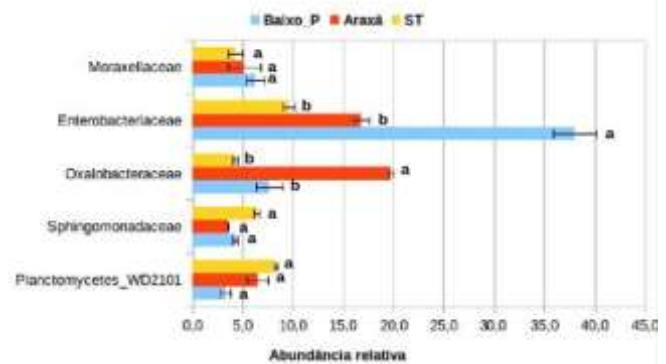


Figura 2: Abundância superior a 3 % das famílias encontradas nos tratamentos com as diferentes fontes de P identificadas na Figura 1. As médias seguidas da mesma letra são significativamente similares pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

A

O filo Glomeromicota apresentou abundância de 7% no tratamento sem adição de P, 16% no tratamento com fosfato de Araxá e 17 % naquele adicionado com supertriplo. Alguns fatores podem ter contribuído para a ocorrência da abundância similar de Glomeromicota nos tratamentos acrescidos de fosfato de Araxá e de super triplo. Por exemplo, o efeito da liberação residual do P a partir do fosfato de Araxá ao longo dos três anos de cultivo de milho adubado com esta rocha na área coletada. Este processo pode ter propiciado uma dose de P solúvel no solo durante o crescimento das plantas similar à provida pelo super triplo e, portanto, a colonização micorrízica não foi alterada nestes dois tratamentos. No tratamento sem adição de P, os resultados foram contrários ao esperado. Nestas condições, a associação micorrízica resulta em aumento da disponibilidade de P para a planta. Por outro lado, as plantas submetidas a elevado estresse nutricional de P, têm o seu crescimento diminuído, o que, possivelmente, interferiu na capacidade de

estabelecer a colonização com fungos micorrízicos arbusculares FMA (Koide e Li, 1990). Outro fator é a ocorrência de competição pelo P na rizosfera entre as hifas dos FMA e as raízes (Smith et al. 2011).

CONCLUSÕES

O filo Proteobacteria foi o mais abundante em todas as fontes de P avaliadas, sendo que a família Oxalobacteraceae foi enriquecida no tratamento com adição de fosfato de Araxá. Para os fungos, o filo glomeromicota apresentou abundância relativa similar nos tratamentos adicionados de fosfato de araxá e supertríplo.

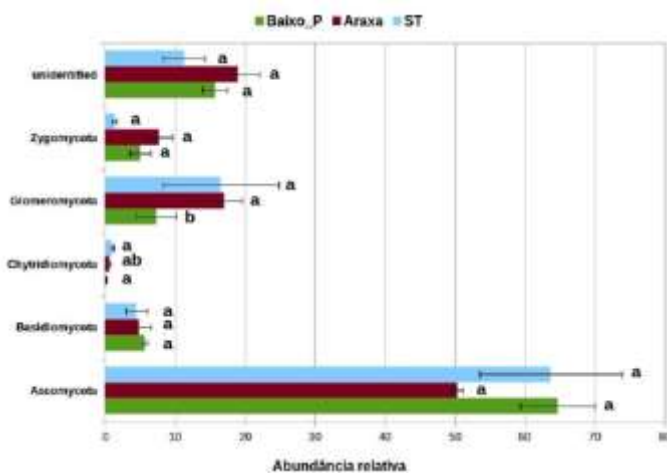


Figura 3: Abundância relativa dos filios de fungos nas diferentes fontes de P identificadas na Figura 1. As médias seguidas da mesma letra são significativamente similares pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao auxílio financeiro da Fapemig, CNPq e Embrapa Milho e Sorgo

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA). <http://www.anda.org.br/> acesso em 09 de maio de 2016.

JOHNSTON-MONJE, D., LUNDBERG, D. S., LAZAROVITS, G., REIS, V. M., & RAIZADA, M. N. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, p. 1-19, 2016.

KLINDWORTH, Anna et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical

and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, p. gks808, 2012.

KOIDE, ROGER T.; LI, MINGGUANG. On host regulation of the vesicular—arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 114, n. 1, p. 59-74, 1990.

MENDES, G. O, de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64. p., 239-249, 2014.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, DPS, 1999. 399p.

PEIFFER, J. A., SPOR, A., KOREN, O., JIN, Z., TRINGE, S. G., DANGL, J. L. & LEY, R. E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n.16, p. 6548-6553, 2013.

ROESCH, L. F., FULTHORPE, R. R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A. K., KENT, A. D., & TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007.

SILVA, U.C, MENDES, G.O, SILVA, N. M. R., DUARTE, J. L., SILVA, I. R., TÓTOLA, M. R., & COSTA, M. D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. **PloS One**, v.9, n.10, p.e110246, 2014.

SMITH, S. E., JAKOBSEN, I., GRØNLUND, M., & SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. **Plant Physiology** v.156, n.3, p.1050-1057, 2011.

TOJU, A.S. TANABE, S. YAMAMOTO, H. SATO. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e40863, 2012.

Diâmetro do colmo de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* em distintas zonas de relevo

Marlo Markus Lopes⁽¹⁾; Luciano Zucuni Pes⁽²⁾; Lúcio de Paula Amaral⁽³⁾; Biane de Castro⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão (PPGAP); Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Santa Maria, Rio Grande do Sul; marlomarkus@hotmail.com; ⁽²⁾ Professor; PPGAP - Colégio Politécnico da UFSM; lucianopes@politecnico.ufsm.br; ⁽³⁾ Professor; Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Rurais da UFSM; amaralufsm@gmail.com; ⁽⁴⁾ Extensionista rural; Associação Rio-grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural/Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural (Emater/RS-Ascar); bianedecastro@gmail.com.

RESUMO: A agricultura de precisão tem por objetivo a gestão dos cultivos e a busca do máximo de rendimento das culturas com o menor consumo de insumos possível. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a inoculação mecanizada e manual das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* em milho cultivado em diferentes zonas de relevo. O experimento foi conduzido em Cruzeiro do Sul – RS com a semeadura mecanizada do híbrido Velox TL@ de ciclo superprecoce na safra 2015/2016, mediante a inoculação manual das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); controle, mediante a aplicação de nitrogênio e sem a realização de inoculação (T2); e inoculação mecanizada dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T3). O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (tratamento de sementes, controle e aplicação dirigida no sulco) e zonas de relevo (alta, média e baixa), com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no caso de diferença significativa. Não houve influência significativa da inoculação de *A. brasilense*, independente do método de aplicação, no diâmetro médio final do colmo das plantas. Contudo, a inoculação manual e mecanizada ocasionaram o desenvolvimento de plantas com maior diâmetro de colmo nas distintas zonas de relevo, quando comparadas às plantas oriundas de semeadura sem o emprego das BPCP.

Termos de indexação: bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP); agricultura de precisão; pulverizador de inoculação dirigida.

A produção de milho (*Zea mays* L., Poaceae) durante a safra 2000/2001 no RS foi de 6.134.207 t em 1.672.923 ha, com rendimento médio de 3,67 t ha⁻¹. Na safra 2013/2014, foram colhidas 5.389.520 t de milho, em uma área de somente 924.363 ha, evidenciando a redução da área plantada e o aumento da produtividade, alcançando o rendimento médio da ordem de 5,83 t ha⁻¹ (IBGE, 2016).

A mecanização e automação se tornaram importantes à medida que o aumento da escala de produção dificultou a percepção do agricultor sobre o campo e os tratamentos agrônômicos passaram a demandar alto rendimento operacional (MOLIN, 1997). O uso da automação e controle da pulverização ocorre a partir da utilização da eletrônica embarcada e viabiliza a aplicação localizada de insumos em quantidades variáveis e em tempos específicos, otimizando custos de produção e insumos, colaborando para que níveis de produtividade pré-estabelecidos para uma determinada cultura sejam obtidos (MOLIN, 2015). A automação e instrumentação a cada dia são mais necessárias devido à escassez e ao custo da mão de obra no campo, ao mesmo tempo em que se busca sustentabilidade econômica, social e ambiental (NAIME et al., 2014).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* são endófitas facultativas (HUERGO et al., 2008), denominadas diazotróficas ou fixadoras de N₂ por aportarem nitrogênio às plantas via fixação biológica e aumentarem a eficiência de utilização dos fertilizantes. Associam-se em diferentes graus de especificidade às espécies de Poaceae e Fabaceae, como ocorre, respectivamente, com o milho e a soja, o que representa uma estratégia viável

INTRODUÇÃO

economicamente para essas culturas, além dos benefícios ambientais associados à redução do uso de fertilizantes (HUNGRIA et al., 2015). A agricultura de precisão pode contribuir para o desenvolvimento de equipamentos específicos para a aplicação de insumos biológicos (microrganismos vivos), sendo que esses insumos necessitam um acondicionamento e um meio propício para a sobrevivência das colônias, de modo a garantir uma maior eficiência do produto inoculado, garantindo um número satisfatório de microrganismos no processo da inoculação (CÂMARA, 2014). Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de aplicação do inoculante das BPCP *A. brasilense*, composto pelas cepas Ab-V5 e Ab-V6, no diâmetro médio final do colmo do milho em distintas zonas de relevo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma lavoura comercial de milho de 2,5 ha no município de Cruzeiro do Sul – RS, na safra 2015/2016. O solo predominante da região é classificado como Chernossolo Háptico Órtico típico (STRECK et al., 2008).

A variedade híbrida de milho Velox TL[®] (Syngenta) de ciclo superprecoce foi semeada, em sistema de plantio direto, no dia 09 de agosto de 2015, com espaçamento de 0,80 m x 0,21 m, totalizando uma densidade de 75.000 plantas ha⁻¹. Os tratamentos foram constituídos de inoculação manual das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); controle, mediante a aplicação de nitrogênio e sem a realização de inoculação (T2); e inoculação mecanizada dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T3).

A fertilização da área foi realizada de acordo com as recomendações do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Foram aplicados 280 kg ha⁻¹ da fórmula NPK 9-25-15 na adubação de base e 350 kg ha⁻¹ de ureia (45% de N) na adubação de cobertura do milho, durante o estágio fenológico vegetativo de seis folhas desenvolvidas (V6).

Foi utilizado o inoculante comercial da marca Simbiose[®], composto pelas cepas Ab-V5 e Ab-V6 de BPCP *A. brasilense*, produto apresentado na concentração de 5x10⁸ células por mL e inoculado na mesma data da semeadura. Para a inoculação direta das sementes (T1), foram aplicados 100 ml ha⁻¹ do inoculante comercial, distribuídos manualmente de maneira uniforme nas sementes. Para a realização da inoculação mecanizada dirigida no sulco (T3), foi utilizada uma

concentração quatro vezes maior do que a concentração empregada na inoculação direta das sementes (T1), correspondendo a 400 ml ha⁻¹ aplicados diretamente no sulco de semeadura. O equipamento utilizado para realizar a inoculação dirigida no sulco (T3) foi o pulverizador de inoculação H₃M KSP 250[®], que contém um tanque com capacidade para 250 l de volume de calda. A aplicação da calda foi fracionada à dose de 20 l ha⁻¹ em oito linhas de semeadura.

Foram coletados 27 pontos amostrais no centro de cada repetição dos respectivos tratamentos e aferidos com trena métrica o diâmetro do colmo a 10 cm de altura do solo, em 29 de dezembro de 2015. Nesses pontos também foram registradas as coordenadas geográficas, através do aplicativo CR Campeiro - C7 GPS Dados, sendo classificadas as zonas de relevo em: alta (Z3), compreendida entre 82 m a 98 m de altitude; média (Z1), de 87 m a 102 m de altitude; e baixa (Z2), com valores entre 86 m e 101 m de altitude.

O delineamento experimental foi em fatorial (3x3), considerando métodos de inoculação (inoculação das sementes, sem inoculação e aplicação dirigida no sulco) e zonas de relevo (alta, média e baixa), com três repetições. Os dados experimentais foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no caso de diferença significativa. As análises estatísticas, precedidas dos testes de homogeneidade de variâncias de Bartlett e de normalidade de Shapiro-Wilk, aos quais os dados atenderam, foram realizadas com o uso do programa estatístico Assistat 7.7 Beta[®] (SILVA e AZEVEDO, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As BPCP necessitam de um acondicionamento ideal para a sobrevivência das colônias, de modo a garantir um número de microrganismos viáveis e propiciar que ocorra de forma satisfatória a colonização nos tecidos das plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A utilização de pulverizadores de inoculação dirigida é uma ferramenta que proporciona um acondicionamento favorável para a manutenção da viabilidade dos insumos biológicos e a dinamização dos processos de aplicação destes insumos (DENARDIN, 2006; PINHEIRO et al., 2013).

No entanto, independente do método de aplicação do inoculante nas sementes de milho, não houve influência significativa de *A. brasilense* no diâmetro médio final das plantas (Tabela 1). Nakao et al. (2014) também não verificaram influência da

aplicação de *A. brasilense* no diâmetro do colmo do sorgo granífero em diferentes estádios de desenvolvimento, porém a concentração de inoculante afetou esse parâmetro, bem como, houve interação significativa entre os estádios de aplicação e as concentrações.

Tabela 1. Diâmetro médio final do colmo do milho, cultivar Velox TL[®], semeado em diferentes relevos e sistemas de inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Tratamento	Diâmetro do colmo (cm)	
	Método de Inoculação	Zonas de Relevo
T1 - inoculação da semente	8,17 ^{ns}	8,17 a
T2 - testemunha	7,84	7,79 b
T3 - inoculação dirigida no sulco	8,42	8,58 a

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo Teste de Tukey.

^{ns} Não significativo.

As bactérias diazotróficas *Azospirillum* spp. têm a capacidade de colonizar, além do sistema radicular, também o colmo das gramíneas (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). Mendonça et al. (2006) observaram que as bactérias se localizam mais frequentemente nas raízes, seguida pelos colmos e folhas de milho. Possivelmente, nas condições experimentais do presente trabalho, não tenha ocorrido a colonização dos colmos das plantas em níveis suficientes para alterar significativamente a morfologia. No entanto, o diâmetro do colmo não está necessariamente relacionado à produção final de grãos, como evidenciado no trabalho de Nakao et al. (2014), em que as BPCP proporcionaram o aumento da produtividade de grãos sem, contudo, alterarem o diâmetro do colmo do sorgo granífero.

Houve interação significativa ($dms = 0,81$ cm) entre a realização da inoculação e as zonas de relevo (alta, média e baixa). De um modo geral, a inoculação manual e mecanizada ocasionaram o desenvolvimento de plantas com maior diâmetro de colmo nas distintas zonas de relevo, quando comparadas às plantas oriundas de semeadura sem o emprego das BPCP.

Esse maior desenvolvimento do colmo pela aplicação das BPCP pode ter ocorrido em virtude da fixação de N₂ ter suprido à demanda das plantas em diferentes zonas de fertilidade, situação que não ocorreu sem o emprego do inoculante. Além da correção e adubação a taxas variáveis, a agricultura de precisão pode contribuir, de forma integrada, a outros aspectos relacionados à racionalização do

uso de insumos (SANTI et al., 2009; RESENDE, 2010), a exemplo da inoculação com *A. brasilense*.

CONCLUSÕES

A inoculação de *A. brasilense*, independente do método de aplicação, não interfere no diâmetro médio final do colmo das plantas de milho híbrido superprecoce Velox TL[®]. Contudo, a inoculação manual e mecanizada ocasionam o desenvolvimento de plantas com maior diâmetro de colmo em distintas zonas de relevo, quando comparadas às plantas oriundas de semeadura sem o emprego das BPCP.

REFERÊNCIAS

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio Em soja. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, v. 147, p. 1-9, 2014.

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, Piracicaba, USP/ESALQ, v. 5, p. 35-37, 2006.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Córdoba, Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-28.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contém informações sobre a produção de milho brasileira**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MOLIN, J.P. Agricultura de precisão. Parte I: o que é o estado da arte em sensoriamento. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.17, n.2, p.97-107, 1997.

MOLIN, J. P.; AMARAL, L. R.; COLAÇO, A. F. **Agricultura de precisão**. São Paulo: Oficina de Textos, 2015. 238p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NAIME, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, W. T. L.; CRUVINEL, P. E.; MARTIN-NETO, L.; CRESTANA, S. **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2014. 412p.

NAKAO, A. H.; SOUZA, M. F. P.; DICKMANN, L.; CENTENO, D. C.; RODRIGUES, R. A. F. Resposta do sorgo granífero à aplicação de diferentes doses e épocas de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via foliar. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2702-2714, 2014.

RESENDE, Á. V.; SHIRATSUCHI, L. S.; COELHO, A. M. CORAZZA, E. J.; VILELA, M. F.; INAMASU, R. Y.; BERNARDI, A. C. C.; BASSOI, L. H.; NAIME, J. M. Agricultura de precisão no Brasil: avanços, dificuldades e impactos no manejo e conservação do solo, segurança alimentar e sustentabilidade. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA, 18., 2010, Teresina. **Anais...** Disponível em: <<https://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/redeap2/publicacoes/publicacoes-da-rede-ap/2010/rbmcsa-2010/agricultura-de-precisao-no-brasil-avancos-dificuldades-e-impactos-no-manejo-e-conservacao-do-solo-seguranca-alimentar-e-sustentabilidade/view>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

SANTI, A. L.; AMADO, T. J. C.; FLORA, L. P. D.; SMANIOTTO, R. F. F. Agricultura de precisão: é chegada a hora da integração do conhecimento. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 105, p. 24-30, 2009.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, 2006. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS, 2004. 394 p.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.



Formação de Calos Embrionários em Genótipos de Milho Tropical

Fernanda Ferreira Salgado⁽¹⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽²⁾; Meire de Cassia Alves⁽³⁾.

⁽¹⁾ Graduando em Biotecnologia, Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas; Minas Gerais; E-mail: fernanda-salgado@outlook.com; ⁽²⁾ Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Analista, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: O milho é uma das maiores culturas de cereal do mundo. É empregado principalmente como ração animal, mas a indústria vem aumentando a sua utilização como insumo na fabricação de mais de uma centena de produtos. Assim, é de grande relevância para o desenvolvimento de novas linhagens mais produtivas estudos relacionados com a sua transformação genética. Para a produção de um evento transgênico de milho via *Agrobacterium tumefaciens* é essencial o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração das células transgênicas. A embriogênese somática é o procedimento mais utilizado para regeneração de plantas de milho. O objetivo desse trabalho é selecionar linhagens tropicais capazes de formar embriões somáticos de maneira eficiente em Cultura de Tecidos utilizando como fonte de explante embriões zigóticos imaturos de 20 linhagens distintas de milho tropical fornecidas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo. Os embriões imaturos foram cultivados em meio de indução de calos, suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (1,5; 5,0; 10,0 mg L⁻¹) sendo avaliados a porcentagem de calos embriogênicos formados. As linhagens L2, L12, L16 e L19 apresentaram alta capacidade de produção de calos embriogênicos. Estas linhagens poderão ser testadas na produção de plantas transgênicas de milho.

Termos de indexação: embriogênese somática, genótipos tropicais, concentração de 2,4-D.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) pertence à família das gramíneas; é uma planta anual, monóica, de fecundação cruzada. Seu grão é uma cariopse contendo somente um embrião (Gonçalves, 2013).

Segundo dados de 2016 da FAO – *Food and Agriculture Organization*, este cereal ocupa a terceira posição como cultivar de maior produção mundial, apresentando grande importância na economia brasileira devido à ocupação de destaque na produção agrícola do país, podendo ser utilizado na alimentação do gado, produção de etanol, produção de alimentos como amido, xarope de glicose, óleo, adoçante, entre outros (Cho, 2014). É produzido principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

O milho é a terceira maior cultura de cereal no Brasil com uma produção total de 84.7 milhões de toneladas, no ano 2015 (Conab 2016). Atualmente, a transformação genética de plantas está sendo utilizada como estratégia para obtenção de materiais com resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicida e melhoria na qualidade nutricional. Devido a essa importância, é de grande relevância a seleção de genótipos tropicais com boa eficiência de regeneração em cultura de tecidos para o desenvolvimento de novas linhagens mais produtivas e adaptadas a diferentes estresses bióticos e abióticos utilizando a transgenia (Cho, 2014).

A cultura de tecidos vegetal é uma técnica utilizada para manipular plantas a nível celular em ambiente asséptico, sob condições controladas, sendo o melhoramento genético uma de suas principais aplicabilidades (Bevitori, 2013; Dagla, 2012).

A regeneração celular pode ocorrer através de duas vias a organogênese e a embriogênese somática (Gorji et al., 2011). A embriogênese somática é a técnica mais utilizada para a regeneração de milho *in vitro*. Calos embriogênicos de milho podem apresentar duas formas, calo do Tipo I e calo do Tipo II, sendo que os calos do Tipo II apresentam maior eficiência para regeneração de plantas (Armstrong e Green, 1985).

A regeneração é influenciada pelo tipo de explante e pela composição do meio de cultura

(Armstrong e Green, 1985; Songstad et al, 1991; Bohorova et al. 1995). Até o momento o escutelo de embriões imaturos e o meio de cultivo N6(Chu et al. 1975) suplementado com diferentes auxinas e citocininas tem sido a combinação de explante e meio de cultivo com os melhores resultados de regeneração para diferentes cultivares de milho.

Neste trabalho são apresentados os resultados da eficiência de formação de calos embriogênicos para 20 genótipos tropicais de milho cultivados em meio basal N6 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas vinte linhagens distintas de milho tropical (**Tabela 1**), pertencente ao Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas / MG. Embriões imaturos com 1,5 e 2,0 mm isolados entre dez a 15 dias após a polinização foram utilizados como explantes. .

Para a coleta dos embriões as espigas foram despalhadas, enxaguadas com álcool 70% e esterilizadas em solução de 1:1 de hipoclorito de sódio comercial a 50% e água destilada, com duas gotas de detergente comercial, por 20 minutos sobre agitação. Após este processo, dentro da câmara de fluxo laminar, as espigas passaram por tríplex lavagem com água destilada autoclavada. Posteriormente ao processo de esterilização, ocorreu a extração dos embriões imaturos.

Tabela 1 - Linhagens de Milho Tropical

Linhagem	Sigla do Melhoramento de Milho/CNPMS
L1	L-228-3
L2	L-262841-1-4-1
L3	521274
L4	531542
L5	521236
L6	L-521283
L7	371087-3
L8	371049-1
L9	541145
L10	371066-6
L11	521343
L12	371066-7
L13	3810227-1
L14	3820987-1
L15	482011-43
L16	590435-1
L17	3810067-7
L18	L-590027-7

L19	552220F
L20	3821095-5

Foram utilizados 360 embriões zigóticos imaturos de cada linhagem. Eles foram posicionados com o eixo embrionário em contato com o meio de indução de calos MICT (4,3 g de N6 sais; 30 g de sacarose; 100 mg de myo-inositol; 2,9 g de prolina; 3,0 g de phytigel; 15 mg de nitrato de prata; 1,0 ml de N6 vitaminas; PH 5,8) suplementado com diferentes concentrações de 2,4 D (1,5; 5,0 e 10,0 mg/L). As placas vedadas com filme PVC foram incubadas no escuro a temperatura de 28°C por 45 dias, sendo subcultivados a cada 15 dias.

Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de uma placa contendo 30 embriões imaturos, totalizando 120 embriões por tratamento.

A formação de calos embriogênicos foi observada com o auxílio de um estereoscópio Zeiss.

A variável analisada foi a porcentagem de calos embriogênicos formados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo quatro linhagens de milho de origem tropical apresentaram capacidade de formação eficiente de calos embriogênicos em meio MICT suplementados com 2,4-D. As demais apresentaram baixa ou nenhuma formação de calos embriogênicos.

As linhagens utilizadas apresentaram resultados diferentes de acordo com a concentração de 2,4-D presente no meio basal. As linhagens L12 e L16 apresentaram melhor desenvolvimento no meio de indução de calos em concentração de 1,5 mg de 2,4-D e a L19 apresentou resultados satisfatórios em concentração de 5,0 mg de 2,4-D, enquanto que a linhagem L2 formou calos embriogênicos de maneira semelhante em todas as concentrações utilizadas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Formação de calos embriogênicos de milho em meio N9 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

Linhagem	Concentração de 2,4 D		
	1,5 mg	5,0 mg	10,0 mg
L1	5,55%	0%	2,22%
L2	31,67%	35,83%	45%
L3	11,67%	14,16%	8,33%
L4	3,33%	0%	12,5%
L5	13,33%	19,17%	8,89%

L6	20%	26,67%	1,67%
L7	18,33%	15,83%	4,17%
L8	0%	16,67%	0%
L9	3,33%	14,44%	18,33%
L10	21,67%	21,67%	0%
L11	5%	6,67%	5%
L12	68,89%	53,33%	14,17%
L13	26,67%	0%	1,67%
L14	5%	0%	0%
L15	0%	1,67%	1,67%
L16	54,17%	37,5%	12,5%
L17	10%	5%	3,33%
L18	0%	0%	0%
L19	26,67%	81,11%	85,83%
L20	24,17%	5%	7,5%

Figura 1: Tipos de calos mais comumente encontrados para as diferentes linhagens de milho cultivadas em meio N6 suplementado com 2,4-D.

CONCLUSÕES

O meio de cultura MICT suplementado com 2,4-D apresentou capacidade de indução de calos embriogênicos para quatro linhagens de milho tropical.

Experimentos futuros serão direcionados para a regeneração dos calos embriogênicos. Também será testada a capacidade da *Agrobacterium tumefaciens* em infectar estes genótipos tropicais de milho.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Milho e Sorgo e a Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* v. 164, p.207-214, 1985.

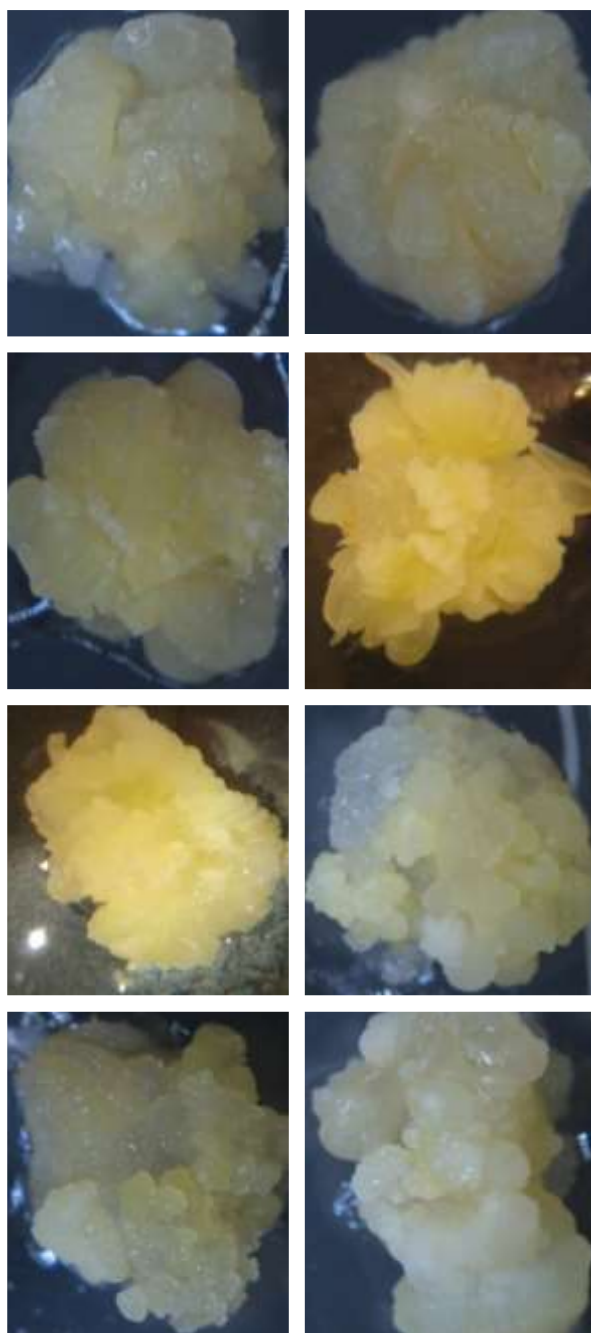
BEVITORE, R. Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): Conceitos básicos e protocolos. v. 21, p.16-22, 2013.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude, and highland maize inbreds. *Maydica*, v. 40, p. 275-281, 1995.

CHO M-J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER III, J.C.; JONES T.J.; ZHAO Z-Y. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Rep*, v.33, p.1767-1777, 2014.

Conab Companhia Nacional de Abastecimento (2016) Acompanhamento da Safra Brasileira / grãos. Versão3 – Safra 2015/16 – N.8. Available at http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_09_03_26_boletim_graos_maior_2016.pdf. Accessed on May12, 2016.

DAGLA, H R. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. *RESONANCE*, p.759-767, 2012.



FAO - Food and Agriculture Organization. Disponível em:
<http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em 19 abril 2016.

GARROCHO-VILLEGAS, V; JESÚS-OLIVEIRA, M, T;
QUINTANAR, E,SI; Maize SomaticEmbryogenesis:
Recent Features to Improve Plant Regeneration. Víctor M.
Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), Plant Cell
Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 877,
p.173-182, 2012.

GONÇALVES, G. M. B.; Desempenho Agrônomo e
Adaptativo e Divergência Genética de População de Milho
Local Derivadas de MPA1 em Processo de Melhoramento
Genético. 2013. f.48.Monografia na área de Agronomia -
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GORJI, A. Y.; In vitro plant generation of tropical maize
genotypes. 2011 International Conference on
Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE
v.16, p.52-59, 2011.

RODRIGUEZ, J, P; MANZANO, C; MORENO-RISUENO,
M, A;; Post-embryonic organogenesis and plant
regeneratio from tissues: two sides of the same coin ?.
Review Article, v.5, article 219, 2014.

SONGSTAD, D.D.; ARMSTRONG, C.L.; PETERSEN,
W.L. Silver nitrate increase type II callus production from
immature embryos of maize inbred B73 and its
derivatives. Plant Cell Reports, v.9, p.699-702, 1991.

SOUZA, R. A. V.; Transformação Genética e Avaliação de
Promotores Heterólogos para o Controle de Expressão
Gênica em Milho. 2015. f 103. Dissertação (Doutorado em
Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia - UFV
- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Identificação molecular e diversidade genética de bactérias solubilizadoras de fósforo

Ubiraci Gomes de Paula Lana^(1,2); Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾, Amanda Nayê Guimarães Tavares⁽⁴⁾; Júlia Leles⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽³⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽³⁾

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; ubiraci.lana@embrapa.br; ⁽²⁾ Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida.

RESUMO: O fósforo (P) é um dos elementos essenciais na nutrição de plantas, sendo um fator determinante na produtividade agrícola. Embora os solos contenham geralmente uma grande quantidade de P, apenas uma pequena proporção está disponível para absorção pelas plantas. Assim, microrganismos são alternativas para substituição total ou parcial de insumos químicos, permitindo o aproveitamento, pelas plantas, do P insolúvel do solo ou adicionado na forma de fosfatos de rocha. Estudos anteriores realizados na Embrapa Milho e Sorgo isolaram microrganismos endofíticos e da rizosfera de milho eficientes na solubilização de P do solo. O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a diversidade filogenética de dez estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P por sequenciamento do gene 16S rDNA e BOX-PCR. A análise filogenética permitiu a identificação e diferenciação dos isolados que pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum*. As bactérias solubilizadoras de P apresentam alta diversidade genética e podem ser diferenciadas pelo sequenciamento da região 16S rDNA e análise por BOX-PCR. A maioria dos microrganismos eficientes na solubilização de P caracterizados neste trabalho são do gênero *Bacillus*.

Termos de indexação: Solubilizadores de P, caracterização molecular, diversidade genética.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é o segundo nutriente mais limitante no desenvolvimento das plantas, afetando drasticamente o rendimento de grãos. Embora os solos contenham geralmente uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena proporção está disponível para absorção pelas plantas, principalmente como íon ortofosfato (Tinker & Nye, 2000). Em condições tropicais, a precipitação e a fixação de P são os principais responsáveis pela baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados solúveis. Até 80% do fertilizante pode ser

complexado com íons Fe, Al, e Ca presentes no solo, o que impede sua absorção pelo sistema radicular (Novais & Smyth, 1999). O uso de microrganismos consiste numa importante estratégia para melhorar a eficiência no aproveitamento de P do solo pelas plantas (Khan et al., 2007). Atualmente, a Embrapa Milho e Sorgo possui um banco de microrganismos funcionais, incluindo cepas endofíticas e presentes na rizosfera de milho eficientes na solubilização de P. Dessa forma, a caracterização molecular e filogenética de bactérias nativas de solos brasileiros torna-se importante para a recomendação de estirpes que poderão ser utilizadas como inoculantes nos sistemas de produção agrícola.

O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a diversidade filogenética de dez estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas e condições de cultura

As cepas bacterianas rizosféricas B30K, B32, B70, B116, B119 e endofíticas 1920, 1923, 1940, 2084 e 2088, pertencentes ao banco de microrganismos funcionais da Embrapa Milho e Sorgo foram previamente selecionadas com base na alta eficiência de solubilização de fontes de P. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB e crescidas à 28°C por 48 h com agitação de 150 rpm. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de NaCl 0,8% (m/v). As amostras foram centrifugadas e o precipitado ressuspenso em 567 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0).

Extração de DNA

Para isolamento do DNA genômico foram adicionados 30 µL de SDS 10% (m/v) e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por uma hora. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de solução de CTAB/NaCl (CTAB 100 mg/mL e NaCl

0,7 mol/L) e as amostras agitadas e incubadas a 65°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio/octanol (24:1), as amostras homogeneizadas por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol 99% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v). Os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual retirado em centrífuga a vácuo por 5 minutos. Ao final o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10 mM; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A).

Amplificação e clonagem do gene 16S rRNA

Para identificação molecular das cepas, o gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os primers 8F e 1492R (Galkiewicz & Kellogg, 2008). A reação de PCR foi constituída por 30 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 2 µL de tampão de reação 10 X, 3 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em 20 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 2 min, e alongação final de 72°C por 5 min, mantendo a reação a 10°C. Em seguida, 5 µL do produto da reação de PCR com GelRed (Biotium, Leuven, Belgium) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 100 V.

Para clonagem, 3 µL do produto da reação foram misturados com 1 µL de vetor pGEM-TEasy (Promega, Madison, USA), 5 µL de tampão de ligação e 1 µL de T4 DNA ligase (10 U/µL). A reação foi incubada a 4°C por 16 h. Cinco µL da reação de ligação foram utilizados na transformação de *E. coli* DH5α por choque térmico (Sambrook et al., 2001). Os clones contendo o inserto de interesse foram confirmados a partir de PCR de colônias de acordo com as condições de amplificação anteriormente descritas. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a partir das colônias crescidas em meio de cultura LB com ampicilina (100 µg/mL) a 37°C por 16 h.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram preparadas com 100 ng do DNA plasmidial; 0,5 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 1,75 µL do tampão de sequenciamento 5X e 5 pmols de primer, em 10 µL, utilizando primers M13 (Promega, Madison, USA) e específicos para o gene 16S rDNA: 8F, 515F, 902R, 1492R (Galkiewicz & Kellogg, 2008). As reações foram

submetidas a 96°C por 20 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 4 min, por 30 vezes, mantendo a reação a 10°C. Em seguida, 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol absoluto foram adicionados, as amostras incubadas por 20 min no escuro e centrifugadas por 45 min a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 60 µL de etanol 70% (v/v), sendo os microtubos centrifugados a 4.000 rpm 10 min, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuscitadas em 10 µL de formamida (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C por 5 min e injetadas no equipamento ABI3500XL (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas com o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e comparadas com o banco de dados público *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta blastn (Altschul et al., 1997).

BOX PCR

Para a análise de diversidade filogenética as reações de PCR foram constituídas num volume de 20 µL com 50 ng de DNA, 2 µL de tampão 10X, MgCl₂ 2 mM, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, Boston, USA) e 0,5 µM do primer BOX1R (Versalovic et al., 1994). As condições de amplificação foram 95°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 1 min e 72°C por 3 min, alongação final de 72°C por 10 min, mantendo a reação a 10°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por 1 h a 100 V, corado com GelRed (Biotium, Leuven, Belgium) e fotografado no equipamento L-Pix Imagem (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

Análise estatística

Análise de agrupamento baseada no gene 16S rDNA foi realizada utilizando-se o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0.14 com modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1.000 repetições. Os perfis de DNA obtidos por BOX-PCR foram analisados pelo software Bionumerics 6.1 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Bélgica), com UPGMA, coeficiente de Jaccard e tolerância de 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primes para amplificação da região do gene 16S rDNA foram utilizados na identificação molecular de bactérias. Um fragmento de aproximadamente 1,4 kb foi amplificado e sequenciado em todas as 10 cepas eficientes na solubilização de P, permitindo a identificação dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum* (Tabela 1).

Para determinar o relacionamento genético das bactérias, foi realizada uma análise de agrupamento

baseada nas sequências do 16S rDNA. As cepas B30K, B32, B70, B116, B119, 1920, 1923, 1940, 2084 e 2088 foram comparadas e agrupadas com microrganismos da mesma espécie depositados no Genbank (**Figura 2**). Foi observada uma elevada diversidade genética entre as cepas eficientes na solubilização de P.

Os resultados apresentados pela análise dos perfis de DNA por BOX-PCR reforçam essas evidências (**Figura 3**). Considerando uma similaridade de 25%, três grupos podem ser observados. O grupo I foi formado pela cepa B32 (*Bacillus*), o grupo II caracterizado pelas cepas 1923, 1920, 2084 e B116, todas identificadas como *Bacillus* e o agrupamento III composto pelas cepas B119, B30K, 2088, 1940 e B70, de diferentes espécies. As cepas 1920 e 2084, *Bacillus subtilis* apresentaram perfis semelhantes com o BOX-PCR.

Diversos trabalhos têm relatado o aumento do crescimento de plantas e absorção de nutrientes em milho a partir da inoculação com microrganismos solubilizadores de P sob condições de casa de vegetação ou campo (Hameeda et al., 2008; Kumar et al., 2007). Entre a grande diversidade de bactérias com efeitos positivos, incluem-se espécies dos gêneros *Pseudomonas* (Kaur & Reddy, 2015) e *Bacillus* (Hameeda et al., 2008). Segundos tais autores, a maioria desses microrganismos promoveu efeitos significativamente positivos sobre o rendimento de grãos, peso seco total e conteúdo de P em plantas de milho.

Assim, os microrganismos caracterizados neste trabalho têm potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes de baixo custo de forma a possibilitar uma diminuição da utilização de fosfatos solúveis, além de permitir a manutenção da produtividade das culturas de uma forma mais econômica e ambientalmente sustentável.

CONCLUSÕES

As bactérias solubilizadoras de P apresentam alta diversidade genética e podem ser diferenciadas pelo sequenciamento da região 16S rDNA e análise por BOX PCR. Os microrganismos mais eficientes na solubilização de P caracterizados neste trabalho pertencem ao gênero *Bacillus*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool." **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- GALKIEWICZ J. P., KELLOGG, C. A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. **Applied and Environment Microbiology**, v.74, p.7828-7831, 2008.
- HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O.P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v.163, p.234-242, 2008.
- KAUR, G.; REDDY, M.S. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics. **Pedosphere**, v.25, p.428-437, 2015.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable Agriculture - a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, p.29-43, 2007.
- KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. *Pseudomonas corrugate*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.3093-3100, 2007.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa, MG, **Universidade Federal de Viçosa**, 1999. 399p.
- SAMBROOK, J.; Russel D. W. Molecular cloning. p. 9.16 - 9.17. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- TINKER, P. B.; NYE, P. H. Solute movement in the rhizosphere. New York: **Oxford University Press**, 2000.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

Tabela 1. Identificação molecular de bactérias solubilizadoras de P.

Cepa	16S rDNA (pb)*	Espécie	E-value	Identidade (%)	GeneBank
B30K	1499	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	99	AB695353.1
B32	1512	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566648.1
B70	1477	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	95	FJ227280.2
B116	1487	<i>B cereus</i>	0	99	AB480773.1
B119	1498	<i>P. aeruginosa</i>	0	99	DQ115539.1

1920	1454	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN366718.1
1923	1510	<i>B. subtilis</i>	0	98	DQ993674.1
1940	1519	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566650.1
2084	1516	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN587510.1
2088	1524	<i>Ochrobactrum pituitosum</i>	0	98	NR_115043.1

* Tamanho sequenciado em pares de pares.

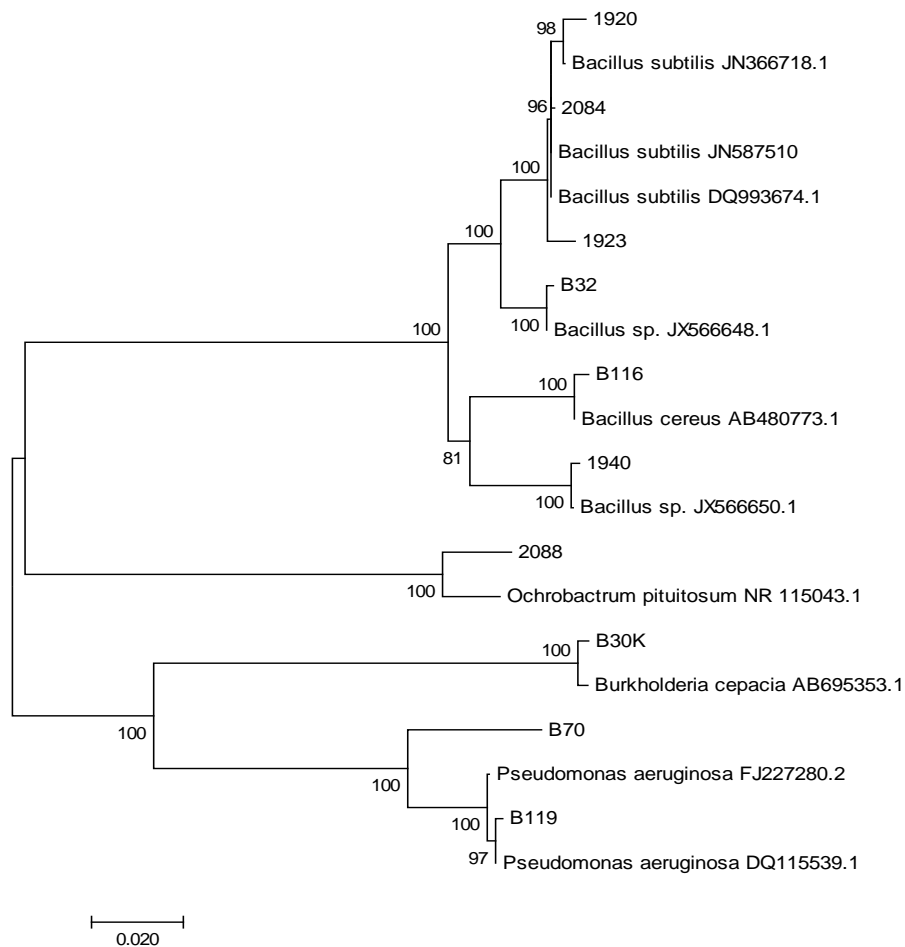


Figura 1. Análise de agrupamento baseada no sequenciamento do 16S rDNA. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 7.0.14 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining com bootstrap de 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

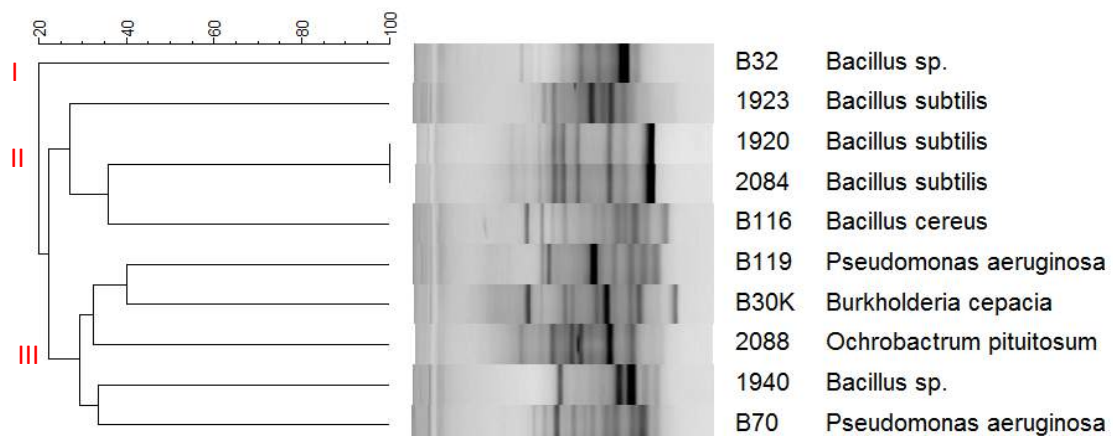


Figura 2. Dendograma baseado no *fingerprinting* obtido por meio da metodologia de BOX-PCR. Os *clusters* foram obtidos pelo programa Bionumerics 4.6. Para a análise de agrupamento foi utilizado o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Identificação por RNAseq e validação por qPCR de genes diferencialmente expressos em sorgo em resposta ao estresse hídrico

Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Andrea Almeida Carneiro⁽²⁾; Paloma Alessandra Alves⁽³⁾; Raquel Oliveira Moreira⁽³⁾; Meire de Cassia Alves⁽¹⁾; Roberto Willians Noda⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽²⁾

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.
newton.carneiro@embrapa.br

RESUMO: Um dos principais fatores que mais afeta a produção agrícola é o estresse hídrico. Desenvolvimento de cultivares de sorgo mais tolerantes ao estresse hídrico é uma das principais alternativas para um aumento de produtividade sob baixa disponibilidade de água. A tolerância à seca é uma característica complexa e afeta as respostas de genes em muitos processos biológicos em plantas. Nesse trabalho foram comparados os níveis de expressão de genes por RNAseq e qPCR de variedades de sorgo contrastantes para a tolerância ao estresse hídrico e em duas condições hídricas. O RNA total foi extraído de raízes de plantas de sorgo mais tolerantes na presença (50% menos irrigado) e ausência (100% controle irrigado) do estresse. Os cDNAs foram construídos, sequenciados e analisados utilizando a plataforma Galaxy (CNPTIA). Genes com diferenças de expressão superior a dez vezes em condições contrastantes em análise de RNAseq e de baixo número de cópia foram submetidos ao qPCR. Os resultados mostraram consistentes apenas com os genes mais expressos. Houve grande divergência com os genes menos e igualmente expressos entre os tratamentos contrastes com variações chegando superior a 30 vezes entre os dois métodos. Apesar da divergência esses resultados ajudam a consolidar os resultados de RNAseq de expressão de genes relacionados com estresse hídrico e um maior conhecimento das vias metabólicas relacionados a esse processo.

Termos de indexação: sorgo, seca, RNASeq, qPCR.

INTRODUÇÃO

Plantas sujeitas ao estresse na maioria das vezes combinam uma série de respostas fisiológicas e

bioquímicas a nível molecular, celular e em toda a planta (Bohnert et al., 1995; Bray, 1993, 1997; Chaves et al., 2003) que podem levar a alterações na planta que permitam uma maior tolerância a curto e longo prazo ao estresse hídrico. Essas alterações a curto prazo podem variar desde um ajuste osmótico (Morgan, 1984) através do sequestro de íons na planta (Mimura et al, 2003) até um sinal raiz-folha que possa reduzir a transpiração e o crescimento da planta. A longo prazo a planta pode modificar o tamanho e arquitetura do sistema radicular capacitando a planta de absorver maiores quantidades de água durante condições de estresses hídrico. Pouco se conhece sobre as redes regulatórias que traduzem as mudanças ambientais em alterações metabólicas necessárias durante as respostas de adaptação à seca. Um grande número de genes é expresso diferencialmente sob seca em diferentes tecidos, estádios e condições (Reynolds & Tuberosa 2008; Deyholos 2009) e a identificação desses genes responsivos ao déficit hídrico se torna fundamental para o desenvolvimento de linhagens tolerantes, cuja produção possa minimizar os efeitos da seca. Neste trabalho, mostramos a identificação de alguns desses genes diferencialmente expressos em resposta ao estresse hídrico em sorgo por RNAseq e sua validação por qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Foram utilizados dois híbridos de sorgo contrastantes para tolerância à seca, denominados: genótipo A (tolerante) e genótipo B (sensível). No pré-florescimento, foram impostos dois tratamentos hídricos: irrigado e submetido a restrição hídrica. No primeiro, a reposição hídrica foi realizada

diariamente até o solo atingir a umidade próxima a CC (tensão da água no solo de aproximadamente -18 kPa), enquanto que, no segundo tratamento, a indução do estresse hídrico foi realizada diariamente aplicando-se no máximo 50% da água total disponível, ou seja, até a tensão da água no solo atingir no mínimo -138 kPa para o solo especificado. Esse estresse foi mantido por 10 dias.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Antes da extração, cada amostra foi lavada rapidamente em água para retirada do solo residual e macerada em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as recomendações do fabricante.

RNASeq

Cerca de 10 ug de RNA total de duas réplicas biológicas de cada tratamento foram enviados para a empresa Eurofins para sequenciamento. As análises de sequências de RNAseq de sorgo utilizaram o programa TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) que alinha sequências do genoma e determina splicing alternativos. O Cufflinks (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) usa o mapa para localizar os transcritos. O Cuffdiff é parte do pacote do Cufflinks que faz o alinhamento de genes em duas ou mais condições determinando genes diferencialmente expressos utilizando análises estatísticas rigorosas. O TopHat e Cufflinks são sistema baseados em UNIX. Para utilizar uma interface gráfica mais acessível utilizamos a plataforma Galaxy disponibilizado pela Embrapa Informática Agropecuária. O CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>) produz informações de expressão nos formatos gráficos de vulcano, scatter e boxplots utilizando os dados do Cufflinks, em conexão com o ambiente de estatística R e pode ser acessível pelo Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>).

qRT-PCR

Para a escolha dos transcritos diferencialmente expressos de sorgo e sob condições contrastantes para estresse hídricos (100% Reidratado x 50% Reidratado), das bibliotecas de raiz (A-Root-100_x_A-Root-50) foram elencados os transcritos com as maiores expressões diferenciais [log₂ (Fold Change)] positivas (Up regulation) e negativas

(Down regulation), e os transcritos com expressões mais semelhantes (no significant differential expression = NoDiff), excetuando-se os transcritos sem expressão detectada e os transcritos sem teste estatístico. Para as categorias up e down regulated, também foram excluídos os transcritos sem significância estatística da expressão diferencial. Os transcritos sem splicing alternativo (um gene com um único transcrito) foram utilizados para o qRT-PCR. Na tabela 1 é mostrado aqueles genes que foram comparados pelos dois métodos.

Os primers foram desenhados para todos os genes selecionados utilizando o software PrimerExpress (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Um gene que codifica actina foi utilizado como gene de referência para ambos os materiais e quantificação relativa foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de sequências de RNAseq de sorgo foram feitas na plataforma Galaxy e apresentaram os números de reads por amostra da Tabela 1.

Tabela 1: Reads por amostra.

Amostras	# Reads	# Reads mapeados (%)	# Reads únicos mapeados (%)
A1-Root-100	116.579.378	102.243.966 (0.88)	90.834.215 (0.80)
A1-Root-50	89.855.346	81.632.879 (0.91)	73.009.796 (0.81)
B1-Root-100	179.914.946	160.446.644 (0.89)	143.547.667 (0.80)
B1-Root-50	122.522.510	105.978.571 (0.87)	92.389.881 (0.75)
A3-Root-100	107.365.688	98.555.039 (0.92)	85.399.469 (0.79)
A3-Root-50	79.233.974	61.298.435 (0.77)	41.601.856 (0.52)
B3-Root-100	123.638.136	114.598.181 (0.93)	98.183.283 (0.79)
B3-Root-50	120.017.974	93.215.627 (0.77)	79.800.483 (0.66)
A1-Leaf-100	100.936.758	95.953.732 (0.95)	87.141.552 (0.86)
A1-Leaf-50	96.462.640	91.790.319 (0.95)	82.848.490 (0.86)
B1-Leaf-100	106.853.764	100.825.043 (0.94)	91.879.058 (0.86)
B1-Leaf-50	185.613.262	176.839.393 (0.95)	160.287.282 (0.86)
A3-Leaf-100	219.889.864	209.038.068 (0.95)	190.179.049 (0.86)
A3-Leaf-50	110.288.924	104.385.604 (0.95)	94.117.866 (0.85)

A quantidade de genes diferencialmente expressos é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos.

Condição	# genes
A leaf 100 X A leaf 50	540
B leaf 100 X B leaf 50	3488
A leaf 100 X B leaf 100	3592
A leaf 50 X B leaf 50	3496

O BiNGO (Maere et al., 2005), um aplicativo para Cytoscape 3.0.2 (Shannon et al., 2003), foi utilizado

para determinar quais categorias são diferencialmente representadas, com base estatística, nos três domínios (Componente Celular, Função Molecular e Processo Biológico) do *Gene Ontology* (GO). Na Figura 1, observa-se as categorias diferencialmente representadas, destacadas com cores para o domínio Processo Biológico. Resulta da comparação entre as bibliotecas de folhas do genótipo A, com 100% e 50% de reidratação, com 540 genes diferencialmente expressos, sendo 252 superexpressos e 288 subexpressos. A variação de cor (de amarelo a vermelho) é relativa a menor diferença (amarelo) ou a maior diferença (vermelho) de representação estatística entre as bibliotecas, ou seja, quanto maior a diferença estatística entre as quantidades de genes de uma dada categoria GO em cada biblioteca, mais próxima do vermelho será a cor de preenchimento do círculo da categoria no gráfico. As categorias diferencialmente representadas estão relacionadas com respostas a estímulos, transporte e processos metabólicos para o domínio Processo Biológico. Para o domínio de Função Molecular, as categorias mais diferencialmente representadas são atividades catalíticas e algumas categorias de ligação, como ligação a ferro, a íons metálicos, a polissacarídeos e outros. Em Componente Celular, as categorias ligadas a organelas, citoplasma e região intracelular foram as diferencialmente representadas.

Foram elencados 72 transcritos para desenho do primer e reação de qPCR, conforme Tabela 3. Todos os resultados de superexpressão (Up regulated) que apresentaram resultados de qPCR, confirmaram a tendência de aumento de expressão dos transcritos em situação de restrição hídrica. Para os resultados sem diferença de expressão apenas um resultado confirmou os dados de RNAseq.

Tabela 3 – Número de transcritos diferencialmente expressos selecionados com RNAseq, reações que apresentaram resultados de qPCR e resultados confirmados.

Categoria	RNAseq	qPCR	RNAseq=qPCR
50-100_NoDiff	37	31	1
50-100_Up	18	12	12
50-100_Down	17	13	7

A comparação da expressão pelo método de RNAseq e qPCR mostrou grande variação no sorgo, principalmente para a categoria sem diferença de expressão (*NoDiff*) entre as amostras 100% e 50% reidratadas. As figuras 2 e 3 mostram os níveis de expressão do qPCR para alguns transcritos.

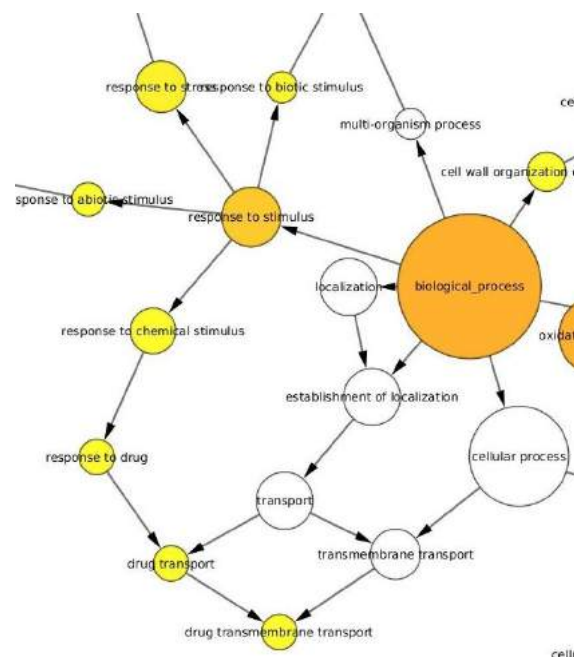


Figura 1: Parte da imagem da análise de categorias (destacadas com cores) do domínio Processo Biológico do *Gene Ontology* diferencialmente representadas entre as bibliotecas de folhas do genótipo A, com 100% e 50% de reidratação.

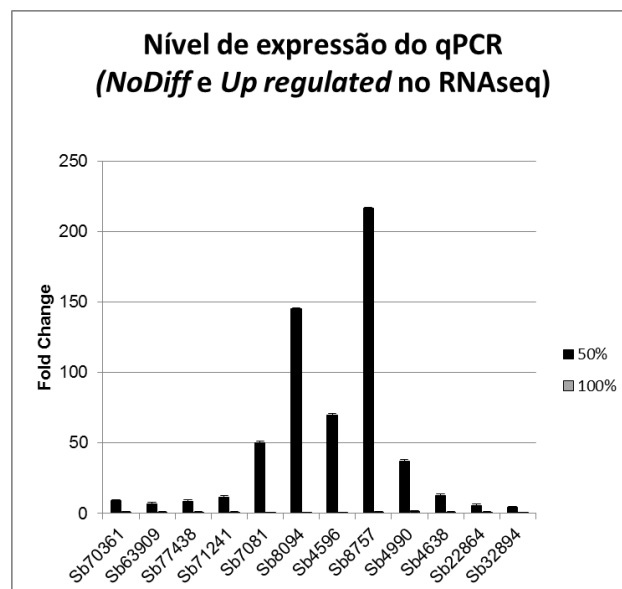


Figura 2: qPCR - Nível de expressão dos transcritos. *NoDiff* em RNAseq: Sb70361, Sb63909, Sb77438, Sb71241. *Up regulated*: Sb7081, Sb8094, Sb4596, Sb8757, Sb4990, Sb4638, Sb22864, Sb32894. Os transcritos *NoDiff* apresentam tendência de aumento de expressão na amostra 50% reidratada, tornando os resultados incompatíveis entre RNAseq e qPCR. Já para os

transcritos *Up regulated*, os resultados são coerentes entre as metodologias testadas.

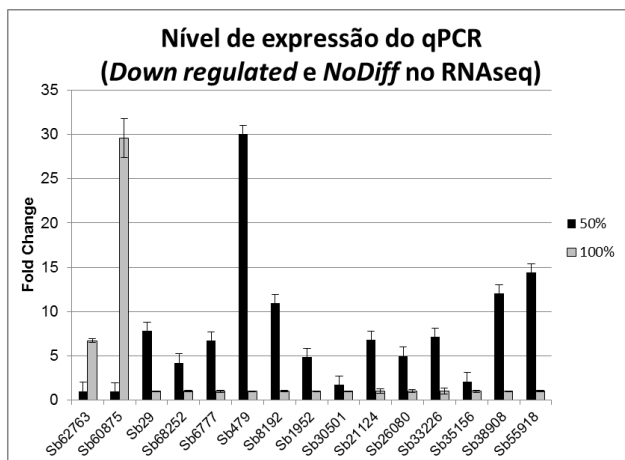


Figura 3: qPCR - Nível de expressão dos transcritos. *Down regulated*: Sb62763, Sb60875, Sb68252. *NoDiff* em RNAseq: Sb29, Sb6777, Sb479, Sb8192, Sb1952, Sb30501, Sb21124, Sb26080, Sb33226, Sb35156, Sb38908, Sb55918. Dos transcritos *NoDiff*, apenas o Sb30501 apresenta um aumento de expressão na amostra 50% reidratada menor que duas vezes. Para os transcritos *Down regulated*, da figura, os resultados são coerentes entre as metodologias testadas para os transcritos Sb62763 e Sb60875 e incoerente para o Sb29.

CONCLUSÕES

A caracterização de genes relacionados a processos biológicos envolvidos no estresse hídrico em sorgo é de grande importância para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes a esse estresse. Isso poderia ser realizado tanto com a obtenção de transgênicos como com a transferência de genes via programa de melhoramento. No entanto, a complexidade do estresse de seca faz com que a identificação de genes específicos para transgenia ou transferência gênica seja difícil. Uma das alternativas é o estudo extensivo da expressão gênica em diferentes genótipos e em diferentes situações com extensiva análise de transcriptomas. Nesse trabalho, foram levantados genes expressos em dois diferentes genótipos e dois regimes hídricos. Alguns desses genes foram analisados por qPCR para verificar se os resultados de diferença de expressão são consistentes. O sequenciamento por RNAseq trouxe um avanço em relação as análises realizadas por microarranjos. Ambos métodos são robustos, mas em alguns casos o microarranjo ainda depende de hibridização cruzada trazendo pouco informação entre membros de família gênica. Por outro lado, o

RNAseq por sua vez depende de extensa análise de bioinformática. Apesar disso, é um método mais robusto e informativo. Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram consistência dos dados de RNAseq e qPCR principalmente para os transcritos que foram mais expressos (*Up regulated*) sob a condição de estresses. Para aqueles que têm expressão igual houve incoerência de resultados e para *Down regulated*, os resultados foram medianamente coerentes. Novas análises de qPCR serão realizadas para confirmar os resultados, entretanto os resultados de RNAseq são importantes para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na tolerância de sorgo ao estresse de seca.

AGRADECIMENTOS

Esse projeto teve a participação da FAPEMIG e Embrapa.

REFERÊNCIAS

- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.
- Deyholos, M. K. (2010), Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, Cell & Environment*, 33: 648–654.
- Livak, J. K., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, *Methods* 25 p402-408.
- Maere S¹, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005 Aug 15;21(16):3448-9. Epub 2005 Jun 21.
- Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35:299–31.
- Reynolds M., Tuberosa R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol*. 11, 171–179 10.1016.
- Shannon P¹, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498-504.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"



Influência de diferentes meios de cultura na transformação genética de milho tropical

Rafaeli Aparecida Vieira de Souza⁽²⁾; Meire de Cassia Alves⁽¹⁾; Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Newton Portilho Carneiro⁽¹⁾; Aluizio Borém⁽²⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽¹⁾

⁽¹⁾ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: meire.alves@embrapa.br. ⁽²⁾ Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36570-900, Viçosa, MG

RESUMO: A eficiência da transformação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* é influenciada por vários parâmetros. Este estudo teve como objetivo testar a eficiência de duas metodologias na geração de eventos transgênicos da linhagem elite tropical L3. Embriões imaturos foram transformados utilizando *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pTF102 que contém os genes *uidA* e *bar*. A principal diferença entre os dois processos de transformação foi a concentração de sais N6 utilizada nos meios de infecção e co-cultivo (100% ou 50%). Análises histoquímicas mostraram que a expressão do gene *gus* foi mais intensa nos embriões cultivados nos meios de cultura com a concentração de sais reduzida (50%), mas esta concentração foi menos eficiente para a regeneração de plantas. A taxa de eventos transgênicos produzidos foi 3% e 1,1% para 100% e 50% da concentração de sais de N6, respectivamente.

Termos de indexação: *Zea mays*; *Agrobacterium tumefaciens*; transgênico.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo. No Brasil, a produção de milho para a safra 2015/2016 foi de 79,95 milhões de toneladas cultivadas em 15,6 milhões de hectares (CONAB, 2016), consolidando o país como o terceiro maior produtor mundial. Entretanto, há poucos estudos voltados para a produção de milho geneticamente modificado a partir de linhagens tropicais.

A principal limitação para a aplicação da tecnologia de transformação genética é a seleção de germoplasma tropical responsivo à regeneração em cultura de tecidos e à infecção via *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação e a regeneração são altamente influenciadas pelo tipo de explante utilizado e pela composição do meio de cultura (Armstrong; Green, 1985; Bohorova et al. 1995). Embriões zigóticos imaturos são os tipos de explantes com maior eficiência de regeneração,

mais responsivos à transformação genética e com maior capacidade de geração de plantas transgênicas (Frame et al, 2002; Vega et al, 2008).

Os sais N6 (Chu et al, 1975) e MS (Murashige; Skoog, 1962) são amplamente utilizados no cultivo *in vitro* e na transformação genética de milho (Ishida et al., 1996; Frame et al., 2002; Vega et al., 2008). Calos embriogênicos são normalmente formados quando embriões imaturos são cultivados em meios de cultura suplementados com auxinas, como o 2,4-D ou Dicamba (Armstrong; Green, 1985; Frame et al, 2002). A concentração de sais no meio de cultura é um importante fator capaz de influenciar a eficiência da transformação genética. A seleção de genótipos de milho para obter plantas transgênicas baseia-se na capacidade de regeneração *in vitro* e eficiência de infecção via *Agrobacterium*. Um genótipo ideal para a produção de plantas transgênicas comerciais também deve ter uma alta performance agrônômica.

O objetivo deste estudo foi verificar a influência de diferentes meios de cultura de tecido na transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, da linhagem tropical L3 da Embrapa Milho e Sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e preparo da *Agrobacterium tumefaciens*

Embriões imaturos entre 1,8 e 2,0 mm foram isolados da linhagem de milho tropical L3 pertencente a Embrapa Milho e Sorgo e utilizados nos experimentos de transformação. Foram usados 250 embriões por tratamento.

A *Agrobacterium tumefaciens* utilizada foi a estirpe desarmada EHA 101 contendo o vetor binário pTF102 (Paz et al., 2004). Este plasmídeo contém o gene marcador de seleção *bar* e o gene repórter *uidA* (*gus*), ambos controlados pelo promotor CaMV35S. Duas horas antes da infecção dos embriões com a *Agrobacterium*, esta foi ressuspensa, separadamente, em dois meios de

infecção distintos - Infecção I e Infecção II (N6 sais e vitaminas, 68,4 g L⁻¹ sacarose, 36 g L⁻¹ glicose, 0,7 g L⁻¹ prolina, 0,25 g L⁻¹ cefotaxima, 1,5 mg L⁻¹ 2,4D, 100 µM L⁻¹ acetoseringona e 3 g L⁻¹ Phytigel, pH 5,2), até obter uma OD₅₅₀ entre 0,3 e 0,4. A diferença entre os meios I e II foi a concentração de sais presentes, sendo esta 100 e 50%, respectivamente. As soluções bacterianas foram incubadas a 22°C, sob agitação de 100 rpm.

Transformação genética de embriões da linhagem L3 via *Agrobacterium tumefaciens*

O processo de transformação genética ocorreu de acordo com Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008), com algumas modificações. Após a infecção embriões imaturos foram transferidos para meio de co-cultivo I e II (N6 sais e vitaminas, 30 g L⁻¹ sacarose, 0,7 g L⁻¹ prolina, 0,25 g L⁻¹ cefotaxima, 1,5 mg L⁻¹, 2,4-D, 100 µM L⁻¹ acetoseringona, 0,85 mg L⁻¹ nitrato de prata, 3 mg L⁻¹ L-cisteína e 3 g L⁻¹ Phytigel, pH 5,8) contendo 100% e 50% da concentração de sais N, respectivamente. Os demais meios utilizados durante as fases de seleção, maturação e germinação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados na transformação genética de embriões de milho tropical via *Agrobacterium tumefaciens*.

Meios	Composição
Repouso	Meio N6 sais e vitaminas contendo (30 g L ⁻¹ de sacarose + 0,7 g L ⁻¹ prolina + 0,5 g L ⁻¹ MES + 0,85 mg L ⁻¹ nitrato de prata + 0,25 g L ⁻¹ cefotaxima + 10 mg L ⁻¹ 2,4D e 3 g L ⁻¹ Phytigel, pH 5,8)
Seleção I	Meio N6 sais e vitaminas + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 0,7 g L ⁻¹ prolina + 0,5 g L ⁻¹ MES + 0,25 g L ⁻¹ cefotaxima + 10 mg L ⁻¹ 2,4D + 1,5 mg L ⁻¹ de Finale® e 3 g L ⁻¹ e Phytigel, pH 5,8)
Seleção II	Seleção I com 3,0 mg L ⁻¹ de Finale®
Maturação	MS sais e vitaminas + 60 g L ⁻¹ sacarose + 3 g L ⁻¹ phytigel e pH 5,8
Germinação	MS sais e vitaminas + 30 g L ⁻¹ sacarose + 3 g L ⁻¹ phytigel e pH 5,8

A etapa de seleção iniciou com a transferência dos calos para o meio de Seleção I (N6 sais e vitaminas; 30 g/L sacarose, 0,7 g/L prolina, 0,5 g/L MES; 0,25 g/L cefotaxina; 10 mg/L 2,4-D; 3 g/L phytigel) suplementado com 1,5 mg/L do herbicida Bialaphos® e mantidos a 28°C, no escuro, por duas semanas.

Calos embriogênicos selecionados foram transferidos para o meio de Seleção II suplementado com 3,0 mg/L do herbicida

Bialaphos® e mantidos a 28°C, no escuro, por duas semanas.

Em seguida, os calos selecionados foram transferidos para o meio de Maturação (MS sais e vitaminas; 60 g/l sacarose; 1,25 mg/L CuSO₄, 3 g/L fitagel) e mantidos por três a quatro semanas, a 28°C, no escuro. Embriões maturados foram transferidos para meio de Germinação (MS sais e vitaminas; 30 g/l sacarose; 3 g/L fitagel) por duas semanas. Plântulas com cerca de 5,0 cm de comprimento e com um sistema radicular desenvolvido foram aclimatadas em casa de vegetação e tratadas com 500 mg/L do herbicida Finale® para seleção dos eventos transgênicos a partir da expressão do gene de resistência *bar*.

Análise histoquímica do gene *gus*

A expressão do gene repórter *gus* foi verificada por meio do ensaio histoquímico (Jefferson et al. 1987) em 25 embriões após o período de co-cultivo e em 10 calos embriogênicos depois da etapa de seleção. A presença ou ausência da coloração azul nos embriões e nos calos foi identificada utilizando o estereoscópio da Zeiss, Axio Zoom.V16.

Análise molecular dos eventos transgênicos

A presença da construção genética foi verificada por análise de PCR usando o DNA genômico das folhas dos eventos transgênicos (Saghai-Maroo et al., 1984). Foi utilizado o par de primer para detectar o gene *bar*, o qual amplificou um fragmento de 407 pb.

Análise estatística

As duas metodologias testadas foram avaliadas por meio da comparação da porcentagem de embriões e calos GUS positivos. Também foi verificado o número de calos transgênicos e o número de eventos obtidos. Para a análise de variância foi utilizado o software R (R Core Team) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene repórter *uidA (gus)* foi utilizado para comparar a eficiência de transformação de embriões imaturos de milho da linhagem tropical L3, via *Agrobacterium tumefaciens*. Geralmente, condições que permitem uma alta expressão do gene repórter após o período de co-cultivo são associadas com a alta frequência de produção de eventos transgênicos (Vega et al., 2008).

Após o co-cultivo com a *Agrobacterium*, mais de

70% dos explantes de L3 foram infectados, apresentando expressão transiente do gene *gus*, independentemente do meio de cultura utilizado. Um elevado número de embriões expressou o gene *gus* no tratamento que utilizou a concentração padrão de sais N6 (100%) nos meios de infecção e co-cultivo em comparação ao tratamento com baixa concentração de sais N6 (50%). Entretanto, o ensaio histoquímico revelou que a expressão do gene foi mais intensa nos embriões cultivados nos meios de cultura com a concentração de sais reduzida (50%) (Figura 1A e 1B).

Após a etapa de seleção, um elevado número de calos expressando o gene *gus* foi verificado para o Tratamento I (100%), confirmando que a concentração padrão de sais N6 foi mais eficiente na transformação da linhagem de milho L3. A maioria dos embriões que foram mantidos no meio de cultura com baixa concentração de sais N6 apresentou um baixo desenvolvimento. Vega et al. (2008) relataram que apesar da baixa concentração de sais (10%) aumentar a eficiência da transformação de explantes de milho Hill, o desenvolvimento embriogênico dos explantes foi reduzido.

Um total de 106 calos que sobreviveram ao meio de Seleção II cresceu rapidamente, apresentando aspecto friável (Figura 1D e 1E). Desse total, 61 calos foram cultivados no Tratamento I e 45 calos foram cultivados no Tratamento II. Todos os calos foram transferidos para o meio de maturação. A maturação ocorreu dentro de um período de 20 a 45 dias, independente do tratamento que foi utilizado. Apenas 42,62% dos calos cultivados no Tratamento I e 20% dos calos cultivados no Tratamento II regeneraram e maturaram. Os calos maturados foram transferidos para o meio de germinação e posteriormente, as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação (Figura 1G, 1H e 1I). A integração do transgene foi confirmada por meio de aplicação de herbicida nas plântulas da geração T1 (Figura 1I).

Em relação ao ensaio histoquímico após o período de co-cultivo, 89,66% dos embriões gerados a partir do Tratamento 1 e 74% dos embriões do Tratamento 2 foram positivos. Após a etapa de Seleção, 53% dos calos produzidos a partir do Tratamento 1 e 24,66% dos calos gerados do Tratamento 2 foram positivos no ensaio histoquímico. A eficiência de transformação foi de 3% para o Tratamento 1 e 1,1% para o Tratamento 2, o que também foi verificado pelo ensaio histoquímico. O número de plantas transgênicas obtidas foi superior no Tratamento 1, que utilizou a concentração padrão de sais N6. A baixa concentração de sais N6 pode não ter sido efetiva para a produção de plantas transgênicas por causa

da baixa eficácia de formação e desenvolvimento dos calos embriogênicos neste Tratamento.

A análise de PCR foi realizada em todos os 35 eventos que foram gerados a partir dos Tratamentos 1 e 2. A amplificação do gene *bar* presente no vetor binário pTF102 foi verificada em todos os eventos transgênicos (Figura 2A). As análises de PCR em Tempo Real (qPCR) confirmaram a expressão dos genes *uidA* e *bar* (Figura 2B). Como observado para a maioria das plantas transgênicas geradas a partir da transformação via *Agro. tumefaciens*, um baixo número de cópias dos transgenes estava presente nos eventos produzidos (Figura 2C).

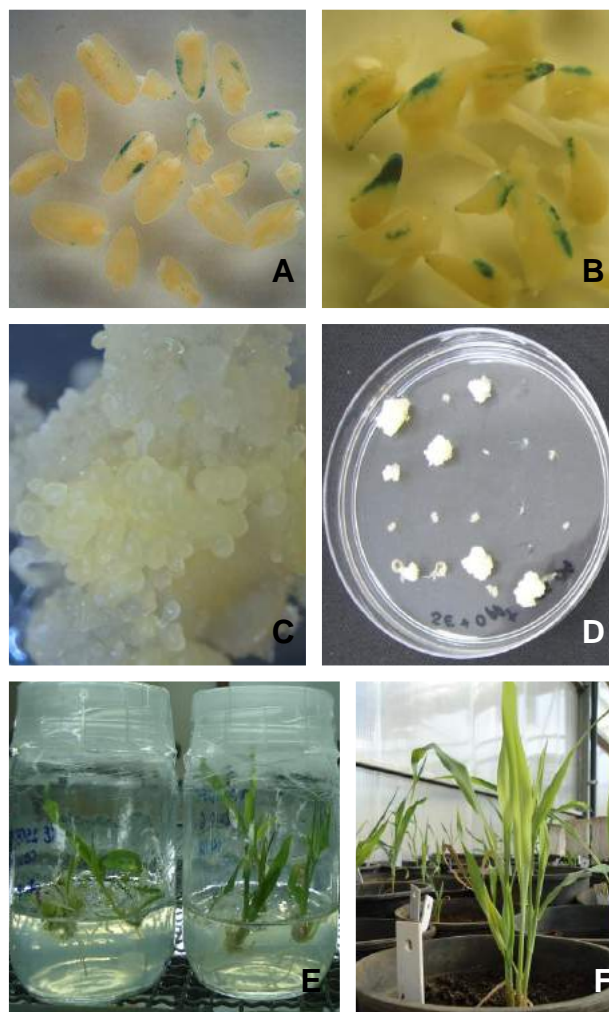


Figura 1: Transformação genética de milho L3. (A-B) Histoquímica do gene *gus*; (A) Infecção com 100% e (B) 50% de N6 sais; (C) Calo embriogênico de L3; (D) Calos transgênicos em seleção; (E) Planta transgênica no meio de germinação; (F) Plantas em casa de vegetação.

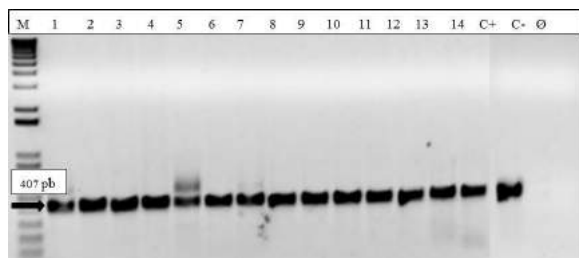


Figura 2: Análise de PCR dos eventos transgênicos. (A) Amplificação do DNA genômico de 14 eventos; (M) Marcador molecular 1 kb; (1 a 9) plantas transgênicas geradas utilizando o Tratamento 1; (10 a 14) plantas transgênicas geradas utilizando o Tratamento 2; (P) vetor pTF102; (N) milho não transgênico; (Ø) branco da reação.

CONCLUSÕES

A transformação da linhagem de milho L3 via *Agrobacterium tumefaciens* foi possível ainda que tenha apresentado uma baixa eficiência.

O Tratamento I, onde a concentração de sais foi de 100%, foi mais eficiente na produção de eventos transgênicos que o Tratamento II que apresentava 50% da concentração de sais.

Portanto, a concentração de sais no meio de cultura influenciou diretamente no processo de transformação genética e na geração de plantas transgênicas.

AGRADECIMENTOS

EMBRAPA, Fapemig e CNPq.

REFERÊNCIAS

Armstrong, C.L; Green, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214. 1985.

Barros, B. A; Guimarães, C.T; Lana, U. G. P; Pôssa, K.F; Andrade, L.C.S.S; Silva, V.L; Lopes, F.A; Carneiro, A. A; Carneiro, N.P. Estimativa do número de inserções de transgene em milho por PCR quantitativo (qPCR). *Circular Técnica* 164. Embrapa Milho e Sorgo. 2011.

Bohorova, N.E; Luna, B; Brito, R.M; Huerta, L.D; Hoisington, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40: 275-281. 1995.

Chu, C.C; Wang, C.C; Sun, C.S; Hsu, C; Yin, K.C; Chu, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica* 16: 659-668. 1975.

CONAB - Companhia nacional de abastecimento. Safra 2015/2016. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_09_03_26_boletim_graos_maio_2016.pdf>.

Frame, B. R.; Shou, H.; Chikwamba. R. K.; Zhang, Z.; Xiang, C.; Fonger, T. M.; Pegg. E. K.; LI, B.; Nettleton, D. S.; Pei, D.; Wang, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 129, p. 13-22, 2002.

Ingham, D.J; Beer, S; Money, S; Hansen, G. Quantitative real-time assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques* 31: 132-140. 2001.

Ishida, V; Saito, H; Ohta, S; Hiei, Y; Komari, T; Kumashiro, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 6: 745-750. 1996.

Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405. 1987.

Livak, K.J; Schmittgen, T.D. Analysis de relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Method* 25: 402-408. 2001.

Murashige, T; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497. 1962.

Olhoft, P.M; Somers, D.A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reporter* 20: 706-711. 2001.

Paz, M.M; Shou, H; Guo, Z; Zhang, Z; Banerjee, A.K; Wang, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167-179. 2004.

Saghai-Marouf, M.A; Soliman, K.M; Jorgensen, R.A; Allard, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings National Academy of Science of the United States of America* 81: 8014-8018. 1984.

Vega, J.M; Yu, W; Kennon, A; Chen, X; Zhang, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reporter* 27: 297-305. 2008.,



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

“Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar”

Influência do tipo e da concentração de auxina na formação de calos embriogênicos de linhagem de milho tropical

Rafaeli Aparecida Vieira De Souza (1); Kamila Ellen Souza de Oliveira (2); Meire de Cássia Alves (3); Newton Portilho Carneiro (4); Aluizio Borém (5); Andréa Almeida Carneiro (6).

(1) Professora e pesquisadora; Universidade Estado da Bahia; Paulo Afonso, BA; rafaeli.vieira@hotmail.com; (2) Estudante graduação; Universidade Federal de São João Del Rei; (3) Analista; Meire de Cássia Alves; Embrapa Milho e Sorgo; (4) Pesquisador; Newton Portilho Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo; (5) Professor e pesquisador; Universidade Federal de Viçosa; (6) Pesquisadora; Andréa Almeida Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Protocolos de regeneração *in vitro* de milho tropical são essenciais para a produção de plantas transgênicas. A metodologia mais estudada para a regeneração de milho *in vitro* é a embriogênese somática. O objetivo deste trabalho foi avaliar três meios de cultivo para a indução de calos embriogênicos, baseados em N6 ou MS sais contendo diferentes concentrações das auxinas 2,4-D ou Dicamba, para a produção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos da linhagem de milho tropical elite L3. Após desenvolvimento dos calos, eles foram transferidos para meio de maturação MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP, ANA e CuSO₄. A linhagem testada apresentou excelente formação de calos embriogênicos dos tipos I e II. A formação de calos tipo I foi favorecida em meio basal N6 contendo baixas concentrações de 2,4-D, enquanto que a de calos tipo II foi maior em concentração acima de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Alta eficiência de formação de calos do tipo I também foi obtida em meio basal N6 suplementado com concentrações entre 1 e 4 mg L⁻¹ de Dicamba. A maturação e regeneração dos calos foi favorecida pela adição de CuSO₄ no meio de cultura. Os testes e tratamentos adotados mostraram que é possível estabelecer protocolos eficientes de regeneração de diferentes genótipos de milho tropical.

Termos de indexação: embriões imaturos, cultivo *in vitro*, hormônios vegetais.

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como o terceiro maior produtor de milho, com uma produção média esperada de 81,2 milhões de toneladas para a safra 2016, segundo informativo do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sua importância econômica varia entre fonte de alimentação humana e animal e, fonte de matéria prima para produtos industrializados (Gorji et al., 2011). Tal importância reforça a necessidade de pesquisas cada vez mais avançadas, em áreas tais

como melhoramento genético e biotecnológico visando maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos.

A transformação genética e a regeneração de plantas *in vitro* são essenciais para a aplicação das modernas técnicas de biologia molecular no melhoramento de genótipos tropicais de milho. O estabelecimento de um sistema de regeneração eficiente é um dos fatores limitantes para a aplicação da técnica na maioria dos genótipos de milho (Ombori et al., 2008). As metodologias utilizadas para regenerar uma planta são a organogênese e a embriogênese somática, sendo que a última é a mais utilizada para genótipos de milho.

O tipo de explante utilizado influencia a eficiência da regeneração *in vitro*. Os principais estudos na área utilizam embriões zigóticos imaturos. Eles são capazes de gerar calos embriogênicos dos tipos I e II (Gorji et al., 2011). Ambos os calos são capazes de regenerar plantas, mas o tipo II, mais friável e altamente embriogênico, apresenta crescimento mais rápido e é capaz de formar um maior número de embriões e pode ser mantido por um tempo maior em cultivo.

Os calos tipo II são mais difíceis de serem obtidos, uma vez que poucos genótipos de milho expressam esta característica em meio de cultura. Para a indução de calos embriogênicos é mais comum a utilização de linhagens e híbridos adaptados à regiões de clima temperado (Santos-Serejo & Aguiar-Perecin, 2000), porém alguns trabalhos já apresentam resultados positivos para a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de linhagens tropicais. A possibilidade de manipular tais genótipos acelera o melhoramento de linhagens de milho tropical. Faz-se necessário então, obter um genótipo tropical com alta resposta à embriogênese e ao cultivo *in vitro* e que apresente desempenho similar aos genótipos comerciais.

A composição dos meios de cultura utilizados influencia no sucesso da regeneração de plantas.

Para o cultivo *in vitro* de milho é mais comum utilizar formulações com base em Murashige & Skoog (1962) ou Chu et al. (1975). Para a formação dos calos embriogênicos estes meios basais são suplementados normalmente com auxinas tais como, 2,4-D ou dicamba. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de indução e regeneração de calos embriogênicos para a linhagem elite de milho tropical L3, testando a capacidade dos embriões zigóticos imaturos em formar calos em três meios de indução diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os embriões imaturos utilizados durante o experimento foram obtidos de plantas de milho da linhagem elite L3, cultivados em canteiros na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Eles foram isolados das espigas com aproximadamente 1,5 e 2,0 mm de comprimento, 10 a 15 dias após a polinização.

Para esterilização superficial das espigas, estas foram imersas em uma solução de 50% água sanitária comercial acrescida de duas gotas de Tween 20, por 40 min, sob agitação. Em seguida, dentro de fluxo laminar elas foram enxaguadas três vezes com água destilada estéril e os embriões foram isolados com o auxílio de uma espátula estéril.

Cultivo dos embriões em meios de cultura

Os embriões imaturos foram cultivados em três diferentes meios de cultura, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo (**Tabela 1**). Os meios testados foram M1, M2 e M3, sendo que M1 e M2 continham N6 sais e foram baseados em trabalhos de Chu et al. (1975), e M3 continha MS sais e foi baseado em Carvalho et al. (1997). Os tratamentos foram suplementados com diferentes concentrações de auxina: para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) testou-se as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 30,0 mg L⁻¹, e para o ácido 3,6-dicloro-o-anísico (Dicamba) as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹, totalizando 36 tratamentos. A composição dos meios de culturas está detalhada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos.

Meio	Composição
M1	N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 100 mg L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 100 mg L ⁻¹ de myo-inositol; 2,9 g L ⁻¹ de L-prolina; 15 mg

L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M2 N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de hidrolisado de caseína; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina; 0,01 g L⁻¹ de MES; 5,5 mg L⁻¹ de glicina; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M3 MS Sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962); 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,7 g L⁻¹ de L-prolina; 0,5 g L⁻¹ de MES; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ Phytigel; pH 5,8.

A cada 14 dias os calos formados foram transferidos para novo meio de cultura. Após três transferências, ou seja, ao final de 42 dias, os calos foram avaliados e a formação de calos Tipo I ou Tipo II foi quantificada. O trabalho foi avaliado usando um fatorial triplo 3x2x6, onde os fatores avaliados foram: (i) Fator 1: Meios de cultura; (ii) Fator 2: Tipo de auxina; (iii) Fator 3: Concentração de auxina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Para cada repetição utilizou-se 24 embriões imaturos, totalizando 96 embriões por tratamento. A variável analisada foi percentagem de calos Tipo I e Tipo II e o software utilizado foi o programa R (R Core Team, 2015).

Maturação e regeneração dos calos

Apenas os calos obtidos a partir do meio que apresentou melhor resultado para indução de calos embriogênicos foram utilizados para testes de maturação. Os calos selecionados foram divididos em 16 novos tratamentos, em meio que favorece a maturação: MS sais e vitaminas (60 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de myo-inositol; 6 g L⁻¹ Phytigel) ou 1,25 mg L⁻¹ de CuSO₄ (Cho et al., 2014); combinações de 6-benzil-amino-purina (6-BAP), nas concentrações de 0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹; e ácido naftaleno acético (ANA) nas concentrações de 0; 1,0 mg L⁻¹. Os calos foram mantidos nos meios durante 42 dias, a 27 °C, no escuro.

Os embriões maduros que apresentaram coloração branca opaca foram transferidos para frascos Magenta (Sigma/Brasil) contendo meio MS sem regulador de crescimento e foram incubadas a 27 °C, sob fotoperíodo de 16 horas, até germinação, cerca de duas semanas.

Para avaliação destes resultados foi utilizado um duplo fatorial 8x2, onde os fatores eram: (i) Fator 1: regulador de crescimento; (ii) Fator 2: CuSO₄. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em quatro embriões somáticos, num total de 20 calos por tratamento. As variáveis analisadas foram:

porcentagem de maturação dos calos e número de plantas germinadas. O software utilizado foi o programa R (R Testemunho Team, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já descrito por Feher (2015), a composição do meio afeta o desempenho do explante utilizado e a embriogênese só é iniciada após uma combinação de condições. A influência da auxina na capacidade dos embriões imaturos L3 em formar calos embriogênicos foi claramente observada nesse trabalho, com variações nos resultados devido ao tipo e à concentração utilizada. Para o fator formação de calos, a análise estatística apontou que a formação de calos Tipo I reduz conforme aumenta a concentração de 2,4-D. Comparativamente, os meios com Dicamba formam mais calos Tipo I, que foram favorecidos nos meios M2 e M3, onde a formação aumentou com a concentração de Dicamba até 1 mg L⁻¹, estabilizando-se depois. Ao contrário do comportamento observado para M2 e M3, em M1 a elevação da concentração de Dicamba foi acompanhada por um aumento das porcentagens de formação de calo do Tipo I (Figura 1).

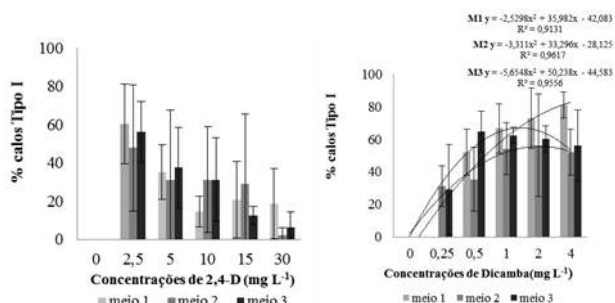


Figura 1. Porcentagem de calos Tipo I obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

A análise estatística revelou ainda uma interação entre os fatores meios de cultura, tipo e concentração de auxinas, utilizados para induzir calos Tipo II. No meio M1 suplementado com 10 a 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, houve maior porcentagem de calos Tipo II, com elevado número de embriões na fase global, sendo que a maior produção ocorreu em concentrações maiores ou iguais a 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para Dicamba, independentemente do meio, a quantidade mínima requerida para a formação de calos Tipo II foi 2 mg L⁻¹. No entanto, a geração de calo Tipo II na presença de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foi mais expressiva do que em presença de 2 mg L⁻¹ de Dicamba (Figura 2).

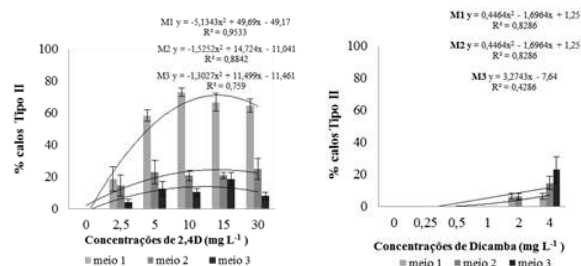


Figura 2. Porcentagem de calos Tipo II obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

Há trabalhos que recomendam tanto 2,4-D quanto Dicamba para formação de calos Tipo II a partir de embriões zigóticos de milho. Neste estudo, constatou-se que as concentrações testadas de Dicamba não foram adequadas para alcançar altos níveis de formação de calos Tipo II para a linhagem elite L3. Entretanto, a combinação do meio M1 com 4 mg L⁻¹ de Dicamba resultou em mais de 80% de formação do calo Tipo I. Este calo também pode ser usado para regenerar plantas transgênicas de milho, embora com eficiência mais baixa. Nas menores concentrações de 2,4-D ou nas doses testadas de Dicamba houve a formação predominante de calo do Tipo I, independente do tratamento.

A formação de embriões somáticos pode ser explicada pela interação das condições ambientais ou dos níveis endógenos de hormônio, que dependem do genótipo e da fase de desenvolvimento do explante (Feher, 2015).

A maturação de embriões é um processo que ocorre antes da germinação de plântulas. Neste trabalho o único fator que influenciou a maturação dos calos foi a presença de CuSO₄ no meio de cultura. Estudos de Cho et al. (2014) demonstraram que o aumento da quantidade de cobre no meio de cultura melhora a regeneração de culturas de calo de milho, uma vez que este é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas, atuando como ativador ou constituinte de enzimas. Tais resultados diferem dos encontrados por Ombori et al. (2008), que relatou que BAP e ANA foram eficazes na maturação de embriões somáticos de milho. Durante o período de 42 dias, houve uma maior porcentagem de maturação dos calos nos tratamentos em que CuSO₄ estava presente (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem média de calos maturados e número de plantas de milho regeneradas na presença ou na ausência de CuSO₄.

Tratamentos	Calos maturados (%)	Nº de plantas regeneradas (%)
Com CuSO ₄	92,5 a	9,0
Sem CuSO ₄	76,87 b	4,8
CV %	27,44	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Estudos têm demonstrado que um aumento do nível do cobre no meio de cultura melhora a regeneração de calos embriogênicos de milho (Cho et al., 2014).

A linhagem L3 mostrou-se eficiente na capacidade embriogênica *in vitro* e foi capaz de regenerar plantas completas e férteis (Figura 3). Além disso, esta linhagem tropical tem excelente aptidão agrônômica, o que a torna uma boa opção para ser utilizada em transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística.

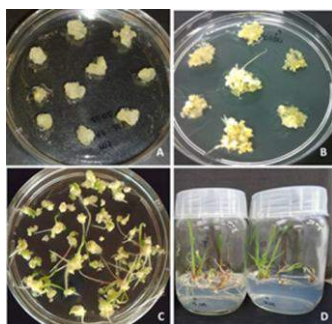


Figura 3. (A) Formação de calos após 4 semanas de cultivo em meio N6 suplementado com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D; (B) Maturação após 3 semanas de cultivo no teor médio de CuSO₄; (C) Germinação dos calos; (D) Regeneração de plântulas de milho.

CONCLUSÕES

Meio M1 é eficiente para induzir a formação de calos tipo I (4 mg L⁻¹ Dicamba) e tipo II (10 mg L⁻¹ 2,4-D) na linhagem tropical de milho L3.

A presença de CuSO₄ no meio de cultura aumenta a maturação dos calos tipo II e a regeneração de plantas de milho.

O protocolo de regeneração desenvolvido mostrou ser eficiente para regenerar células transgênicas a partir de embriões zigóticos imaturos.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, à Fapemig e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ABEBE, D. Z.; TEFFERA, W.; MACHUKA J. S. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2181-2186, 2008.

ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; HILSON, P.; LIJSEBETTENS, M.V.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 285-295, 2010.

CHO, M. J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER III, J. C.; JONES T. J.; ZHAO Z. Y. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Plant Cell Rep**, v.33, p.1767-1777, 2014.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.16, p.659-668, 1975.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochim. Bioph. Acta**, v.1849, p.385-402, 2015.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M.L.; TAYLOR, K.W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Rep**, v.25, p.1024-1034, 2006.

GONZALÉZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D. ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 15, n. 1, 2012.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. In vitro plant generation of tropical maize genotypes. In: International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology, 2001, Singapura, 2011, v. 16, p. 52-59.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf)>. Acesso em 14 de maio de 2016.

LUCENA, A. L. M.; ELOI, I. B. O.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Embriogênese somática em milho: trajetória e eficiência. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 33-77, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology*, v.15, p.473-497, 1962.

OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. R. L. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidas a partir de calos. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

VASCONCELOS, M. J. V.; FONTES, M. A.; CARVALHO, C. H. S.; LOPES, M. A. Regeneração in vitro de milho tropical de alta qualidade proteica. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2009.

Influência do tipo e da concentração de auxina na formação de calos embriogênicos de uma linhagem tropical de milho

Rafaeli Aparecida Vieira De Souza (1); Kamila Ellen Souza de Oliveira (2); Meire de Cássia Alves (3); Newton Portilho Carneiro (4); Aluizio Borém (5); Andréa Almeida Carneiro (6).

(1) Professora e pesquisadora; Universidade Estado da Bahia; Paulo Afonso, BA; rafaeli.vieira@hotmail.com; (2) Estudante graduação; Universidade Federal de São João Del Rei; (3) Analista; Meire de Cássia Alves; Embrapa Milho e Sorgo; (4) Pesquisador; Newton Portilho Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo; (5) Professor e pesquisador; Universidade Federal de Viçosa; (6) Pesquisadora; Andréa Almeida Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Protocolos de regeneração *in vitro* de milho tropical são essenciais para a produção de plantas transgênicas. A metodologia mais estudada para a regeneração de milho *in vitro* é a embriogênese somática. O objetivo deste trabalho foi avaliar três meios de cultivo para a indução de calos embriogênicos, baseados em N6 ou MS sais contendo diferentes concentrações das auxinas 2,4-D ou Dicamba, para a produção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos da linhagem de milho tropical elite L3. Após desenvolvimento dos calos, eles foram transferidos para meio de maturação MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP, ANA e CuSO_4 . A linhagem testada apresentou excelente formação de calos embriogênicos dos tipos I e II. A formação de calos tipo I foi favorecida em meio basal N6 contendo baixas concentrações de 2,4-D, enquanto que a de calos tipo II foi maior em concentração acima de 5 mg L^{-1} de 2,4-D. Alta eficiência de formação de calos do tipo I também foi obtida em meio basal N6 suplementado com concentrações entre 1 e 4 mg L^{-1} de Dicamba. A maturação e regeneração dos calos foi favorecida pela adição de CuSO_4 no meio de cultura. Os testes e tratamentos adotados mostraram que é possível estabelecer protocolos eficientes de regeneração de diferentes genótipos de milho tropical.

Termos de indexação: embriões imaturos, cultivo *in vitro*, hormônios vegetais.

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como o terceiro maior produtor de milho, com uma produção média esperada de 81,2 milhões de toneladas para a safra 2016, segundo informativo do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sua importância econômica varia entre fonte de alimentação humana e animal e, fonte de matéria prima para produtos industrializados (Gorji et al., 2011). Tal importância reforça a necessidade de pesquisas cada vez mais avançadas, em áreas tais

como melhoramento genético e biotecnológico visando maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos.

A transformação genética e a regeneração de plantas *in vitro* são essenciais para a aplicação das modernas técnicas de biologia molecular no melhoramento de genótipos tropicais de milho. O estabelecimento de um sistema de regeneração eficiente é um dos fatores limitantes para a aplicação da técnica na maioria dos genótipos de milho (Ombori et al., 2008). As metodologias utilizadas para regenerar uma planta são a organogênese e a embriogênese somática, sendo que a última é a mais utilizada para genótipos de milho.

O tipo de explante utilizado influencia a eficiência da regeneração *in vitro*. Os principais estudos na área utilizam embriões zigóticos imaturos. Eles são capazes de gerar calos embriogênicos dos tipos I e II (Gorji et al., 2011). Ambos os calos são capazes de regenerar plantas, mas o tipo II, mais friável e altamente embriogênico, apresenta crescimento mais rápido e é capaz de formar um maior número de embriões e pode ser mantido por um tempo maior em cultivo.

Os calos tipo II são mais difíceis de serem obtidos, uma vez que poucos genótipos de milho expressam esta característica em meio de cultura. Para a indução de calos embriogênicos é mais comum a utilização de linhagens e híbridos adaptados à regiões de clima temperado (Santos-Serejo & Aguiar-Perecin, 2000), porém alguns trabalhos já apresentam resultados positivos para a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de linhagens tropicais. A possibilidade de manipular tais genótipos acelera o melhoramento de linhagens de milho tropical. Faz-se necessário então, obter um genótipo tropical com alta resposta à embriogênese e ao cultivo *in vitro* e que apresente desempenho similar aos genótipos comerciais.

A composição dos meios de cultura utilizados influencia no sucesso da regeneração de plantas.

Para o cultivo *in vitro* de milho é mais comum utilizar formulações com base em Murashige & Skoog (1962) ou Chu et al. (1975). Para a formação dos calos embriogênicos estes meios basais são suplementados normalmente com auxinas tais como, 2,4-D ou dicamba. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de indução e regeneração de calos embriogênicos para a linhagem elite de milho tropical L3, testando a capacidade dos embriões zigóticos imaturos em formar calos em três meios de indução diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os embriões imaturos utilizados durante o experimento foram obtidos de plantas de milho da linhagem elite L3, cultivados em canteiros na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Eles foram isolados das espigas com aproximadamente 1,5 e 2,0 mm de comprimento, 10 a 15 dias após a polinização.

Para esterilização superficial das espigas, elas foram emersas em uma solução de 50% água sanitária comercial acrescida de duas gotas de Tween 20, por 40 min, sob agitação. Em seguida, dentro de fluxo laminar elas foram enxaguadas três vezes com água destilada estéril e os embriões foram isolados com o auxílio de uma espátula estéril.

Cultivo dos embriões em meios de cultura

Os embriões imaturos foram cultivados em três diferentes meios de cultura, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo (**Tabela 1**). Os meios testados foram M1, M2 e M3, sendo que M1 e M2 continham N6 sais e foram baseados em trabalhos de Chu et al. (1975), e M3 continha MS sais e foi baseado em Carvalho et al. (1997). Os tratamentos foram suplementados com diferentes concentrações de auxina: para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) testou-se as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 30,0 mg L⁻¹, e para o ácido 3,6-dicloro-o-anísico (Dicamba) as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹, totalizando 36 tratamentos. A composição dos meios de culturas é detalhada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos.

Meio	Composição
M1	N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 100 mg L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 100 mg L ⁻¹ de myo-inositol; 2,9 g L ⁻¹ de L-prolina; 15 mg

L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M2 N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de hidrolisado de caseína; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina; 0,01 g L⁻¹ de MES; 5,5 mg L⁻¹ de glicina; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M3 MS Sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962); 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,7 g L⁻¹ de L-prolina; 0,5 g L⁻¹ de MES; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ Phytigel; pH 5,8.

A cada 14 dias os calos formados foram transferidos para novo meio de cultura. Após três transferências, ou seja, ao final de 42 dias, os calos foram avaliados e a formação de calos Tipo I ou Tipo II foi quantificada. O trabalho foi avaliado usando um fatorial triplo 3x2x6, onde os fatores avaliados foram: (i) Fator 1: Meios de cultura; (ii) Fator 2: Tipo de auxina; (iii) Fator 3: Concentração de auxina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Para cada repetição utilizou-se 24 embriões imaturos, totalizando 96 embriões por tratamento. A variável analisada foi percentagem de calos Tipo I e Tipo II e o software utilizado foi o programa R (R Core Team, 2015).

Maturação e regeneração dos calos

Apenas os calos obtidos a partir do meio que apresentou melhor resultado para indução de calos embriogênicos foram utilizados para testes de maturação. Os calos selecionados foram divididos em 16 novos tratamentos, em meio que favorece a maturação: MS sais e vitaminas (60 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de myo-inositol; 6 g L⁻¹ Phytigel) ou 1,25 mg L⁻¹ de CuSO₄ (Cho et al., 2014); combinações de 6-benzil-amino-purina (6-BAP), nas concentrações de 0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹; e ácido naftaleno acético (ANA) nas concentrações de 0; 1,0 mg L⁻¹. Os calos foram mantidos nos meios durante 42 dias, a 27 °C, no escuro.

Os embriões maduros que apresentaram coloração branca opaca foram transferidos para frascos Magenta (Sigma/Brasil) contendo meio MS sem regulador de crescimento e foram incubadas a 27 °C, sob foto período de 16 horas, até germinação, cerca de duas semanas.

Para avaliação destes resultados foi utilizado um duplo fatorial 8x2, onde os fatores eram: (i) Fator 1: regulador de crescimento; (ii) Fator 2: CuSO₄. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em quatro embriões somáticos, num total de 20 calos por tratamento. As variáveis analisadas foram:

porcentagem de maturação dos calos e número de plantas germinadas. O software utilizado foi o programa R (R Testemunho Team, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já descrito por Feher (2015), a composição do meio afeta o desempenho do explante utilizado e a embriogênese só é iniciada após uma combinação de condições. A influência da auxina na capacidade dos embriões imaturos L3 em formar calos embriogênicos foi claramente observada nesse trabalho, com variações nos resultados devido ao tipo e à concentração utilizada. Para o fator formação de calos, a análise estatística apontou que a formação de calos Tipo I reduz conforme aumenta a concentração de 2,4-D. Comparativamente, os meios com Dicamba formam mais calos Tipo I, que foram favorecidos nos meios M2 e M3, onde a formação aumentou com a concentração de Dicamba até 1 mg L⁻¹, estabilizando-se depois. Ao contrário do comportamento observado para M2 e M3, em M1 a elevação da concentração de Dicamba foi acompanhado por um aumento das porcentagens de formação de calo do Tipo I (Figura 1).

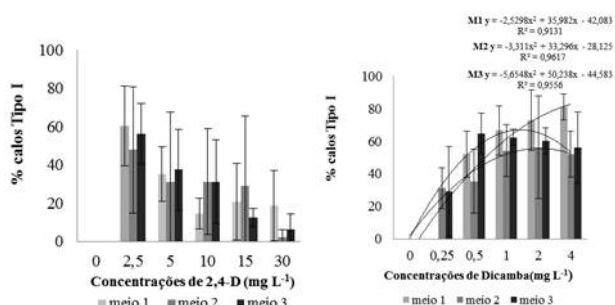


Figura 1. Porcentagem de calos Tipo I obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

A análise estatística revelou ainda uma interação entre os fatores meios de cultura, tipo e concentração de auxinas, utilizados para induzir calos Tipo II. No meio M1 suplementado com 10 a 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, houve maior porcentagem de calos Tipo II, com elevado número de embriões na fase global, sendo que a maior produção ocorreu em concentrações maiores ou iguais a 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para Dicamba, independentemente do meio, a quantidade mínima requerida para a formação de calos Tipo II foi 2 mg L⁻¹. No entanto, a geração de calo Tipo II na presença de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foi mais expressiva do que em presença de 2 mg L⁻¹ de Dicamba (Figura 2).

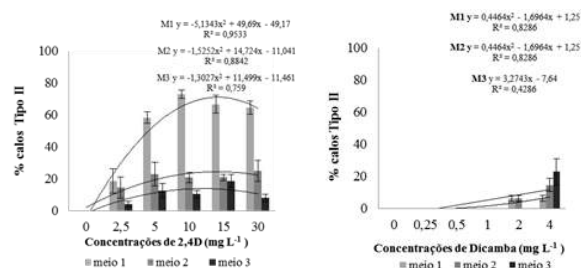


Figura 2. Porcentagem de calos Tipo II obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

Há trabalhos que recomendam tanto 2,4-D quanto Dicamba para formação de calos Tipo II a partir de embriões zigóticos de milho. Neste estudo, constatou-se que as concentrações testadas de Dicamba não foram adequadas para alcançar altos níveis de formação de calos Tipo II para a linhagem elite L3. Entretanto, a combinação do meio M1 com 4 mg L⁻¹ de Dicamba resultou em mais de 80% de formação do calo Tipo I. Este calo também pode ser usado para regenerar plantas transgênicas de milho, embora com eficiência mais baixa. Nas menores concentrações de 2,4-D ou nas doses testadas de Dicamba houve a formação predominante de calo do Tipo I, independente do tratamento.

A formação de embriões somáticos pode ser explicada pela interação das condições ambientais ou dos níveis endógenos de hormônio, que dependem do genótipo e da fase de desenvolvimento do explante (Feher, 2015).

A maturação de embriões é um processo que ocorre antes da germinação de plântulas. Neste trabalho o único fator que influenciou a maturação dos calos foi a presença de CuSO₄ no meio de cultura. Estudos de Cho et al. (2014) demonstraram que o aumento da quantidade de cobre no meio de cultura melhora a regeneração de culturas de calo de milho, uma vez que este é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas, atuando como ativador ou constituinte de enzimas. Tais resultados diferem dos encontrados por Ombori et al. (2008), que relatou que BAP e ANA foram eficazes na maturação de embriões somáticos de milho. Durante o período de 42 dias, houve uma maior porcentagem de maturação dos calos nos tratamentos em que CuSO₄ estava presente (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem média de calos maturados e número de plantas de milho regeneradas na presença ou na ausência de CuSO₄.

Tratamentos	Calos maturados (%)	Nº de plantas regeneradas (%)
Com CuSO ₄	92,5 a	9,0
Sem CuSO ₄	76,87 b	4,8
CV %	27,44	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Estudos têm demonstrado que um aumento do nível do cobre no meio de cultura melhora a regeneração de calos embriogênicos de milho (Cho et al., 2014).

A linhagem L3 mostrou-se eficiente na capacidade embriogênica *in vitro* e foi capaz de regenerar plantas completas e férteis (Figura 3). Além disso, esta linhagem tropical tem excelente aptidão agrônômica, o que a torna uma boa opção para ser utilizada em transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* ou biolística.

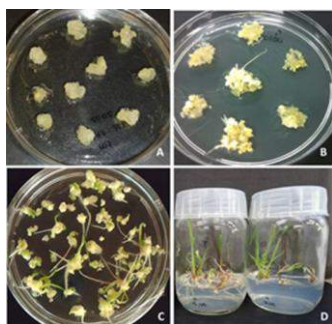


Figura 3. (A) Formação de calos após 4 semanas de cultivo em meio N6 suplementado com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D; (B) Maturação após 3 semanas de cultivo no teor médio de CuSO₄; (C) Germinação dos calos; (D) Regeneração de plântulas de milho.

CONCLUSÕES

Meio M1 é eficiente para induzir a formação de calos tipo I (4 mg L⁻¹ Dicamba) e tipo II (10 mg L⁻¹ 2,4-D) na linhagem tropical de milho L3.

A presença de CuSO₄ no meio de cultura aumenta a maturação dos calos tipo II e a regeneração de plantas de milho.

O protocolo de regeneração desenvolvido mostrou ser eficiente para regenerar células transgênicas a partir de embriões zigóticos imaturos.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, à Fapemig e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ABEBE, D. Z.; TEFFERA, W.; MACHUKA J. S. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2181-2186, 2008.

ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; HILSON, P.; LIJSEBETTENS, M.V.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 285-295, 2010.

CHO, M. J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER III, J. C.; JONES T. J.; ZHAO Z. Y. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Plant Cell Rep**, v.33, p.1767-1777, 2014.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.16, p.659-668, 1975.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochim. Bioph. Acta**, v.1849, p.385-402, 2015.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M.L.; TAYLOR, K.W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Rep**, v.25, p.1024-1034, 2006.

GONZALÉZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D. ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 15, n. 1, 2012.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. In vitro plant generation of tropical maize genotypes. In: International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology, 2001, Singapura, 2011, v. 16, p. 52-59.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf)>. Acesso em 14 de maio de 2016.

LUCENA, A. L. M.; ELOI, I. B. O.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Embriogênese somática em milho: trajetória e eficiência. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 33-77, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology*, v.15, p.473-497, 1962.

OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. R. L. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidas a partir de calos. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

VASCONCELOS, M. J. V.; FONTES, M. A.; CARVALHO, C. H. S.; LOPES, M. A. Regeneração in vitro de milho tropical de alta qualidade proteica. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2009.

Mapeamento de QTLs associados com a Resistência à Helmintosporiose em Sorgo

Danuzza Araújo de Souza⁽¹⁾; Isabel Regina Prazeres de Souza⁽²⁾; Luciano Viana Cota⁽²⁾; Janaína de Oliveira Melo⁽³⁾; Maria Marta Pastina⁽²⁾; Jurandir Vieira de Magalhaes⁽²⁾; Claudia Teixeira Guimaraes⁽²⁾; José Avelino Santos Rodrigues⁽²⁾; Robert Eugene Schaffert⁽²⁾; Cicero Beserra de Menezes⁽²⁾

⁽¹⁾ Pós-Doutoranda - Fapemig, danuzza19@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG isabel.prazeres@embrapa.br ; ⁽³⁾ Professora Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG.

RESUMO: Em sorgo, apesar da importância da Helmintosporiose, doença foliar causada pelo *Exserohilum turcicum* (Pass), são limitadas as informações sobre genes e/ou QTLs de resistência. O objetivo do presente estudo foi mapear QTLs associados a resistência à helmintosporiose em sorgo. Trezentas e noventa e três linhagens recombinantes (RILs), derivadas do cruzamento entre as linhagens BR007B (suscetível) e SC283 (resistente), foram genotipadas por meio da técnica de genotipagem por sequenciamento e fenotipadas em condições de inóculo natural em campo. Por meio da estratégia de mapeamento por múltiplos intervalos foram identificados cinco QTLs de resistência nos cromossomos 1, 2, 3, 6 e 9. Dentre esses, foi identificado um QTL de grande efeito no cromossomo 1, explicando 53,35% da variância fenotípica para a resistência. Esse QTL possui grande potencial para utilização na seleção assistida visando a introgressão da resistência à helmintosporiose em linhagens de sorgo.

Termos de indexação: *Exserohilum turcicum*, *Sorghum bicolor*, mapeamento por múltiplos intervalos.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) vem atingindo aumentos expressivos em área plantada. Dentre os fatores que afetam a produtividade da cultura tem-se as doenças foliares, sendo a helmintosporiose, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pass), uma das mais destrutivas. Perdas na produção podem ser superiores a 50%, quando ocorrem em cultivares suscetíveis, antes da emergência das

panículas (Mittal & Boora, 2005). A principal forma de controle é por meio do uso de cultivares resistentes.

Caracteres quantitativos geralmente apresentam elevada influência de fatores ambientais, o que na maioria das vezes dificulta a fenotipagem. Dessa forma, a seleção indireta com base em marcadores moleculares é uma estratégia desejável para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Para isso, é importante o mapeamento de caracteres de herança quantitativa, com a identificação de marcadores que co-segregam com os genes de resistência. QTLs associados a doenças foliares causadas por fungos, como mancha zonada (*Gloeocercospora sorghi*), mancha alva (*Bipolaris sorghicola*), mancha de drechslera (*Drechslera australiensis*), antracnose (*Colletotrichum sublineola*) e ferrugem (*Puccinia purpúrea*) (Mohan et al., 2009, 2010), têm sido identificados. Em relação à helmintosporiose, os estudos são muito escassos, tendo sido relatado apenas marcas simples associadas com a resistência à helmintosporiose (Beshir et al., 2016).

Marcadores moleculares associados com a resistência podem ser usados no melhoramento assistido por marcadores. No entanto, estão disponíveis ainda limitadas informações em relação à identificação de genes ou QTLs associados com a resistência à helmintosporiose (*E. turcicum*). Assim, objetivou-se neste trabalho mapear possíveis QTLs relacionados com a resistência do sorgo a helmintosporiose.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Foram utilizadas 393 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), obtidas após 9 ciclos de autofecundação pelo método de descendência por semente única (SSD, Brim, 1966), a partir do cruzamento entre as linhagens BR007B (suscetível) e SC283 (resistente).

Avaliação Fenotípica

O experimento foi conduzido em condições de campo na Embrapa Milho e Sorgo, em dois anos distintos. As RILs foram avaliadas no delineamento em látice 10x10 com quatro repetições, e duas testemunhas por bloco, sendo cada bloco composto por 12 genótipos. As testemunhas foram as linhagens genitoras BR007B (suscetível) e SC283 (resistente). As parcelas experimentais foram constituídas por uma fileira de 4 metros espaçadas de 0.7 metros.

As avaliações fenotípicas para helmintosporiose foram realizadas classificando por notas os níveis de suscetibilidade e resistência, na escala de 1 (resistente) a 5 (suscetível).

A análise dos dados foi realizada com base na abordagem de modelos mistos, para a obtenção de médias ajustadas via BLUPs (*Best Linear Unbiased Prediction*), que foram utilizadas no mapeamento de QTLs.

Obtenção dos marcadores SNP

A genotipagem das RILs foi realizada pelo Genomic Diversity Facility da Universidade de Cornell, com base na técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS, do inglês *Genotyping-by-Sequencing*), conforme descrito por Elshire et al. (2011).

Mapamento de QTLs

O mapeamento genético foi realizado através do software OneQTL, que está sendo desenvolvido para a plataforma R (R Core Team, 2014), considerando a estratégia de mapeamento por múltiplos locos a partir da aproximação de Haley & Knott (Haley & Knott, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 73.186 SNPs foram utilizados no mapeamento de QTLs, permitindo identificar cinco QTLs associados com a resistência à helmintosporiose na população de RILs, localizados nos cromossomos 1, 2, 3, 6 e 9. Todos os alelos contribuindo para o aumento da resistência foram derivados do genitor resistente (Tabela 1).

Um QTL de efeito maior foi mapeado no cromossomo 1, explicando 53,35% da variância fenotípica para a resistência (Tabela 1). Além da

importância da magnitude desse QTL, nosso estudo foi o primeiro a identificar um QTL de grande efeito conferindo resistência à helmintosporiose em sorgo. Poucos são os relatos sobre QTLs associados a resistência à helmintosporiose em sorgo. Beshir et al. 2016, utilizando análise por marcas simples, identificaram o marcador SSR Xtxp95 no cromossomo 6, associado com a resistência à Helmintosporiose em populações de sorgo derivadas do cruzamento entre MUC007/009 (resistente) e Epuripuri (suscetível).

CONCLUSÕES

O QTL explicando 53,35% da resistência à helmintosporiose, identificado no cromossomo 1 de sorgo, apresenta elevado potencial para utilização na seleção assistida por marcadores moleculares visando a sua introgressão em linhagens de sorgo suscetíveis à helmintosporiose.

AGRADECIMENTOS

Em nome do técnico agrícola Geraldo Magela da Silva, agradecemos a equipe do Melhoramento de Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo, pelo suporte na condução dos experimentos de campo. Suporte financeiro: Fapemig e Embrapa.

REFERÊNCIAS

- BESHIR, M. M.; ALI, A. M.; RUBAIHAYO, P.; AHMED, N. E.; OKORI, P. Simple Sequence Repeat Markers Associated With Anthracnose and Turicum Leaf Blight Resistance In Sorghum. **African Crop Science Journal**, v. 24, n. 1, p. 97-107, 2016.
- BRIM, C. A. A modified pedigree method of section in soybeans. **Crop Science**, v. 6, 1996.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**. v. 6, n. 5, 2011.
- HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, p. 315-324, 1992.
- R Core Team (R version 3.1.1). The R project for statistical computing. Disponível em: <<http://www.r-project.org/index.html>>. Acesso em: 12 agosto de 2015.
- MITTAL, M.; BOORA, K. S. Molecular tagging of gene conferring leaf blight resistance using microsatellites in

sorghum { *Sorghum bicolor* L. Moench}. **Indian J Exp Biol**, v. 43, p:462–466, 2005.

MOHAN, S. M.; MADHUSUDHANA, R.; MATHUR, K.; 2 ,
HOWARTH, C. J.; SRINIVAS, G.; SATISH, K.; REDDY, R.
N.; SEETHARAMA, N. Short Communication Co-
localization of quantitative trait loci for foliar disease
resistance in sorghum. **Plant Breeding**, v. 128, p.532-
535, 2009.

MOHAN, S. M.; MADHUSUDHANA, R.; MATHUR, K.;
CHAKRAVARTHI, D. V. N.; RATHORE, S.; NAGARAJA,
R. R.; SATISH, K.; SRINIVAS, G.; MANI, S. N.;
SEETHARAMA, N. Identification of quantitative trait loci
associated with resistance to foliar diseases in sorghum
[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Euphytica**, v. 176, p. 199-
211, 2010.

Tabela 1. Cromossomo, posição (pb), intervalo de confiança (pb), razão entre variância do QTL e variância fenotípica (RV %) e LOD para os QTLs obtidos para a população de RILs derivada do cruzamento entre BR007B e SC283.

QTL	Cromossomo	Posição (pb)	Intervalo de Confiança (pb)	Efeito Alélico	RV %	LOD
1	1	25114569	25057775 - 27020390	-0.72	53.35	84.29
2	2	69974414	69063816 - 70048994	-0.14	1.95	11.31
3	3	7505056	7304646 - 7505469	-0.17	3.08	8.21
4	6	42445156	42164014 - 45264765	-0.19	3.80	9.95
5	9	56461586	56371855 - 57337482	-0.26	6.70	20.76

Marcador Alelo-Específico Associado com Níveis de Expressão do Gene *ZmMATE1* em Milho

Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Letícia Kuster Mitre⁽²⁾; Marcos de Oliveira Pinto⁽¹⁾; Jurandir Vieira de Magalhães⁽³⁾; Lauro José Moreira Guimarães⁽³⁾; Claudia Teixeira Guimarães⁽³⁾.

⁽¹⁾ Analista de pesquisa e desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; beatriz.barros@embrapa.br; ⁽²⁾ Estudante de doutorado; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

RESUMO: O milho é o cereal mais produzido no mundo, mas a toxicidade causada por alumínio (Al) é um estresse altamente limitante para a produção agrícola em solos ácidos. Um QTL explicando 30% da tolerância ao Al em milho foi co-localizado com o gene *ZmMATE1*. A ocorrência de três cópias do *ZmMATE1* na linhagem Cateto Al237 foi associada com altos níveis de expressão desse gene e com o aumento da tolerância ao Al. Marcadores moleculares são essenciais para a introgressão assistida de alelos superiores em linhagens elite. Neste trabalho, um SNP na região do promotor foi associado com diferentes níveis de expressão do gene *ZmMATE1* e convertido em um ensaio KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR). O alelo T foi identificado em genótipos com alta expressão do *ZmMATE1* e o alelo C, presente naqueles com baixa expressão. Embora não se possa inferir sobre os mecanismos moleculares associados com a expressão diferencial do gene, este marcador será importante na introgressão assistida do *ZmMATE1* em milho.

promovendo a inibição do crescimento radicular (Kochian et al., 2015) e limitando o acesso a nutrientes do solo (Wang et al., 2006). Em milho, um QTL de efeito maior (*qALT6*) para tolerância ao Al foi mapeado no cromossomo 6 e co-localizado com o gene *ZmMATE1* (Maron et al., 2010). Esse gene é um homólogo do gene *SbMATE* que controla a tolerância ao Al em sorgo (Magalhaes et al., 2007). A ocorrência de três cópias de *ZmMATE1* foi associada com maior expressão gênica e tolerância ao Al na linhagem Cateto Al237 (Maron et al., 2013). No entanto, a linhagem L228-3 que apresenta moderada tolerância ao AL, possui apenas uma cópia do gene e altos níveis de expressão de *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014). O desenvolvimento de marcadores é de extrema importância para a introgressão assistida de alelos superiores em linhagens elite. Neste trabalho, foi desenvolvido um marcador molecular do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associado com diferentes níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

Termos de indexação: SNP (*single nucleotide polymorphism*; Polimorfismo de nucleotídeo único), seleção assistida, tolerância ao Al, solos ácidos.

INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais produzido no mundo contribuindo significativamente para alimentação animal e como base alimentar humana em vários países (Awika, 2011). A toxicidade causada por alumínio (Al) é o maior fator limitante para a produção agrícola em solos ácidos que representam cerca de 50% das terras potencialmente agricultáveis no mundo (von Uexküll & Mutert, 1995). Em solos ácidos, o Al está presente na forma de cátion trivalente (Al³⁺) que é altamente tóxica,

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizados 28 genótipos de milho sendo: 11 linhagens da Embrapa Milho e Sorgo [Cateto Al237, L53, L228-3, (106x228-3)-158-1-1-1, (228-3x45611)x228-3, 521236, L202841-1-1-2, L262841-1-8-1, L262841-1-4-1, L2841 e L3] previamente caracterizadas para número de cópias e nível de expressão do gene *ZmMATE1* (Guimaraes et al., 2014); dois híbridos derivados de L228-3; um híbrido derivado de 521236; cinco linhagens do Quênia (K4, CON-5, 203B, 203B-14, SCH3), algumas delas avaliadas por Matonyei et al. (2014) e oito linhagens derivadas de cruzamentos entre linhagens do Brasil e do Quênia (SynAlxA089xA089-40, SynAlxR12C10-9, SynAlXR12C10-10, R11C10xSynAlxR11C10-8,

R12C10xSynAlxR12C10, R12C10xSynAlxR12C10-5, ATPS4SynAlxR12C10-5, Cateto AI 237/167-L3-5).

Para a validação do marcador, além desses genótipos foram utilizadas três linhagens isogênicas (NILs), NIL05, NIL13 e NIL19) introgridas com o *qALT6* e, consequentemente o, *ZmMATE1*, tendo a L53 como linhagem recorrente e três indivíduos heterozigotos em RC3 derivados da introgressão do *qALT6* em L3.

Identificação de um SNP na região promotora do *ZmMATE1* e desenvolvimento do marcador baseado na metodologia KASP

Sequências de 8 kb *upstream* ao ATG do gene *ZmMATE1* de duas linhagens contrastantes para tolerância a AI (Cateto AI237, tolerante e L53, sensível) foram alinhadas (Maron et al., 2013) e oito SNPs foram identificados. Conjuntos de primers flanquendo esses SNPs foram desenhados e os amplicons foram sequenciados nos 28 genótipos de milho do Brasil e do Quênia, previamente caracterizados quanto à expressão e ao número de cópias do gene *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014). A sequência de 524 pb flanqueando o SNP alvo foi enviada para o desenvolvimento do ensaio de genotipagem na LGC Genomics (www.lgcgenomics.com). O ensaio foi validado nos mesmos 28 genótipos utilizando as condições de reação recomendadas pela LGC e 27 ciclos adicionais: 94°C por 20 s e 57°C por 60 s. A intensidade da fluorescência das amostras foi quantificada por meio do leitor de microplacas FLUOstar Omega Filter-based multi-mode microplate reader (BMG Labtech) utilizando ROX na normalização do sinal. A genotipagem foi realizada utilizando o software KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos oito SNPs identificados entre Cateto AI237 e L53, somente um (C/T) foi coincidente com os níveis de expressão do gene *ZmMATE1* previamente caracterizados. O marcador foi eficiente para selecionar as três classes genotípicas baseadas nesse SNP (Figura 1).

O alelo T está presente na linhagem Cateto AI237 e em três linhagens derivadas de cruzamentos entre essa e linhagens do Quênia (SynAlxA089xA089-40, SynAlxR12C10-3 e CatA237/167-L3-5). A linhagem L228-3, que apresenta alta expressão do *ZmMATE1* e apenas uma cópia do gene (Guimarães et al., 2014), também apresenta o alelo T, bem como suas progênies. Todas as outras linhagens do Brasil e do Quênia que apresentam o alelo C, possuíam também uma cópia e baixa expressão do *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014; Matonyei et al., 2014).

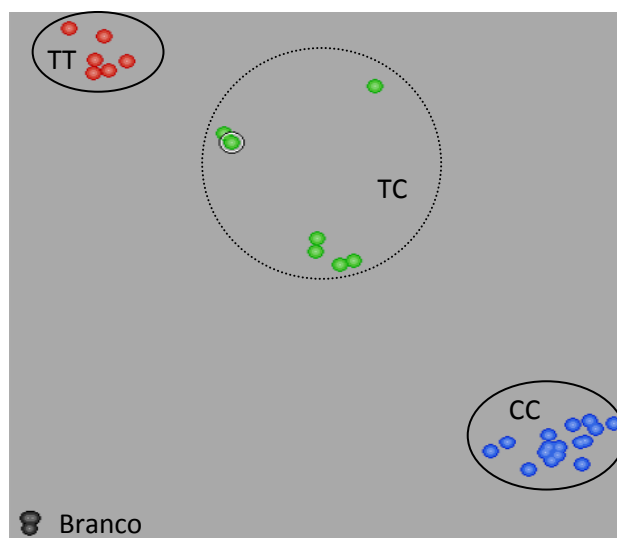


Figura 1. Genotipagem com o marcador associado com o gene *ZmMATE1*, evidenciando a eficiência do ensaio para a distinção das três classes genotípicas (TT, TC e CC).

Assim, a presença do alelo T em homozigose (TT) pode ser associada com altos níveis de expressão do *ZmMATE1* (Tabela 1). Importante ressaltar que as três NILs (NIL05, NIL13 e NIL19) oriundas da L53 introgrida com o *qALT6*, que possuíam alta expressão do *ZmMATE1*, foram confirmadas em homozigose (TT)

Tabela 1. Linhagens de milho do Brasil e do Quênia genotipadas para o marcador associado ao gene *ZmMATE1*, número de cópias (NC) e níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

Genótipo	Classe genotípica	NC*	Expressão <i>ZmMATE</i>
Cateto Al 237	TT	3	Alta
L228-3	TT	1	Alta
(106x228-3)-158-1-1-1	TT	1	Alta
(228-3x45611)x228-3)1-1	TT	1	Alta
521236	TT	1	Alta
L3	CC	1	Baixa
L53	CC	1	Baixa
2841	CC	1	Baixa
262841-1-4-1	CC	1	Baixa
262841-1-8-1	CC	1	Baixa
202841-1-1-2	CC	1	Alta
203B	CC	-	Baixa
203B-14	CC	-	Baixa
CON5	CC	-	Baixa
SynAlxA089xA089-2	CC	-	Baixa
SCH3	CC	-	Baixa
K4	CC	-	Baixa
SynAlxA089xA089-40	TT	-	Alta
SynAlxR12C10-9	TT	-	Alta
SynAlxR12C10-10	CC	-	Baixa
R11C10xSynAlxR11C10-8	CC	-	Baixa
R12C10xSynAlxR12C10	CC	-	Baixa
R12C10xSynAlxR12C10-5	CC	-	Baixa
ATPS4SynAlxR12C10-5	CC	-	Baixa
Cateto Al 237/167-L3-5	TT	-	Alta
NIL05	TT	3	Alta
NIL13	TT	3	Alta
NIL19	TT	3	Alta

* Kenyan maize lines were not characterized for copy-number variation

CONCLUSÕES

Foi possível identificar um SNP e desenvolver um marcador baseado na metodologia KASP associado aos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

Embora não se possa inferir sobre os mecanismos moleculares associados com a expressão do gene, este polimorfismo é muito útil na identificação e introgressão do alelo superior do gene *ZmMATE1* em linhagens elites de milho.

Como o SNP alvo ocorre na região promotora do gene, estudos funcionais estão sendo realizados para verificar se esse SNP é responsável pela variação dos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*,

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa, CNPq,

Fapemig e ao Generation Challenge Program (GCP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AWIKA, J. M. Major cereal grains production and use around the world. In: AWIKA, J. M.; PIIRONEN, V.; BEAN, S. (Ed.). **Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion**. Washington: American Chemical Society, 2011. pp 1-13.

GUIMARÃES, C. T.; SIMÕES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHAES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; et al. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 153, 2014.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; YI-HONG, W.; et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. M.; GUIMARÃES, C. T.; KIRST, M.; ALBERT, P. S.; BIRCHLER, J. A.; BRADBURY, P. J. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, 2013.

MATONYEI, T. K.; CHEPROT, R. K.; LIU, J.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; GUDU, S.; et al. Physiological and molecular analysis of aluminum tolerance in selected Kenyan maize lines. **Plant Soil**, v. 377, p. 357-367, 2014.

Von UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, v. 71, n. 1, p.1-15, 1995.

WANG, J. P.; RAMAN, H.; ZHANG, G. P.; MENDHAM, N.; Zhou, M. X. Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 10, p. 769-787, 2006.



Regeneração *in vitro* de cultivares de *Sorghum bicolor* via embriogênese somática

Fabiane Lacerda Moraes ⁽¹⁾; **Maria José Vilaça Vasconcelos** ⁽²⁾; **Meire de Cássia Alves** ⁽³⁾; **Andréa Almeida Carneiro** ⁽²⁾

⁽¹⁾ Estudante de Engenharia Agrônômica; Universidade Federal de São João Del-rei *campus* Sete Lagoas; Sete Lagoas; Minas Gerais; lacerda_fabiane@hotmail.com

⁽²⁾ Pesquisadora na Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas; Minas Gerais

⁽³⁾ Analista na Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas; Minas Gerais

RESUMO: Com o objetivo de testar a eficiência de formação de calos embriogênicos e regeneração em cultura de tecido foi conduzido um experimento em laboratório onde quatro linhagens de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) BRS 508, BRS 509, BRS 511 foram utilizadas. Inflorescências jovens entre 3,0 a 5,0 cm comprimento foram fragmentadas e plaqueadas em meio de cultura CIMRS suplementado com 2,4-D para indução de calos. Após 30 dias os calos formados foram transferidos para meio de maturação RN, e em seguida para meio de germinação H. Plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação em solos 1:1:1. O meio de indução de calos (CIMRS) foi suplementado com antioxidantes (PVPP e ácido ascórbico) para diminuir o efeito tóxico de compostos fenólicos produzidos pelo sorgo quando cultivados em cultura de tecido. Os resultados mostraram que todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos embora com eficiência variável. A linhagem BRS509 produziu um maior número de calos embriogênicos e um menor escurecimento do meio de cultivo.

Termos de indexação: Sorgo, reguladores de crescimento, antioxidantes.

INTRODUÇÃO

Sorghum bicolor (L.), o quinto cereal mais cultivado do mundo (Sato et al., 2004), é extremamente recalcitrante quando cultivado *in vitro* (Kishore et al., 2006). O sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração (Oldach et al. 2001; Kishore ET al., 2006). Para a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética de sorgo é necessário que vários parâmetros, entre eles a regeneração em cultura de tecidos seja otimizada. A composição do meio

de cultura é um fator importante que afeta a morfogênese *in vitro* (Elkonin & Pakhomova 2000; Sato et al., 2004). A regeneração de vários genótipos de sorgo, por meio de embriogênese somática, tem sido descrita a partir de diferentes meios de cultura. Alguns estudos têm comparado o efeito dos sais basais, MS (Murashige & Skoog, 1962) e N6 (Chu et al., 1975), na indução de calos embriogênicos em diferentes cultivares de sorgo e têm constatado forte influência do genótipo na produção de calos e habilidade de regeneração *in vitro* (Lusardi & Luppoto, 1990; Elkonin et al., 1995; Kaeppler & Pedersen, 1996; Sato et al., 2004).

Os protocolos de transformação genética de planta são desenvolvidos para genótipos adaptados à propagação *in vitro*, tanto por organogênese quanto por embriogênese e essas plantas muitas vezes apresentam baixa qualidade agrônômica.

Desse modo, fica evidente não apenas a necessidade de identificação de linhagens elite com alta capacidade regenerativa em cultura de tecidos, mas também o desenvolvimento de protocolos de regeneração funcionais para um maior número de plantas de uma mesma espécie. Esta pesquisa teve como objetivo a identificação de genótipos de sorgo sacarino capazes de regenerar eficientemente pelo processo de embriogênese somática, visando sua utilização na geração de plantas transgênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas inflorescências jovens com 3,0 a 5,0 cm de comprimento. Sementes das linhagens BRS 508, BRS 509, BRS 511 pertencentes ao banco germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo foram plantadas em casa de vegetação na e aproximadamente 120 dias após o plantio as inflorescências foram coletadas.

Esterilização do material vegetal

Aproximadamente 15 cm de colmos contendo as inflorescências imaturas foram coletados e desinfestados em etanol 70% e água destilada estéril. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram retiradas com o auxílio de um bisturi, deixando-se somente a panícula. As panículas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5mm.

Meio de cultivo

Os meios de cultivo utilizados para a regeneração *in vitro* de sorgo nas várias etapas do processo foram aqueles desenvolvidos por Brandão et al. (2005) (Tabela 1) suplementado com antioxidantes (ácido ascórbico e PVPP). A solução contendo sais, sacarose e 2,4-D foi autoclavada, os demais constituintes foram esterilizados por filtração e adicionados à solução já autoclavada.

Tabela 1. Composição dos Meios de Cultura usados para a Regeneração de Sorgo Sacarino

Composição	Constituinte	Meio CIMRS	Meio RM	Meio H
Sais	MS Sais	4,3 g	4,3 g	4,3 g
Regulador de Crescimento	2-4 D	2,5 mL	0	0
	ANA 1mg/L	0	200 µL	0
	Myo-Inositol	100 mg	100 mg	0
	Prolina	0,7 g	0	0
Vitaminas	Solução TG	1,0 mL	0	0
	Vitaminas MS	0	1,0 mL	1,0 mL
	L-Asparagina	100 mg	0	0
	Cinetina	200 µL	0	0
	MES	0,5 g	0	0
Suplementos	PVPP	10 g	0	0
	Sacarose	30 g (comercial)	60 g (comercial)	30 g (comercial)
	Tioxin	2,0 mL	0	0
	Phytigel	3,0 g	4,0 g	3,0 g

Indução de calos embriogênicos

Fragmentos das panículas foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura CIMRS, e cultivados em câmara de crescimento, no escuro, a 26-28°C por 30 dias, com um subcultivo após 15 dias.

Regeneração e germinação

Oito gramas de calos embriogênicos foram transferidos para 3 placas de meio de maturação RM por 2-3 semanas, no escuro a

26-28°C. Os calos maduros foram transferidos para novas placas contendo meio de germinação (meio H). Para germinação as placas foram incubadas em ambiente iluminado a 26-28°C e um fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro).

Aclimatização

Plantas com aproximadamente 5 cm e duas a três folhas foram transferidas para vasos contendo solo, vermiculita e areia na proporção de 1:1:1. O número de plantas regeneradas a partir de 8 g de calos embriogênicos foi registrado para cada cultivar estudada. Na primeira semana em casa-de-vegetação as plântulas permaneceram protegidas sob uma cobertura plástica transparente para aclimatização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste projeto foi testado o meio MS suplementado com 2,4-D para a indução de calos embriogênicos a partir de inflorescência imatura com 3 a 5 cm de comprimento. Segundo Gupta et al. (2006), a utilização de inflorescências imaturas de sorgo pode superar a limitação genotípica de maneira mais prática do que a utilização de embriões imaturos.

Nossos resultados revelaram que em meio CIMRS suplementado com 2,4-D e antioxidantes (ácido ascórbico e PVPP), todas as linhagens testadas foram capazes de formar calos embriogênicos embora com eficiência variável (Tabela 2). A linhagem BRS 509 foi a que produziu um maior número de calos embriogênicos e um menor escurecimento do meio de cultivo. O escurecimento observado é devido provavelmente ao acúmulo de compostos fenólicos no meio de cultivo.

Tabela 2. Numero de Calos e Plântulas desenvolvidas a partir de fragmentos de inflorescências

Cultivar	BRS 508	BRS 509	BRS 511
Nº Total de Explantes	72 calos	60 calos	123 calos
Nº de Calos Desenvolvidos ¹	59 calos	56 calos	86 calos
Nº de Plântulas que Regeneraram	28 plântulas	32 plântulas	16 plântulas
% em cima do nº total de calos (-)	81,90%	93,30%	69,90%

¹ contagem realizada antes dos calos serem passados para o meio de cultura RM

Segundo Oberthur et al. (1983), o escurecimento observado nos calos e no meio de cultura de sorgo é devido aos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário, os quais exercem importante papel no metabolismo de muitas espécies de plantas, bem como na defesa contra predadores e microrganismos. No entanto, no cultivo *in vitro* de sorgo, a produção de compostos fenólicos pode prejudicar a formação de calos e o desenvolvimento da planta (Kresovich et al., 1987; George 1996; Zhu et al., 1998).

CONCLUSÕES

Todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos e produzir plantas.

A linhagem BRS509 se destacou podendo ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de protocolos para transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

CAI, T.; BUTLER L.G. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v.20, p.101–110, 1990.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments of the nitrogen sources. **Science Sinica**, v.16, p.659-668, 1975.

ELKONIN, L.A.; PAKHOMOVA, N.V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v.61, p.115-123, 2000.

GUPTA, S.; KHANNA, V.K.; SINGH, R.; GARG, G.K. Strategies for overcoming genotypic limitations of *in vitro* regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in sorghum. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v.86, p.379–388, 2006.

KAEPLER H.F.; PEDERSEN, J.F. Evaluation of 41 elite and exotic inbred Sorghum genotypes for high quality callus production. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.48, p.71–75, 1997.

KAEPLER, H.F.; PEDERSON, J.F. Media effects on phenotype of callus cultures initiated from photoperiod-insensitive, elite inbred sorghum lines. **Maydica**, v.41, p.83-89, 1996

KRESOVICH, S.; MCGEE, R.E.; PANELLA, L.; REILLEY A.A.; MILLER, F.R. Application of cell and tissue culture techniques for the genetic improvement of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench: progress and potential. **Advances in Agronomy, New York**, v.41, p.147-170, 1987

LUSARDI, M.C.; LUPOTTO, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Sorghum species. **Maydica**, v.35, p.59–66, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology, Bethesda**, v.15, p.473-497, 1962.

OBERTHUR, E.; NICHOLSON R. L.; BUTLER, L.G. Presence of polyphenolic materials, including condensed tannins in sorghum callus. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.31, p.660-662, 1983.

OLDACH, K.H.; MORGENSTERN, A.; ROTHER, S.; GIRGI, M.; O’KENNEDY, M.M.; LO’R, Z.H. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, v.20, p.416–421, 2001.

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. (2008) Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(3):371-378.

QUE Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M.D.M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers Plant Sci**. 5:1-19. 2014.

SATO, S.; CLEMENTE, T.; DWEIKAT, I. Identification of an elite sorghum genotype with high *in vitro* performance capacity. **In Vitro Cellular Development Biology**, v.40, p.57-60, 2004.

VASIL, I. K. (1987) Developing cell and tissue culture systems of improvement of cereal and grass crops. **J. Plant. Physiol.** 128:193-218.

ZHU, H.; MUHUKRISHNAN, S.; KRISHNAVENI, S.; WILDE, G.; JEOUNG, J. M.;



LIANG.G.H. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. **Journal of Genetics & Breeding, Rome**, v.52, p.243-2

Superexpressão em tabaco do gene *Pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo

Simara da Silva Lopes⁽¹⁾; Patrícia Lages Silva Palhares⁽²⁾; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽³⁾; Meire de Cassia Alves⁽³⁾; Jurandir Vieira Magalhães⁽⁴⁾; Claudia Teixeira Guimarães⁽⁴⁾; Andrea Almeida Carneiro⁽⁴⁾; Sylvia Morais de Sousa⁽⁴⁾.

⁽¹⁾Estudante; Universidade Federal de São João Del-Rei; São João Del-Rei, Minas Gerais; simarabrazil@yahoo.com.br;

⁽²⁾Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas; ⁽³⁾Analista; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: A baixa disponibilidade de fósforo (P) é uma das maiores limitações para a produção agrícola em regiões tropicais. O gene *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) codifica uma proteína quinase envolvida em processos que levam ao aumento da superfície radicular, aquisição de P e produtividade de grãos em arroz sob deficiência de P. Homólogos do *OsPstol1* foram identificados em sorgo por mapeamento associativo em dois painéis de diversidade e em milho por mapeamento de QTL. Com o objetivo de validar a função desses genes, *OsPstol1* de arroz (controle) e seus homólogos em milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram clonados sob o controle do promotor ubiquitina no vetor pMCG1005, tendo o gene *Bar* como marcador de seleção. Plantas de tabaco *Petit Havana* foram geneticamente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 e regeneradas pela seleção de calos em meio de indução de parte aérea e enraizamento. Fragmentos do gene *Bar* (~400 pb) e dos genes *Pstol1* (~700 pb) foram amplificados por PCR confirmando a inserção dos respectivos genes nas plantas transformadas. Diversas plantas apresentaram uma cópia do transgene e a superexpressão dos genes *Pstol1* aumentou o crescimento vegetativo da planta e a área de superfície radicular sob baixo P, indicando que esses genes atuam de forma semelhante ao gene *osPstol1* em plantas transgênicas de tabaco.

Termos de indexação: Fósforo, transgênico, Agrobactéria.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente chave no crescimento e desenvolvimento das plantas, com papel importante no metabolismo de energia, biossíntese de ácidos nucleicos e de membranas

(Raghothama, 1999). Entretanto, é o macronutriente menos acessível em muitos ecossistemas e sua baixa disponibilidade limita o crescimento das plantas, com necessidade de aplicação de altas doses de fertilizantes fosfatados para minimizar o impacto na produtividade das culturas agrícolas (Lynch, 2011).

O P é um recurso não-renovável que tem seu pico de exploração estimado para 2030 (Vance & Chiou, 2011), havendo necessidade do desenvolvimento de cultivares mais eficientes na aquisição e utilização de P para viabilizar práticas agrícolas sustentáveis.

As plantas desenvolveram uma série de mecanismos adaptativos a condições de baixo P para absorver quantidade suficiente desse nutriente para suas atividades metabólicas e seu crescimento (Lambers *et al.* 2010), com plantas eficientes na absorção de P aumentando a exploração do solo através de uma área de superfície maior e conversão de formas não disponíveis de nutrientes para formas disponíveis, que são importantes adaptações para absorção de nutrientes com pouca mobilidade no solo como o P (Rengel & Marschner, 2005).

O gene *Phosphorus-Starvation tolerance 1* (*Pstol1*) está relacionado a maior eficiência na aquisição de P em plantas de arroz em condições de baixo P. A análise fenotípica em solução nutritiva com plantas de arroz superexpressando o gene *Pstol1* indicaram que este gene é um regulador do desenvolvimento precoce e do crescimento radicular (Gamuyao *et al.* 2012). Três proteínas preditas de sorgo com identidade superior a 50% com o *Pstol1* de arroz (BAK26566) foram identificadas por Hufnagel *et al.* (2014) pela fenotipagem de dois painéis de associação de sorgo para absorção de P, morfologia e arquitetura do sistema radicular em hidroponia e produtividade de grãos e acúmulo de biomassa em condições de baixo P. Além disso, foram validados por mapeamento de QTL em uma

população biparental, mostrando um papel geral dos homólogos de sorgo na morfologia e arquitetura do sistema radicular e co-localização com QTLs relacionados a estas características. Azevedo *et al.* (2015) identificaram através de mapeamento por QTL para morfologia radicular, acúmulo de biomassa e teor de P em população de RILs em solução nutritiva três genes de milho que co-localizaram com QTLs para estas características, e em análise de expressão gênica foram mais expressos na raiz que na parte aérea. A co-localização com QTLs de morfologia radicular é uma importante evidência, uma vez que análises fenotípicas em solução nutritiva de linhagens semi-isogênicas de arroz com e sem o gene *Pstol1*, demonstraram que sob tratamentos com baixo nível de P, o comprimento e área de superfície radicular foram significativamente maiores nas plantas que expressam o *Pstol1* (GAMUYAO *et al.*, 2012). Portanto, o objetivo deste trabalho é superexpressar em tabaco os genes *OsPstol1* e seus homólogos de milho e sorgo visando verificar a funcionalidade quanto ao aumento da superfície radicular e aquisição de P.

MATERIAL E MÉTODOS

As regiões codificantes do gene *Pstol1* de arroz, dos homólogos de milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05_1*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) (Hunfnagel *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2015) foram sintetizadas e clonadas nos sítios *AvrII* e *SpeI* no vetor binário pMCG1005 (Iowa State University Plant Transformation Facility) pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O vetor pMCG1005 tem o promotor ubiquitina para regulação e expressão dos genes candidatos e o marcador de seleção para planta é o gene *Bar* sob promotor 4x35S.

Os cassetes de expressão contendo as regiões codificantes dos genes *Pstol1* foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 por eletroporação e após confirmação de sua correta inserção por PCR foi feita transformação de discos foliares de *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* via *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas transgênicas foram regeneradas por seleção com o herbicida PPT (fosfinotricina) em meio de cultura de indução de parte aérea e enraizamento e transferidas para casa de vegetação, onde passaram por nova seleção com PPT e as que sobreviveram foram multiplicadas. A confirmação da inserção dos genes *Pstol1* e marcador de seleção foi feita através de PCR com DNA genômico extraído de cada linhagem usando o método de Saghai-Marouf *et al.* (1984),

utilizando um *primer* senso na região promotora e um *primer* complementar à região codificadora do gene de interesse e *primers* específicos para o gene *Bar*.

A estimativa do número de cópias do transgene inseridas no genoma do tabaco foi feita por qPCR usando o método SYBR Green, utilizando DNA genômico em uma concentração de 20ng/μL, conforme Zhang *et al.* (2014) e Barros *et al.* (2011). Os níveis de expressão relativa foram quantificados pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Sementes de eventos transgênicos de tabaco foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 6% e germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ (Murashige & Skoog, 1986) polimerizado com ágar Sigma, sob tratamento de baixo P (97 μM de P). Após 56 dias de germinação as plântulas foram fotografadas para análise morfológica e coletadas para extração de RNA total com kit Plant RNeasy (Qiagen). As análises de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas utilizando a metodologia *Taqman* e SYBR Green e a expressão gênica relativa calculada conforme o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

A caracterização morfológica do sistema radicular de eventos transgênicos de tabaco foi feita com plântulas sob tratamento de baixo P. Após a germinação, duas plântulas uniformes foram transferidas para placas de Petri com dimensões de 150mm x 25mm, três repetições por evento. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27 ± 3 °C, noturna de 20 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas.

O sistema radicular das plântulas de tabaco foi avaliado semanalmente em diferentes aspectos utilizando-se o escâner Epson XL 10000 e os dados analisados com o software WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas as características radiculares de acordo com de Sousa *et al.* (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas selecionadas em casa de vegetação com herbicida PPT foram testadas quanto à inserção dos genes de interesse por PCR. Todas as plantas avaliadas apresentaram o fragmento amplificado por PCR do gene *Bar*. Para a presença do inserto gene específico não foram observados os mesmos resultados, com total de plantas inferior ao do gene *Bar*, o que pode ser explicado pela deleção do gene específico durante o processo de transformação (Sha *et al.* 2004).

O número de cópias do transgene foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), comparando-se cada amostra desconhecida com o

DNA de evento que continha uma única cópia do transgene. Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *Bar*. Eventos transformados apresentaram inserção de uma a três cópias do transgene. O número de cópias pode influenciar os níveis de expressão e a estabilidade genética dos genes exógenos e endógenos. Portanto, a inserção de uma única cópia do transgene é desejável, pois esses eventos são geneticamente estáveis (Gadeleta *et al.* 2011). Dados semelhantes foram encontrados por Yuan *et al.* (2007) e Yang *et al.* (2013) em tabaco e algodão, respectivamente.

Foi realizado um ensaio de expressão com o gene *Bar* para verificar presença de transcritos em eventos transgênicos de tabaco para as construções pMCG1005, *OsPstol1*, *ZmPstol8.05_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*. A expressão do gene *Bar* foi variável entre os eventos e entre as construções. Não houve correlação entre os níveis de expressão e o número de cópias do gene *Bar*. A expressão está provavelmente relacionada com o local de integração do transgene no genoma vegetal (Joyce *et al.* 2014), que pode ser em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (Bourras *et al.* 2015), diferentes regiões do genoma e forma aleatória (Gelvin & Kim, 2007).

Além da expressão do gene *Bar*, foram analisados os níveis de expressão dos transcritos para os genes específicos (*ZmPstol8.05_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) (Figura 1). Nesse caso, também houve variação da expressão gênica entre eventos individuais. Todos os eventos expressaram os genes *Pstol1*, com exceção de eventos que apresentaram valores muito baixos de expressão.

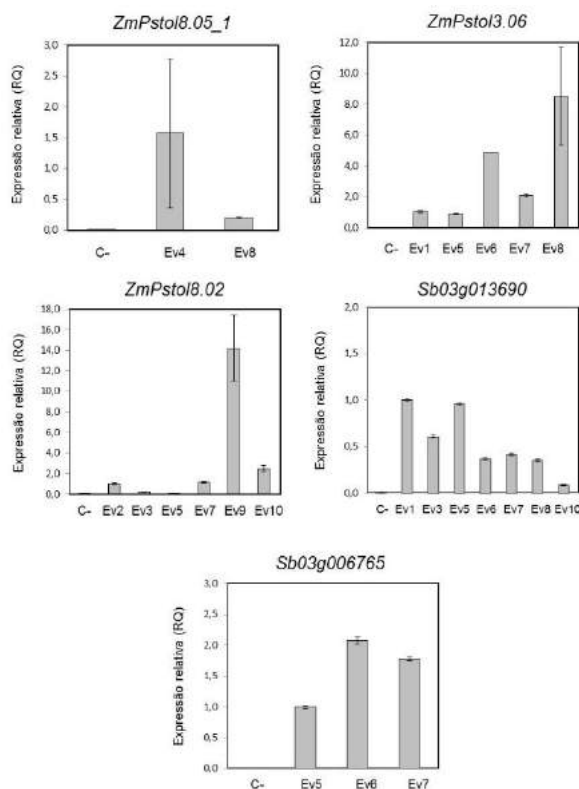


Figura 1 - Expressão dos homólogos de milho e sorgo do gene *Pstol1* em eventos transgênicos das construções *ZmPstol8.05_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise morfológica de plântulas contendo as construções *OsPstol1* Ev. 5, *ZmPstol8.05_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5, *ZmPstol8.02* Ev. 3, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 mostrou maior crescimento vegetativo e radicular (Figura 2) do que as plântulas controle (pMCG1005 -vetor vazio).

As plântulas contendo as construções *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 mostraram crescimento superior às demais construções (Figura 2). As construções *ZmPstol8.05_1* Ev. 8, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 tiveram crescimento similar, superior ao controle e ao *OsPstol1* Ev. 5, e inferior as construções *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 (Figura 2). A proteína *OspSTOL1* de arroz está associada ao desenvolvimento e crescimento precoce do sistema radicular e aquisição de P (Gamuyao *et al.* 2012). Há evidências de associação entre *SbPstol1*, crescimento radicular e produção em campo de sorgo (Hunfnagel *et al.* 2014) e co-localização entre *ZmPstol1* e características radiculares (Azevedo *et al.* 2015).

Na caracterização morfológica do sistema radicular foi observada diferença entre comprimento e área de superfície entre os eventos controles (pMCG1005) e eventos dos genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*, mas os resultados fenotípicos ainda não são conclusivos, uma vez que as plantas ainda estão no início do desenvolvimento.



Figura 2 - Plântulas de tabaco individuais crescidas em meio de cultura sob baixo P. Da esquerda para direita: pMCG1005 Ev. 10 (controle), *OsPstol1* Ev. 5, homólogos de milho (*ZmPstol8.05_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3) e homólogos de sorgo (*Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6).

CONCLUSÕES

Foram geradas com sucesso linhagens transgênicas de tabaco superexpressando os genes *OsPstol1* de arroz e seus homólogos de milho e de sorgo com baixo número de cópias dos transgenes e maior crescimento radicular e vegetativo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa e a Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, G. C.; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; NEGRI, B.F.; HUFNAGEL, B.; COSTA E SILVA, L.; MAGALHAES, J. V.; GARCIA, A. A. F.; LANA, U. G. P.; SOUSA, S. M.; GUIMARAES, C. T. Multiple interval QTL mapping and searching for *PSTOL1* homologs associated with root morphology, biomass accumulation and phosphorus content in maize seedlings under low-P. **BMC Plant Biology**, 10.1186/s12870-015-0561-y, 2015.

BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; POSSA, K. F.; ANDRADE, L. C. S. S.; SILVA, V. L.; LOPES, F. A.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; MAGALHAES, J. V.; GUIMARAES, C. T. Estimativa do Número de Inserções de Transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR). (**Circular Técnica**), 2011.

BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. Agrobacterium tumefaciens gene transfer: How a plant pathogen hacks

the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, p.1-14, 2015.

DE SOUSA, S.M.; CLARK, R.T.; MENDES, F.F.; e OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, M.J.V.; PARENTONI, S.N.; KOCHIAN, L.V.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v.39, p.925-935, 2012.

GADELETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.16, p.652-688, 2011.

GAMUYAO, R.; CHIN, J.H.; TANAKA, J.P.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; ISLAMET-LOEDIN, I.; TECSON-MENDOZA, E.M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, v.488, p.535-541, 2012.

GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1769, p.410-421, 2007.

HUFNAGEL, B.; de SOUSA, S. M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C. T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G. C.; NEGRI, B.; LARSON, B. G.; SHAFF, J. E.; PASTINA, M. M.; BARROS, B. A.; WELTZIEN, E.; RATTUNDE, H. F. W.; VIANA, J. H.; CLARK, R. T.; FALCÃO, A.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHÃES, J. V. Duplicate and Conquer: Multiple Homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE1 Enhance Phosphorus Acquisition and Sorghum Performance on Low-Phosphorus Soils. **Plant Physiology**, v.166, p.659 – 677, 2014.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using Agrobacterium and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, p.411-424, 2014.

LAMBERS, H.; BRUNDRETT, M. C.; RAVEN, J. A.; HOPPER, S. D. Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. **Plant Soil**, v.334, p.11-31, 2011.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2-ddCt. Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LYNCH, J.P. Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. **Plant Physiology**, v.156, p.1041-1049, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.665-693, 1999.

RENGEL, Z.; MARSCHNER, P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. **New Phytologist**, v.168, p.305–312, 2005.

SHA, Y.; LI, S.; PEI, Z.; LUO, L.; TIAN, Y.; HE, C. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. **Theor Appl Genet**, v.108, p.306–314, 2004.

SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.A., JORGENSEN, R.A., ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.

VANCE, C.P., CHIOU, T.J. Phosphorus focus editorial. **Plant Physiology**, v.156, p.987-988, 2011.

YANG, X.; LI, F.; ZHANG, X.; LIU, K.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, C.; ZHU, Z.; SHAN, G.; CHIN, C. K.; FANG, W. Integration and Characterization of T-DNA Insertion in Upland Cotton. **Czech J. Genet. Plant Breed**, v.49, p.51–57, 2013.

YUAN, J. S.; BURRIS, J.; STEWART, N. R.; MENTEWAB, A.; STEWART JR., C. N. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Bioinformatics**, v.8, 2007.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, J. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry1le gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.5, p.125–134, 2015.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

“Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar”

Validação por qPCR de genes diferencialmente expressos em milho em resposta ao estresse hídrico.

Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Andrea Almeida Carneiro⁽²⁾; Paloma Alessandra Alves⁽³⁾; Raquel Oliveira Moreira⁽³⁾; Roberto Willians Noda⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽²⁾

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.
newton.carneiro@embrapa.br

RESUMO: O estresse hídrico é um dos principais fatores que limita a produção agrícola. Déficit de água reduz o rendimento da cultura principalmente nos estádios reprodutivos. O milho é uma cultura importante para a segurança alimentar global que está sendo amplamente cultivada em áreas tropicais e subtropicais sob condições de sequeiro. A tolerância à seca é uma característica complexa e afeta as respostas de genes em muitos processos biológicos em plantas. Nesse trabalho foram comparados nível de expressão de genes de raiz de espécies de milho contrastantes para a tolerância ao estresse hídrico e em duas condições hídricas por RNAseq e qPCR. O RNA total foi extraído de raízes de plantas de milho mais tolerante, na presença (50% menos irrigado) e ausência (100% irrigado - controle) do estresse. Os cDNAs foram construídos, sequenciados e analisados utilizando softwares na plataforma Galaxy da Embrapa Informática Agropecuária. Genes com diferenças de expressão superior a dez vezes em condições contrastantes em análise de RNAseq e de baixo número de cópia forma submetidos ao qPCR. Os resultados mostraram consistentes com variações abaixo de duas vezes entre os dois métodos. Esses resultados ajudam a consolidar os resultados de RNAseq para expressão de genes relacionados com estresse hídrico, que permitem evidenciar as vias metabólicas relacionadas a esse processo.

Termos de indexação: milho, seca, RNASeq, qPCR.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o milho é considerado a terceira maior cultura do mundo, tanto pelo seu valor nutricional quanto por seu valor econômico (Duarte, 2000). Alterações climáticas, como a seca, acarretam danos na produção desse cereal, principalmente na sincronização dos sistemas reprodutivos, uma vez que o déficit hídrico modifica o intervalo de emergência do pendão até o aparecimento dos estigmas. Na maioria dos casos, plantas sujeitas ao estresse combinam uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas em nível molecular, celular em toda a planta (Bohnert et al., 1995; Bray, 1993, 1997; Chaves et al., 2003), que podem levar a alterações na planta que permitam uma maior tolerância a curto e longo prazo ao estresse hídrico. Essas alterações a curto prazo podem variar desde um ajuste osmótico (Morgan, 1984) através do sequestro de íons na planta (Mimura et al, 2003) até um sinal raiz-folha que possa reduzir a transpiração e o crescimento da planta. A longo prazo a planta pode modificar o tamanho e arquitetura do sistema radicular capacitando a planta a absorver maiores quantidades de água durante condições de estresses hídrico. Pouco se conhece sobre os mecanismos regulatórios que traduzem as mudanças ambientais em alterações metabólicas necessárias durante as respostas de adaptação à seca. Um grande número de genes é expresso diferencialmente sob seca em diferentes tecidos, estádios e condições (Reynolds & Tuberosa 2008; Deyholos 2009) e a identificação desses genes responsivos ao déficit hídrico se torna fundamental para o desenvolvimento de linhagens tolerantes, cuja produção possa minimizar os efeitos da seca. Neste trabalho, identificamos alguns desses genes diferencialmente expressos em resposta ao

estresse hídrico em milho por RNAseq e a validamos a sua quantificação por qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Para este trabalho foram utilizados os genótipos de milho identificados como A (tolerante a seca) e B (sensível a seca). Esses genótipos foram caracterizados no Programa de Melhoramento de Milho e Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo, tanto em nível de casa de vegetação como em campo. Para esse trabalho, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições de 50% e 100% de irrigação por 30 dias entre as fases de pré-florescimento e enchimento do grão. Após esse período, porções das raízes foram coletadas, o excesso de solo foi retirado manualmente e as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido até a extração de RNA. Foram coletadas duas amostras biológicas de duas plantas por cada tratamento.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Antes da extração, cada amostra foi lavada rapidamente em água para retirada do solo residual e macerada em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as recomendações do fabricante.

RNASeq

Cerca de 10 ug de RNA total de duas réplicas biológicas de cada tratamento foram enviados para a empresa Eurofins para sequenciamento. As análises de sequências de RNAseq de milho utilizaram o programa TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) que alinha sequências do genoma e determina splicing alternativos. O Cufflinks (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) usa o mapa para localizar os transcritos. O Cuffdiff é parte do pacote do Cufflinks que faz o alinhamento de genes em duas ou mais condições determinando genes diferencialmente expressos utilizando análises estatísticas rigorosas. O TopHat e Cufflinks são sistema baseados em UNIX. Para utilizar uma interface gráfica mais acessível utilizamos a plataforma Galaxy disponibilizado pela Embrapa Informática Agropecuária. O CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>) produz informações de expressão nos formatos gráficos de

vulcano, scatter e boxplots utilizando os dados do Cufflinks e em conexão com o ambiente de estatística R e pode ser acessível pelo Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Com transcritos ou exons únicos de milho (diferencialmente expressos ou não) foram selecionados para validação dos dados obtidos por RNASeq.

qRT-PCR

A escolha dos transcritos diferencialmente expressos de milho sob condições contrastantes para estresse hídricos (50% Reidratado x 100% Reidratado), das bibliotecas de raiz (B-Root-50 x B-Root-100) foram elencados os transcritos com as maiores expressões diferenciais [\log_2 (Fold Change)] positivas (Up regulation) e negativas (Down regulation), e os transcritos com expressões mais semelhantes (no significant differential expression = NoDiff), excetuando-se os transcritos sem expressão detectada e os transcritos sem teste estatístico. Para as categorias up e down regulated, também foram excluídos os transcritos sem significância estatística da expressão diferencial. Como critério de seleção final, os transcritos sem splicing alternativo (um gene com um único transcrito) foram utilizados para o qRT-PCR. Para aumentar o número de transcritos selecionados, os transcritos que pertenciam a um gene com dois transcritos alternativos foram analisados e somente o(s) exon(s) ou parte(s) do(s) exon(s) do transcrito elencado com diferencialmente expresso, que o diferenciava do outro transcrito foi(ram) utilizado(s) para o qRT-PCR. Os primers foram desenhados para todos os transcritos/exons selecionados utilizando o software PrimerExpress (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Um gene que codifica actina foi utilizado como gene de referência para ambos os materiais e quantificação relativa foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 10 ug de RNA total (Figura 1) obtidos de duas réplicas biológicas de cada tratamento foram enviados para a empresa Eurofins para sequenciamento.

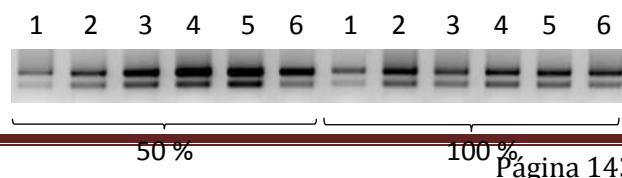


Figura 1: Análise de integridade das amostras de RNA de milho do genótipo B em gel de agarose 1,2% submetido a 110V por 40 minutos.

As análises de sequências de RNAseq de milho feitas na interface gráfica do Galaxy produziram resultados como os apresentados nas Figuras 2A, 2B e 3.

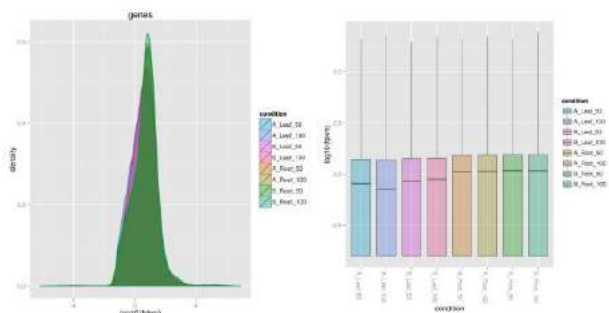


Figura 2 – (A) Distribuição dos escores de FPKM para cada amostra em milho. (B) Boxplots entre amostras. Boxplots de cada amostra para a variação dos seus valores de log (FPKM), que pode ser útil para a observação de tendências entre as amostras. Amostras de raiz A_Root_50, A_Root_100, B_Root_50 e B_Root_100 apresentando boxplots muito parecidos.

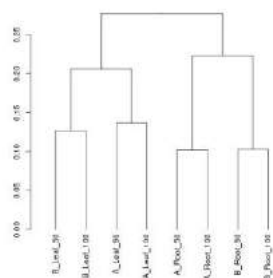


Figura 3 – Dendrograma criado a partir das amostras são úteis para determinar o grau de relacionamento entre as várias amostras. A primeira ramificação do dendrograma agrupou as amostras entre os diferentes tecidos (raiz e folhas). A seguir, ocorreu o agrupamento por genótipo (sensível e resistente). E, por último, ocorreu a separação por tratamento (reposição de 100% ou 50% da água perdida por evapotranspiração).

Dos 100 transcritos/exons selecionados do RNAseq, 79 reações de qPCR apresentaram resultados, 27 para *Down regulated*, 34 para *Up regulated* e 18 para transcritos com diferença de expressão não significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de transcritos diferencialmente expressos com RNAseq selecionados, reações que apresentaram resultados de qPCR e resultados confirmados.

Categoria	RNAseq	qPCR	RNAseq=qPCR
50-100_NoDiff	22	18	16
50-100_Up	49	34	31
50-100_Down	29	27	26

Dos 79 resultados para qPCR, apenas seis resultados não confirmaram os resultados obtidos para RNAseq. Um transcrito relacionado como *Down regulated* no RNAseq apresentou-se *Up regulated* no qPCR; três transcritos *Up regulated* em RNAseq não confirmaram essa condição no qPCR; e dois transcritos *NoDiff* apresentaram alguma diferença para qPCR.

As figuras 4 e 5 mostram a comparação entre os resultados de expressão de qPCR para as bibliotecas B-Root-50 x B-Root-100 de alguns transcritos.

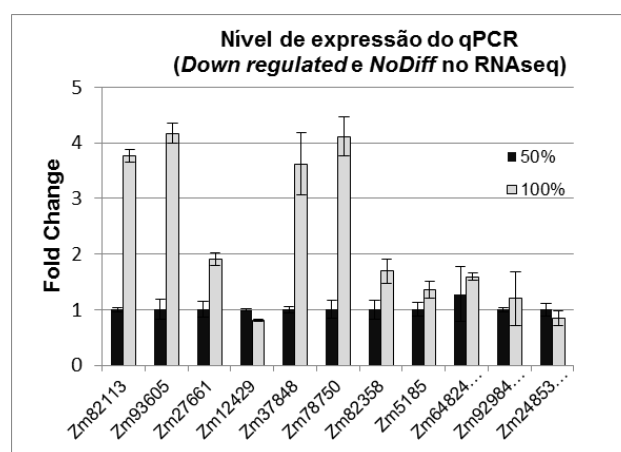


Figura 4: Nível de expressão dos transcritos. *Down-Regulated* em RNAseq: Zm82113, Zm93605, Zm27661, Zm12429, Zm37848, Zm78750, Zm82358 e Zm5185. *NoDiff*: Zm64824, Zm92984, Zm24853. Apenas o transcrito Zm12429 não apresenta resultados compatíveis entre RNAseq e qPCR.

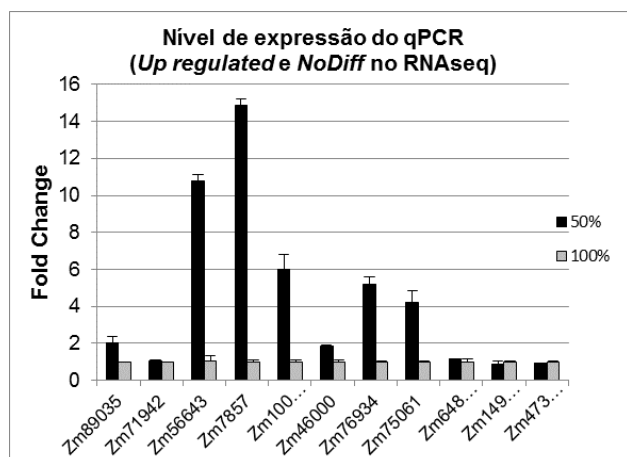


Figura 5: qPCR - Nível de expressão dos transcritos. *Up-Regulated* em RNAseq: Zn89035, Zn71942, Zn56643, Zn7857, Zn100181, Zn46000, Zn76934 e Zn75061. *NoDiff*: Zn64824, Zn14964, Zn47307. Apenas o transcrito Zn71942 não apresenta resultados compatíveis entre RNAseq e qPCR.

A comparação de expressão pelo método de RNAseq e qPCR confirmou os resultados de RNAseq. A grande maioria dos trabalhos publicados mostra a confirmação de resultados de RNAseq por qPCR, evidenciando que há grande coerência entre os dois métodos.

CONCLUSÕES

A identificação e caracterização de genes relacionados a mecanismos envolvidos no estresse hídrico em milho é de grande importância para o aumento da eficiência nos programas de melhoramento tanto pelo uso de transgênicos como transferência via marcadores moleculares. Contudo, requer extensiva análise de transcriptomas em diferentes situações e genótipos para levantamento de genes candidatos. Comparação de tratamentos entre raiz e parte aérea e sob estresse hídrico por RNAseq e qPCR são bastantes úteis para identificar genes envolvidos nesses processos metabólicos. Nesse trabalho foram comparados resultados obtidos para raiz entre as técnicas de RNAseq e qPCR. A qPCR é uma ferramenta potente para medir expressão genica e é utilizada para confirmar os resultados de RNAseq. qPCR permite ensaios sensíveis e específicos de expressão genica, mas requer caracterização robusta de genes normalizadores. O sequenciamento por RNAseq é um método mais recente de descrição de perfil da expressão genica de vários genes ao mesmo tempo e tem mostrado um avanço de sensibilidade comparado com os microarranjos. Aqui, foi possível

confirmar a expressão por qPCR da maioria dos transcritos elencados por RNAseq. A informação do RNAseq além de auxiliar a montagem das redes biológicas relacionadas com o estresse hídrico favorece a identificação de promotores ou regiões regulatórias capazes de ativar genes nessas condições.

AGRADECIMENTOS

Esse projeto teve a participação da FAPEMIG e Embrapa.

REFERÊNCIAS

- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.
- DEYHOLOS, M. K. (2010), Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, Cell & Environment*, 33: 648–654.
- Livak, J. K., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method, *Methods* 25 p402-408.
- Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:299–31.
- Reynolds M., Tuberosa R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 171–179 10.1016



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

“Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar”
