



## “PAPEL DA REDE DE HIFAS COMUNS NA NUTRIÇÃO NITROGENADA ENTRE CAFEIEIRO E BRAQUIÁRIA”

**Aluna:** NATALIA NAMIE NORIMATSU

**RA:**184936

**Orientadora:** Profa. Sara Adrián López de Andrade

**Local de execução:** Depto Biologia Vegetal – Instituto de Biologia – Unicamp

### INTRODUÇÃO

Na natureza a grande maioria das espécies de plantas vasculares está associada algum tipo de fungo micorrízico, formando associações simbióticas entre raízes e as hifas fúngicas. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), do subfilo Glomeromycotina, são capazes de estabelecer simbiose com aproximadamente 80% das plantas terrestres, inclusive com muitas de interesse agrônômico e habitam os solos de praticamente todos os ecossistemas terrestres. Um dos principais papéis da associação micorrízica arbuscular (MA) é o intercâmbio de nutrientes entre os parceiros simbióticos, isto é, entre os FMAs e suas plantas.

No sistema de consórcio cafeeiro-braquiária, no qual a gramínea é plantada nas entrelinhas dos cafeeiros, observaram-se resultados positivos no desenvolvimento do cafeeiro (Ragassi et al. 2013), uma vez que a cultura da braquiária favorece a cobertura do solo, evitando contato direto com os raios solares, que podem ser prejudiciais, além de contribuir na ciclagem de nutrientes para o cafeeiro, e na promoção da associação com FMAs o que beneficia a nutrição das plantas (Ragassi et al. 2013). Pesquisas realizadas até o momento relacionam o efeito positivo do desenvolvimento dos cafeeiros com uma possível interação da rede de hifas de ambas as plantas, resultando em uma rede comum de hifas micorrízicas (RMC, do inglês CMN “common mycorrhizal networks”) (Barto et al. 2012), que possivelmente permite a troca de nutrientes e reduz a competição intraespecífica entre as plantas (Montesinos-Navarro et al. 2016).

Neste trabalho propõe o estudo do papel de redes de hifas comuns em sistema de co-cultivo cafeeiro e braquiária na nutrição nitrogenada do cafeeiro. Tendo como hipótese que uma vez estabelecida uma rede de hifas comum entre plantas de cafeeiro e de braquiária, haverá a transferência de nitrogênio da braquiária para o cafeeiro, favorecendo a nutrição nitrogenada do cafeeiro.

### MATERIAIS E MÉTODOS



### Materiais biológicos

Foram utilizadas plântulas de cafeeiro, *Coffea arabica* var. obatã, e plantas de *Brachiaria brizantha*. As plantas receberam inóculo dos FMAs *Glomus macrocarpum* e *Rhizophagus irregularis*.

### Instalação do experimento

Foi instalado um experimento em condições de casa de vegetação utilizando vasos com capacidade de 10 L adaptados de tal forma a conter três compartimentos, aqui denominados: BRAQ (braquiária), HIFA (hifas micorrízicas), CAFÉ (cafeeiro). Esses compartimentos estavam separados por malha de náilon de 40  $\mu\text{m}$  de abertura (mesh), a qual somente permite o acesso de hifas fúngicas e não das raízes. Esses vasos foram enchidos com mistura de solo, areia e vermiculita.

### Aplicação foliar de ureia marcada

A uréia foi aplicada em todas as folhas das plantas de braquiária, por meio do cotonete do kit umedecido na solução de ureia correspondente. A quantidade de solução de ureia marcada aplicada ( $^{15}\text{N}$ ) a cada parcela experimental foi determinada pela diferença de massa antes e após a aplicação. Foram feitas alíquotas de uma solução estoque comum, sendo o volume/massa de cada solução conhecido para cada uma das parcelas experimentais. Durante a aplicação de ureia as plantas de café foram isoladas fisicamente da braquiária por meio de uma cartolina para evitar contaminação por possíveis aerossóis de ureia marcada.

### Coleta do material biológico

Foi separado e determinado previamente as partes que seriam coletadas. Do compartimento do café, separaram-se as folhas novas (FN) dos cafeeiros que foram as folhas mais jovens, as folhas maduras novas (FMN) que eram aquelas abaixo das folhas novas, a parte aérea (PAC) que seria o caule e o restante das folhas, as raízes (RC) lavadas e por fim, uma porção dos solos do compartimento do café (SC). Do compartimento da braquiária, separou-se a parte aérea (PAB) que seria toda a estrutura vegetativa, as raízes lavadas (RB) e uma parcela do solo (SB). Já no compartimento das hifas, foi coletado somente o solo (SH).

### Quantificação de micélio externo e Avaliação da colonização micorrízica

Para análise da extensão do micélio extrarradicular de FMAs, foi utilizado o método de flotação proposto por Boddington et al. (2000), segundo modificado por Melloni e Cardoso (1999). O comprimento total de hifas extra radiculares foi estimado sob microscópio óptico (amplificação de 10x) em 64 campos, e expresso em metros por grama de solo.



Para a coloração das raízes, estas passaram inicialmente por uma lavagem para retirar o etanol em que estavam armazenadas e depois por um clareamento (Phillips e Hayman. 1970). Depois da coloração das raízes, iniciou-se a estimativa da porcentagem de colonização micorrízica, pelo método da lâmina (Trouvelout et al. 1986). Depois da coloração das raízes, iniciou-se a estimativa da porcentagem de colonização micorrízica, pelo método da lâmina (Trouvelout et al. 1986) (Figura 4.). Para cada amostra, montaram-se três lâminas de dez segmentos de raiz de 1 cm cada com observação em microscópio (x20 – x60).

### Determinação do $^{15}\text{N}$ nos tecidos vegetais

A determinação do  $^{15}\text{N}$  foi realizada em espectrômetro de massa (IRMS), conforme método descrito em Barrie e Prosser (1996). Essas análises foram realizadas no laboratório de isótopos estáveis da University of California - Davis (UC-Davis) nos EUA (Stable Isotope Facility, Department of Plant, Davis, California, USA). Para calcular a quantidade de nitrogênio que foi aplicado em cada vaso após as aplicações com ureia marcada ou não ( $^{15}\text{N}$  ou  $^{14}\text{N}$ ), foi calculada a diferença entre o peso inicial da solução e o peso final depois da aplicação obtendo a quantidade que foi aplicada assim, realizando esse processo para as três aplicações. Quantificando o valor de nitrogênio na solução de ureia, pode-se achar a quantidade final de nitrogênio aplicado em cada vaso.

### Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey 5% para comparação das médias. Os dados referentes a porcentagem foram transformados para arcsen [raiz(x/100)].

## **RESULTADOS**

### Colonização micorrízica

A intensidade da colonização micorrízica nos fragmentos de raízes de braquiária e do cafeeiro foram similares em todos os tratamentos realizados, assim como na frequência de colonização micorrízica no sistema radicular e na quantidade de colonização dos fragmentos, ou seja, não obteve se diferença significativa entre as plantas ou em relação aos diferentes tipos de nitrogênio de forma que alterasse o experimento.

### Quantificação do micélio externo

Apesar dos dados demonstrarem uma aparente diferença entre os tratamentos, estatisticamente não se obteve diferença significativa nos tratamentos.

### Quantidade de nitrogênio aplicado



A quantidade de nitrogênio foi calculada considerando todas as variáveis é obtida em miligramas por vaso.

## DISCUSSÃO/CONCLUSÕES

Em estudo recentemente publicado mostra-se que a rede micorrízica comuns (RMC) podem potencialmente regular a transferência de nitrogênio entre uma planta doadora e uma planta receptora hetero-específica, ou seja, entre indivíduos de espécies diferentes (He et al., 2019). Esses autores também sugeriram que o nitrogênio derivado desta transferência seria dependente da força causada pela biomassa de plantas individuais.

No entanto, o nosso estudo não pode provar a transferência de nitrogênio entre plantas de braquiária (potenciais doadores) e plantas de cafeeiro (potenciais receptores).

Os resultados obtidos permitem afirmar que plantas de cafeeiro e de braquiária estavam efetivamente colonizadas pelos FMAs inoculados ou por aqueles fungos micorrízicos já presentes nas mudas dos cafeeiros, pois as mudas foram formadas em solo natural não estéril. Assim, as raízes de café mostraram taxas de colonização micorrízica de entorno de 72%, as plantas de braquiária com 92%.

No experimento realizado também foi possível verificar a presença de quantidades significativas de hifas de micélio externo de FMA nos três compartimentos (CAFÉ, BRAQ, HIFAS), o que representa, em potencial, a possibilidade de formação da rede de hifas comuns entre as micorrizas da braquiária e as do cafeeiro no nosso experimento. A formação desta rede é condição obrigatória para confirmar a transferência de N entre as plantas neste sistema.

No entanto, as análises de N<sup>15</sup> em folhas de cafeeiro mostraram que este isótopo estava em quantidades muito baixas e similares às encontradas em plantas com aplicação de ureia sem marcar (N<sup>14</sup>). Pelos resultados obtidos não é possível, portanto, confirmar a transferência de N<sup>15</sup> entre as plantas de braquiária e as de café. E com isto, nas nossas condições experimentais, refutamos a hipótese inicial de que RMC são capazes de atuar como via de transferência de nitrogênio entre plantas de braquiária e de cafeeiro, ao menos nas condições experimentais aqui relatadas

Contudo existem alguns pontos que podem ser discutidos em relação aos resultados obtidos, às condições experimentais e ao conjunto de procedimentos realizados durante este projeto.

Um possível motivo da ausência de concentrações significativas N<sup>15</sup> nas plantas de cafeeiro pode ser o fato de ter utilizado uma ureia marcada com baixa porcentagem de N<sup>15</sup>, uma vez que esta era de 23,04%, o que pode ter influenciado nossos resultados. Tal vez se tivéssemos utilizado ureia com 95-99%



de N15 a marcação poderia ter sido encontrada em folhas ou caules das plantas de café.

Alguns estudos mostram que as RMC tendem a alocar os recursos, como nitrogênio ou fósforo, a plantas com biomassa maior (He et al., 2019). Desta forma quanto maior o tamanho da planta, maior a aquisição de N15 via transferência por RMC, o que pode inibir o crescimento de plantas menores (Weiner, 1990).

Outros fatores podem ter potencializado a baixa concentração de N15 nas plantas do nosso experimento, como as vias indiretas de transferência que incluem a exsudação radicular ou movimento do N15 da raiz para o solo, e o vazamento de N15 pelo movimento da água, por exemplo, em casos de rega, que podem ser considerados relevantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barto, E. & Weidenhamer, Jeffrey & Cipollini, Don & Rillig, Matthias. (2012). Fungal superhighways: Do common mycorrhizal networks enhance below ground communication?

BARRIE, A. & PROSSER, S.J. (1996) Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W. & YAMASAKI, S., eds. Mass spectrometry of soils. New York, Marcel Dekker, p.1-46.

Boddington CL, Dodd JC (2000) The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and soil*, 218(1-2), 137-144.

He, Y., Cornelissen, J. H., Wang, P., Dong, M., & Ou, J. (2019). Nitrogen transfer from one plant to another depends on plant biomass production between conspecific and heterospecific species via a common arbuscular mycorrhizal network. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 8828-8837.

J. M. Phillips, D. S. Hayman (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55, p.158-161.

Trouvelot, A. (1986) *Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Mycorrhizae: physiology and genetics*, 217-221.

Ragassi, C. F., Pedrosa, A. W., & Favarin, J. L. (2013) Aspectos positivos e riscos no consórcio cafeeiro e braquiária.