

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES¹

Rayanne Pereira de Oliveira², Francisco Adriano de Souza³

¹ Trabalho financiado pela Embrapa

² Estudante do curso de Ciências Biológicas, FUNDAÇÃO EDUCACIONAL MONSENHOR MESSIAS UNIFEMM - CENTRO UNIVERSITÁRIO DE SETE LAGOAS, Bolsista PIBIC do Convênio FAPEMIG/Embrapa

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são considerados os simbiontes mais comuns de plantas terrestres e contribuem significativamente para o crescimento de diversas culturas de importância agrícola e florestal. A preservação de espécies de FMA em bancos de germoplasma é trabalhosa porque esses fungos são biotróficos obrigatórios, requerendo a multiplicação periódica em planta hospedeira. Além disso, a preservação de inóculo em solo e conservado em geladeira só garante a viabilidade por poucos anos. Nesse sentido, métodos de preservação que garantam a viabilidade desses fungos por longos períodos de tempo têm sido pesquisados. Nesse trabalho foram testadas técnicas de criopreservação de solo-inóculo seco contendo propágulos de FMA em nitrogênio líquido (NL) e congelamento em ultrafreezer -80 °C em relação à conservação em temperatura ambiente, geladeira e freezer a -20°C, sendo testadas as espécies *Gigaspora margarita* CNPMS 20 e *Glomus clarum* CNPMS10. As espécies testadas tiveram comportamento diferenciado em relação aos tratamentos de criopreservação, sendo que *Glomus* apresentou maior taxa de germinação após congelamento em NL e a *Gigaspora* em ultrafreezer a -80 °C. Esses resultados diferem dos publicados anteriormente, indicando que uma análise prévia, criteriosa de cada isolado é necessária para selecionar o melhor tratamento de criopreservação.

Palavras-chave: Criopreservação, fungos micorrízicos arbusculares, esporos e germinação.

INTRODUÇÃO

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), pertencem ao Filo Glomeromycota, são simbiontes obrigatórios de várias espécies vegetais (SMITH; READ, 2008) e contribuem para o

crescimento e a produção de diversas culturas de importância agrícola e ecológica (MOREIRA; SIQUEIRA 2006).

Por serem biotróficos obrigatórios, esses fungos não se reproduzem na ausência da planta hospedeira. Essa característica impõe dificuldades metodológicas, inclusive quanto à manutenção e preservação desses fungos em coleções de cultura, sendo necessário o cultivo periódico, com uma planta hospedeira para manutenção da viabilidade das culturas. Este procedimento é trabalhoso, demorado e demanda espaço, além disso, é passível de contaminação durante a fase de crescimento das culturas. Após multiplicação com a planta hospedeira, a preservação de FMA por períodos de 1 a 4 anos tem sido reportada quando armazenada em solo seco a 5 °C (SIQUEIRA et al., 1985). No entanto, esse método não garante a viabilidade desses fungos por longos períodos de tempo.

Conforme Tommerup (1985), apud Douds e Schenck (1990), a criopreservação pode ser a melhor opção dentre métodos de conservação em baixas temperaturas, porém há poucos procedimentos de rotina para FMA. Nesse sentido, foram feitas buscas na base de dados do portal ISI Web of Knowledge ISI ([http:// apps.isiknowledge.com](http://apps.isiknowledge.com)) utilizando as palavras-chaves (Cryopreservation; Spores of Arbuscul*), sobre estes procedimentos com FMA, e notamos que a afirmativa de Tommerup ainda é válida, pois foram encontradas somente três publicações referentes a este tema.

Douds e Schenck (1990) avaliaram a técnica de criopreservação, utilizando substâncias crioprotetoras que não foram efetivas, a não ser a trealose, e o melhor método foi a secagem lenta do vaso de cultivo e congelamento direto do solo inóculo a temperatura de -60 °C e -70 °C. O trabalho de Douds e Schenck (1990) tem sido uma referência e seus procedimentos foram adotados pela International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (<http://www.invam.caf.wvu.edu/>), com algumas modificações – peneiramento do solo inóculo para concentrar os esporos na fração argila e o congelamento em N₂ líquido.

O objetivo deste trabalho foi testar um método de criopreservação eficaz que permita a preservação de esporos de FMA, por longos períodos de tempo sem perda de viabilidade ou alterações genéticas. Foram avaliadas duas espécies (*Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*) e os resultados obtidos indicam comportamento diferencial entre essas quanto ao método de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de inóculo de FMA para a condução de experimentos.

As estirpes utilizadas foram *Glomus clarum* CNPMS10 e *Gigaspora margarita* CNPMS20, obtidas da coleção de culturas de FMA da Embrapa Milho e Sorgo. Essas estirpes foram multiplicadas separadamente em sistema de vasos-de-cultivo, de acordo com de Souza et al. (2006), utilizando como planta hospedeira uma mistura de braquiária (*Brachiaria decumbens*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e milheto (*Pennisetum glaucum*) para *G. clarum* e braquiária para *G. margarita*. Os vasos-de-cultivo foram mantidos em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

A irrigação foi realizada com água destilada, sempre que necessário, e adubações foram feitas com solução Magnavaca (MAGNAVACA, 1982), quando as plantas apresentavam algum sinal de deficiência nutricional.

Após um período de crescimento de 4 meses, a irrigação dos vasos foi interrompida, e as plantas deixadas sem irrigação até secagem completa da parte aérea e do substrato. Em seguida, a parte aérea das plantas de cada vaso foi cortada rente ao solo, e o substrato, denominado de solo-inóculo, contendo raízes e propágulos fúngicos, foi reservado para execução dos experimentos.

Preparo de amostras para criopreservação

Foram utilizados aproximadamente 450 g de solo inóculo de cada espécie de FMA para a montagem dos experimentos. O solo-inóculo de cada estirpe foi peneirado individualmente, sendo utilizadas duas peneiras, uma de malha de 2,00 mm e outra com malha 0,50 mm. Inicialmente, o solo-inóculo foi passado por peneira com malha de 2,00 mm, e posteriormente em peneira de malha 0,50 mm. O material retido nas peneiras foi colocado em sacos plásticos e armazenado em câmara fria, para uso posterior como inóculo. Esse procedimento visou homogeneizar o material e retirar a fração areia grossa e pedaços de raízes, bem como concentrar os esporos na fração argila (INVAN <http://invan.wvu.caf.edu>). O solo-inóculo que passou pela malha de 0,50 mm foi utilizado para o experimento.

Preparo dos experimentos de criopreservação

O solo-inóculo peneirado contendo esporos de cada espécie foi colocado em tubos tipo eppendorf de 2 ml, rotulados com dados sobre identificação da estirpe, tratamento e data, sendo doze repetições para cada tratamento.

Foram adotados cinco tratamentos para cada espécie de FMA, separadamente. Em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições, num total de 60 unidades experimentais.

Tratamentos:

- 1. Congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 2. Armazenamento direto em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3. Armazenamento direto em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 4. Armazenamento em geladeira;
- 5. Controle - armazenamento em temperatura ambiente;

Os tubos do tratamento 1 foram congelados em nitrogênio líquido por 10 minutos, em seguida, foram armazenados em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os demais tratamentos foram armazenados diretamente, conforme a condição estipulada.

Avaliação do efeito da criopreservação sobre a taxa de germinação de esporos

Extração dos esporos

Após aproximadamente 48 horas em que as amostras foram submetidas aos tratamentos foi dado início às extrações dos esporos para avaliação da taxa de germinação. Foi assumido que o dano causado pela criopreservação dos esporos ocorre durante as fases de congelamento e descongelamento e que o descongelamento rápido é tido como o melhor procedimento para descongelar organismos criopreservados (DOUDS; SCHENCK 1990).

Procedimento:

Foram utilizados 4 tubos eppendorfs de cada tratamento. Os tubos que receberam tratamento em baixas temperaturas foram colocados em banho-maria por 5 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; depois foram reunidos e transferidos para um tubo tipo falcon de 50 ml com identificação do devido tratamento.

A extração dos esporos dos FMA foi realizada pela técnica de peneiramento úmido seguido de centrifugação, conforme descrito a seguir:

- Inicialmente foi feita uma suspensão do solo-inóculo em 1000 ml de água por agitação vigorosa em um béquer, em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por alguns

segundos e passada em um conjunto de peneiras sobrepostas de malhas 425 μm e 53 μm , este procedimento foi repetido três vezes.

- Em seguida, o conteúdo retido nas peneiras foi lavado com jatos fortes de água (torneira) para que todas as partículas menores passassem através dela. O material retido da peneira de 53 μm foi lavado novamente, e posteriormente transferido para tubos tipo falcon de 50 ml.
- Os tubos foram balanceados e submetidos a dois ciclos de centrifugação, inicialmente a 3.000 rpm por 4 minutos, quando descartou-se o sobrenadante. Em seguida, foi adicionada solução de sacarose 65% ao tubo, o precipitado foi ressuspenso e procedeu-se a uma centrifugação 1.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi vertido em peneira 53 μm e lavado para eliminação do resíduo de açúcar. O material retido nessa peneira continha os esporos.

Limpeza e seleção esporos

Após extração, a suspensão contendo os esporos foi transferida para um béquer de 250 ml, passada por um conjunto de peneiras sobrepostas de malhas 355, 250, 180 e 150 μm para *Gigaspora* e 250, 180, 150 e 106 μm , para *Glomus* e lavada com água corrente.

O material retido em cada uma dessas peneiras foi transferido para placas de Petri e examinados em lupa. Para *Gigaspora* foram utilizados os esporos retidos nas peneiras de 250 e 180 μm e para o *Glomus* foram utilizados esporos retidos nas peneiras de 180, 150 e 106 μm . Os esporos foram transferidos para um béquer com jato de água destilada autoclavada.

Em seguida, as suspensões contendo os esporos foram sonicadas por 20 e 15 segundos, respectivamente, para *Gigaspora* e *Glomus*. Posteriormente foram lavadas com água destilada autoclavada e transferidas novamente para um béquer. O procedimento de sonicação e passagem por peneira foi repetido mais duas vezes. Terminado este procedimento, os esporos foram transferidos para uma placa de Petri, e selecionados utilizando o microscópio estereoscópio. Os esporos íntegros e sem sinais de oxidação ou parasitismo foram selecionados e transferidos para um tubo eppendorf 1,5 ml, utilizando uma micropipeta.

Desinfestação superficial dos esporos

O protocolo de desinfestação foi realizado em duas etapas. Para a desinfestação de *G. margarita*, os esporos foram transferidos do tubo eppendorf para um tubo tipo falcon de 15 ml estéril. Em seguida foi adicionada solução 2% de Cloramina T contendo uma gota de detergente e colocado em agitação no aparelho vórtex por 4 minutos. A próxima etapa da desinfestação foi conduzida em câmara de fluxo laminar. Inicialmente, retirou-se a solução de Cloramina T, em seguida foi adicionada solução de antibióticos estreptomina (200mg.L⁻¹) e gentamicina

(100mg.L⁻¹) esterilizada por filtração. O tubo foi tampado e vedado com plástico filme e deixado durante a noite na geladeira.

Para a próxima etapa foi utilizado um aparelho de filtração esterilizado (Figura 1), uma seringa de 3 ml, um filtro Millipore adaptado contendo papel de filtro no lugar de membrana de filtração. Inicialmente, os esporos foram transferidos para o aparelho de filtração, procederam-se duas lavagens com água estéril, após drenagem, foi adicionado solução de antibióticos, conforme descrito acima. Os esporos foram incubados no banho com antibióticos por 20 minutos, este processo foi repetido mais duas vezes. Em seguida, foram feitas duas lavagens com água estéril. Após essa etapa, o aparelho de filtração foi desmontado, e os esporos retidos no papel de filtro foram transferidos para placas de Petri utilizando água destilada estéril.

Para a desinfestação de *G. clarum*, o passo inicial em cloramina T teve duração de 5 minutos. A etapa seguinte da desinfestação foi feita em câmara de fluxo laminar no aparelho de filtração. Este procedimento difere da desinfestação da espécie *G. margarita*, pois os esporos não são deixados durante a noite em solução de antibióticos. O tempo de incubação em banho de Cloramina T 2% foi de 5 minutos, as outras etapas da desinfestação seguem o procedimento descrito anteriormente para *Gigaspora*.

Plaqueamento dos esporos e incubação

Os esporos desinfestados foram plaqueados em meio M (Bécard & Fortin 1988), no total de 30 a 50 esporos por placa, em câmara de fluxo laminar. Em seguida, as placas contendo os esporos foram transferidas para a câmara incubadora BOD, com temperatura entre 26 a 27 °C, permanecendo incubados por 33 e 43 dias, respectivamente para *Glomus* e *Gigaspora*.

Avaliação da taxa de germinação

Foram separadas 3 repetições (placas com esporos) de cada tratamento e foi feita a avaliação da taxa de germinação.



Figura 1: Desenho esquemático que ilustra as etapas da metodologia utilizada na criopreservação: produção do solo inóculo; preparo das amostras e dos experimentos; os tratamentos de criopreservação; extração dos esporos; limpeza e seleção dos esporos; desinfestação dos esporos; plaqueamento e incubação dos esporos e avaliação da taxa de germinação.

Análise estatística

A partir dos resultados de germinação em porcentagem foi feita a normalização dos dados pela transformação utilizando-se o arco seno da raiz quadrada, a análise de variância e o teste Tukey com média de erro $> 0,05\%$ utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos de criopreservação apresentaram comportamento diferenciado para as duas espécies de fungos avaliadas, notadamente para os tratamentos com congelamento em nitrogênio líquido (NL) e em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 1). Para a espécie *G. margarita* no tratamento com NL não houve germinação de esporos. Por outro lado, o congelamento direto a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ resultou em aproximadamente 60% de germinação em relação ao controle (Figura 2). Esse tratamento, apesar de ter reduzido a taxa de germinação em relação ao controle em 40%, pode ser satisfatório para armazenar esporos por longos períodos de tempo. *Glomus clarum* apresentou comportamento contrário a *G. margarita* (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de germinação das espécies *G. margarita* e *G. clarum* após tratamentos de criopreservação.

Tratamento ¹	<i>Gigaspora margarita</i> ²	<i>Glomus clarum</i> ²	Média ³
	%	%	%
NL	0 b	42,67 a	21,33 B
-80	48,82a	1,67 b	25,24 B
-20	69,76 a	74,0 a	71,88 A
Geladeira	82,78 a	78,5 a	80,63 A
Controle	82,22 a	77,97 a	80,09 A

¹ Tratamentos: NL (-80) – congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer a -80,°C; Freezer -80 - congelamento e armazenamento direto em freezer -80,°C; Freezer -20 - congelamento e armazenamento direto em freezer -20°C; Geladeira - congelamento e armazenamento direto em geladeira; Controle – armazenamento a temperatura ambiente.

² Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Tukey a > 0,05%.

³ Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas, diferem pelo teste Tukey a > 0,05%.

Para essa espécie, o tratamento com congelamento a -80 °C resultou em redução da taxa de germinação de mais de 98% em relação ao controle, enquanto no tratamento com NL essa redução foi de pouco mais de 50% (Figura 2). Esses resultados indicam claramente a diferença no comportamento quanto à criopreservação entre essas espécies. Doude e Schenck (1990) não avaliaram o comportamento em N₂ líquido e os dados para -60 °C a -70 °C não contemplam *G. clarum*, somente *G. etunicatum*, que no experimento realizado por eles, apresentou germinação entre 68,9 a 45,7% em solo-inóculo com diferentes tempos de secagem. Já os resultados reportados para *G. margarita* foram similares aos obtidos no presente estudo.

Espécies de *Gigaspora* têm sido reportadas como sensíveis ao congelamento (DOUDS; SCHENCK 1990). Esporos saudáveis apresentam coloração clara e gotas de lipídios no lúmen do esporo, já esporos envelhecidos ou afetados por congelamento apresentam coloração amarronzada e as gotas de lipídeos coalescem, indicando ocorrência de processos oxidativos e rompimento de membranas. Esporos dos tratamentos expostos a temperaturas de -80 e -160 °C apresentaram sinais de oxidação e rompimento de membranas, conforme descrito acima.

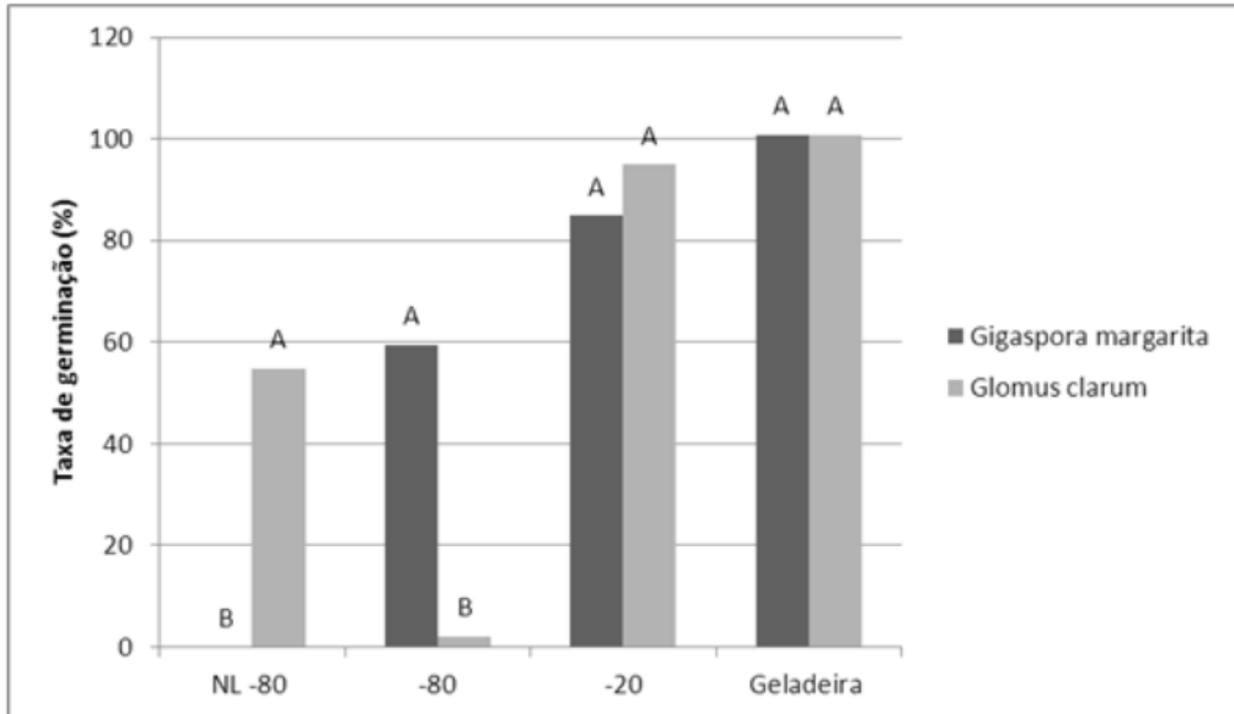


Figura 2: Taxa de germinação relativa (%), de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* após tratamento de criopreservação, com 43 e 33 dias de germinação, respectivamente. NL (-80) – congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer a -80 °C; Freezer -80 - congelamento e armazenamento direto em freezer -80 °C; Freezer -20 - congelamento e armazenamento; Geladeira - congelamento e armazenamento direto em geladeira. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos.

As espécies *G. margarita* e *G. clarum* apresentaram comportamentos semelhantes em relação ao armazenamento em geladeira, pois em ambas as espécies a germinação difere do controle (Tabela 1 e Figura 2). Juge et al. (2002), trabalhando com *Glomus intraradices*, concluíram que esporos armazenados a 4 °C durante certo período podem ter a taxa de germinação aumentada.

Como o volume de solo-inóculo contido nos criotubos é pequeno (2 mL), a garantia de recuperação da estirpe criopreservada deve levar em conta a taxa de germinação após o tratamento de criopreservação, o número de esporos armazenados por frasco e a eficiência de colonização das estirpes avaliada. Cada frasco de 2 ml possui 1,8 g de solo-inóculo com aproximadamente 761 esporos de *G. clarum* e 108 esporos de *G. margarita*. Com as densidades de esporos obtidas no inóculo utilizado neste trabalho para se obter mil esporos viáveis seria necessário armazenar 4 frascos do solo-inóculo com *G. clarum* em N₂ líquido, e para a *G. margarita* seria necessário o armazenamento de 16 frascos no ultrafreezer -80 °C.

CONCLUSÃO

Gigaspora margarita CNPMS 20 apresentou 48,82 % de germinação após criopreservação em ultrafreezer -80 °C, e não apresentou germinação no tratamento utilizando o N₂ líquido.

Glomus clarum CNPMS 10 apresentou resultado contrário a *G. margarita*, com 42,67% de germinação com tratamento utilizando N₂ líquido, e 1,67% de germinação após criopreservação em ultrafreezer -80 °C.

Conforme os resultados encontrados pode-se concluir que os métodos que se mostraram mais eficazes para a preservação dos esporos por longos períodos são para *G. margarita* a criopreservação utilizando o ultrafreezer -80 °C e para *G. clarum* o melhor método de criopreservação é o congelamento rápido em N₂ líquido e o armazenamento no ultrafreezer -80 °C.

Estudos mais aprofundados são necessários para que seja selecionado o melhor método de criopreservação a ser adotada para cada espécie, pois os resultados obtidos diferem dos anteriormente publicados.

AGRADECIMENTOS

À Fapemig, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor, e à Embrapa, pelo uso de sua infraestrutura para pesquisa.

REFERÊNCIAS

BERBARA, R. L. L.; SOUSA, F. A. de; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 53-88.

DOUDS JR., D. D.; SCHENCK, N. C. Cryopreservation of spores of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 115, p. 667-674, 1990.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: sistema de análise de variância. Lavras: UFLA, 2006.

FUNGOS micorrízicos arbusculares- FMAs. Disponível em: <<http://www.dcs.ufla.br/micorriza/index.html>>. Acesso em: 10 set. 2011.

JUGE, C.; SAMSON, J.; BASTIEN, C.; VIERHEILING, H.; ANDREW, C.; PICHÉ, Y. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. **Centre de Recherche en Biologie Forestière**, v. 12, p. 37-42, 2002.

MAGNAVACA R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.)**. 1982. 135 f. Tese (Doutorado) - University of Nebraska, Lincoln, 1982.

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

SIQUEIRA, J. O.; SYLVIA, M. D.; GIBSON, J.; HUBBEL, D. H. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, n. 11, p. 965-972, 1985.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis** 3. ed. Boston: Academic Press, 2008.

SOUTO, S. M.; PAULA, M. A. de; FRANCO, A. A. **Micorrizas vesicular-arbusculares em plantas forrageiras aspectos agronomicos e interações microbiológicas**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992. 37 p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 7).

SOUZA, V.C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D. & BARRETO, A. F. Estudo sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, p. 612-618, 2006.