

## **Análise de Linhagens Recombinantes Endogâmicas de Milho Visando à Relação entre a Eficiência da Aquisição de Fósforo e a Morfologia do Sistema Radicular**

Bárbara França Negri<sup>1</sup>, Gabriel Corradi Azevedo<sup>2</sup>, Fabiano Melo Matos<sup>3</sup>, Karla Sabrina Magalhães<sup>4</sup>, Cláudia Teixeira Guimarães<sup>5</sup> e Sylvia Morais de Sousa<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>UNIFEMM, Sete Lagoas, MG, babinegri@hotmail.com <sup>2</sup>UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, gabriel\_portoreal@yahoo.com.br <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, fabianomatos@gmail.com, <sup>4</sup>UFSJ, São João del-Rei, MG, karlasabrina@gmail.com. <sup>5</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia@cnpms.embrapa.br, <sup>6</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, smsousa@cnpms.embrapa.br.

**Resumo** - O fósforo (P) é um dos nutrientes menos disponíveis no solo e que mais limita o crescimento das plantas. Uma alternativa para aumentar a eficiência da aquisição de P é explorar a diversidade genética disponível e combiná-la com práticas de manejo do solo. Este estudo teve como objetivo analisar características radiculares de plântulas de milho que possam estar envolvidas na eficiência de aquisição de P. Para isso, foi utilizado um sistema de pasta de papel com solução nutritiva Magnavaca (P baixo - 2,5  $\mu$  M) para avaliar quatro características de raízes (comprimento total, volume total, diâmetro médio e volume de raízes finas - 1 a 2 mm) de uma população de 145 linhagens recombinantes (RILs) derivada de um cruzamento entre genótipos contrastantes para eficiência na aquisição de P. A análise de frequência mostrou que há variação dentro da população. Foi observada alta herdabilidade (79,08 a 86,09%) e baixo coeficiente de variação (7,12 a 22,79%). A análise de componentes principais permitiu diferenciar RILs de milho contrastantes com base nas características radiculares. Os resultados fenotípicos obtidos neste trabalho serão utilizados na descoberta de QTLs de morfologia radicular que também estejam envolvidos na eficiência de aquisição de P em milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, deficiência a P, RILs, PCA

### **Introdução**

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário agrícola, por ser matéria-prima de muitos produtos utilizados para a alimentação humana e animal (LUDWIG et al., 2009). Porém, a produção dessa cultura ainda deve se expandir devido à demanda por alimentos, que cresce com o aumento populacional. Um dos fatores mais limitantes para o aumento da produção em solos tropicais é a deficiência de fósforo (P). Nesses solos, o P se fixa ao ferro (Fe) e ao alumínio (Al) formando compostos altamente estáveis tornando o P indisponível para a planta (NOVAIS; SMYTH, 1999), elevando os custos da produção com o manejo de corretivos e fertilizantes químicos.

Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos podem ser utilizados pelas plantas para aumentar a capacidade de aquisição de P (VANCE et al., 2003), permitindo a proliferação de raízes para regiões do solo mais ricas neste nutriente (FORDE; LORENZO, 2001; AMTMANN et al., 2006). Mudanças na morfologia e na arquitetura da raiz, acúmulo de antocianinas, secreção de fosfomonoesterases, ácidos orgânicos na rizosfera e associação com

fungos micorrizas melhoram a eficiência da aquisição de P (RAGHOTHAMA, 1999).

Uma alternativa para aumentar a produtividade e diminuir gastos é explorar a variabilidade genética e desenvolver cultivares mais eficientes na aquisição de P (CRUZ et al., 2008). Este trabalho teve como objetivo avaliar sistema radicular de linhagens recombinantes endogâmicas (RILs) de milho em solução nutritiva sob baixo P, buscando relacioná-lo com a eficiência de aquisição de P.

### **Material e Métodos**

Foram utilizadas sementes de linhagens recombinantes endogâmicas (RILs) de milho compostas por 145 famílias F7 derivadas do cruzamento entre as linhagens parentais contrastantes em campo para aquisição de P, L3, eficiente, e L22, ineficiente.

As sementes de milho foram germinadas em papel de germinação, após esterilização, em câmara de crescimento. Após germinação por quatro dias, foram selecionadas três plântulas uniformes para cada uma das quatro repetições. Para garantir o estresse de P, foi retirado o endosperma, visando eliminar as reservas nutricionais da planta. Utilizou-se solução nutritiva de Magnavaca (pH 5,65) com  $2,5 \cdot M$  de P (MAGNAVACA et al., 1987) em um sistema composto de pastas de arquivo forradas com papel de germinação (HUND et al., 2009). Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3$  °C, temperatura noturna de  $20 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas, sob aeração contínua, e a solução nutritiva foi trocada a cada três dias.

Após 13 dias o sistema radicular foi fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software Winrhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo obtidos valores para quatro características de morfologia da raiz, sendo elas comprimento total (cm), diâmetro médio (mm), volume total ( $cm^3$ ), e volume de raízes finas (diâmetro entre 1 e 2 mm) ( $cm^3$ ).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, com três plantas cada. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) com comparações de médias usando o teste de menor significância (LSD) ( $p < 0,05$ ) utilizando-se os programas SAS (version 8.2; SAS Institute, Cary, NC) e GENES (CRUZ, 2006). Análise de Componentes Principais (PCA) foi feita para as 145 RILs e os dois parentais (L3 e L22) utilizando-se variáveis-padrão com o programa SAS.

## Resultados e discussão

O tamanho e a área do sistema radicular constituem pontos-chaves na habilidade das plantas em adquirir P do solo uma vez que a absorção é feita através de difusão e não por fluxo de massa (Lynch, 2011). A difusão exige uma grande proximidade da raiz e o nutriente no solo, portanto, é importante conhecer as características radiculares que favorecem a aquisição de P. Plantas com raízes mais superficiais, com maior proliferação de raízes adventícias (WALK et al., 2006; LYNCH, 2011), com desenvolvimento de raízes secundárias reduzido, expansão radial e maior alongação de raízes (LYNCH, 2011) são mais eficientes na aquisição de P. As plantas com essas características conseguem aumentar a proliferação para regiões do solo mais ricas em P (BONSER et al. 1996; LIAO et al., 2001), reduzir a competição entre plantas da mesma espécie (GE et al., 2000) e explorar o solo a um custo metabólico menor por unidade de comprimento (MILLER et al., 2003).

Visando conhecer as características radiculares da população de RILs, foi calculada a distribuição em classes dentro de cada uma das quatro características analisadas. A característica de comprimento total da raiz teve frequência maior para a classe de 100-150 cm (46,94%), seguida pela classe 150-200 (27,21%) e as menores foram os extremos, de 0-100 (14,29%) e >200 cm (11,56%) (Figura 1). O parental L3 se encontra dentro da classe de 100-150 e o parental L22, dentro da classe de 150-200 (Figura 1). Para o diâmetro médio, a classe que obteve maior frequência foi entre 0,85-0,95 mm (48,98%), seguida por 0,65-0,85 (31,97%) e as menores foram 0-0,65 (0%) e >0,95 (19,05%), sendo que os genótipos parentais (L3 e L22) ficaram classificados na classe >0,95 mm, em que obteve-se uma das menores frequências (19,05%). A frequência de volume total de raízes foi maior entre 0,6-0,9 cm<sup>3</sup> (52,38%), seguida por 0,9-1,2 (29,25%). As menores frequências encontradas foram 0,0-0,6 (10,21%) e >1,2 cm<sup>3</sup> (8,16%), sendo que os genótipos parentais se encontraram na classe de menor frequência (>1,2 cm<sup>3</sup>). Para o volume de raízes finas, foi encontrada a maior frequência na classe de 0,4-0,6cm<sup>3</sup> (46,94%), seguida por 0,0-0,4 (34,70%) e 0,6-0,8 (17%) e a menor frequência foi obtida na classe >0,8 cm<sup>3</sup> (1,36%), sendo que os genótipos parentais encontraram-se entre as classes que obtiveram menores frequências (L3 - >0,8 cm<sup>3</sup> e L22 - 0,6-0,8). Podemos inferir com estas análises que há variabilidade entre os genótipos dentro da população e que há uma menor frequência de genótipos nos extremos das características.

Além disso, foram obtidas as médias para comprimento total, diâmetro médio, volume total e volume de raízes finas das RILs, que foram 140,48 cm, 0,88 mm, 0,83 cm<sup>3</sup> e 0,45 cm<sup>3</sup> (Tabela 1). Os valores de CV para comprimento total, diâmetro médio, volume total e volume

de raízes finas foram 22,04, 7,12, 19,38 e 22,79%, respectivamente (Tabela 1). Os valores de herdabilidade obtidos foram 86,09, 79,08, 81,65 e 81,83% para comprimento total, diâmetro médio, volume total e volume de raízes finas, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados indicam que não há grande variação entre as repetições e que os dados são confiáveis e reproduzíveis.

A análise de componentes principais (PCA) permitiu diferenciar RILs de milho contrastantes com base nas quatro características morfológicas de raiz analisadas. O primeiro componente principal (PC1) explicou 61,5% da variação enquanto o segundo componente principal (PC2) explicou 31% da variação (Tabela 2). PC1 teve coeficientes positivos de autovetores para todas as variáveis, exceto para o diâmetro médio da raiz, enquanto PC2 teve coeficiente negativo para comprimento (Tabela 2). PC1 foi explicado principalmente pelo volume e pelo comprimento de raiz e PC2 foi explicado principalmente pelo diâmetro da raiz. Estas análises permitiram a identificação de grupos contrastantes para características do sistema radicular.

Os genótipos G113, G109 e G55 apresentaram menores valores para comprimento e volume (Figura 2), enquanto os genótipos G114, G66 e G25 obtiveram os maiores valores de comprimento e volume (Figura 2). Já os genótipos G55 e G25 apresentaram menor diâmetro médio, enquanto G109 e G66 apresentaram maior diâmetro médio e G113 e 114 apresentaram diâmetro médio intermediário (Figura 2). Os parentais L3 e L22 obtiveram valores médios em relação a comprimento e volume e de maior diâmetro da raiz em relação aos demais genótipos. Esses resultados mostraram que há variabilidade entre os genótipos para as diferentes características do sistema radicular e que é possível observar fenótipos contrastantes quando são considerados os extremos do PCA. Provavelmente plantas com maior comprimento e volume radicular e com menor diâmetro médio são mais eficientes, porém, estudos mais detalhados são necessários. Os resultados fenotípicos obtidos neste trabalho serão utilizados na descoberta de QTLs de morfologia radicular que também estão envolvidos com a eficiência na aquisição de P em milho.

### **Conclusão**

Baixo coeficiente de variação e alta herdabilidade foram observados para as quatro características de raiz analisadas, além disso, a análise de variância demonstrou que o fenótipo expresso na raiz é devido à carga genética proveniente dos seus genitores (L3 e L22).

Através das análises de frequência podemos inferir que existe uma grande variedade

fenotípica entre os genótipos das Rils e que futuramente estas características podem ser usadas em um programa de melhoramento da cultura de milho visando uma melhor eficiência na aquisição de P.

As análises de frequência e de PCA mostraram que há variabilidade entre os genótipos das RILs e que esta população pode ser utilizada para descoberta de QTLs envolvidos tanto na morfologia da raiz quanto na eficiência de aquisição de P em milho.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Gislene Rodrigues Braga Cristeli e Michelle Cristina Bastos Leal pela ajuda na montagem dos experimentos em câmara de crescimento. Agradecem também a Fapemig, CNPq, Embrapa e GCP pelo apoio financeiro.

### **Literatura citada**

AMTMANN, A.; HAMMOND, J. P.; ARMENGAUD, P.; WHITE, P. J. Nutrient sensing and signaling in plants: potassium and phosphorus. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 43, p. 209-256, 2006.

ALVES, V. M. C. Mechanism of plant adaptations to low phosphorus conditions. In: WORKSHOP, 2005, Brasília, DF. **Advances in improving acid adaptation of tropical crops and forages, and management of acid soil**. Cali: CIAT, 2005. p. 3-4.

BONSER, A. M.; LYNCH, J.; SNAPP, S. Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, Oxford, v. 132, p. 281-288, 1996.

CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006.

FERNANDES, C.; MURAOKA, T. Absorção de fósforo por híbridos de milho cultivados em solo de cerrado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 781-787, 2002.

FORDE, B.; LORENZO, H. The nutritional control of root development. **Plant and Soil**, v. 232, p. 51-68, 2001.

GE, Z. Y.; RUBIO, G.; LYNCH, J. P. The importance of root gravitropism for inter-root competition and phosphorus acquisition efficiency: results from a geometric simulation model. **Plant and Soil**, The Hague, v. 218, p.159-171, 2000.

HUND, A.; TRACHSEL, S.; STAMP, P. Growth of axile and lateral roots of maize: I development of a phenotyping platform. **Plant and Soil**, The Hague, v. 325, p. 335-349, 2009.

LIAO, H.; RUBIO, G.; YAN, X. L.; CAO, A. Q.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 69-79, 2001.

LUDWIG, M. P.; SCHUCH, L. O. B.; FILHO, A. L.; AVELAR, S. A. G.; MIELEZRSKI, F.; OLIVEIRA, S. de; CRIZEL, R. L. Desempenho de sementes e plantas de milho híbrido originadas de lotes de sementes com alta e baixa qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, p. 83-92, 2009.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p.1041-1049, 2011.

MAGNAVACA, R.; GARDNER C. O.; CLARK R. B. Evaluation of maize inbred lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H. W.; LONGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 255-265.

MILLER, C. R.; OCHOA, I.; NIELSEN, K. L.; BECK, D.; LYNCH, J. P. Genetic variation for adventitious rooting in response to low phosphorus availability: Potential utility for phosphorus acquisition from stratified soils. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p. 973-985, 2003.

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

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

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

WALK, T. C.; JARAMILLO, R.; LYNCH, J. P. Architectural tradeoffs between adventitious and basal roots for phosphorus acquisition. **Plant and Soil**, The Hague, v. 279, p. 347-366, 2006.

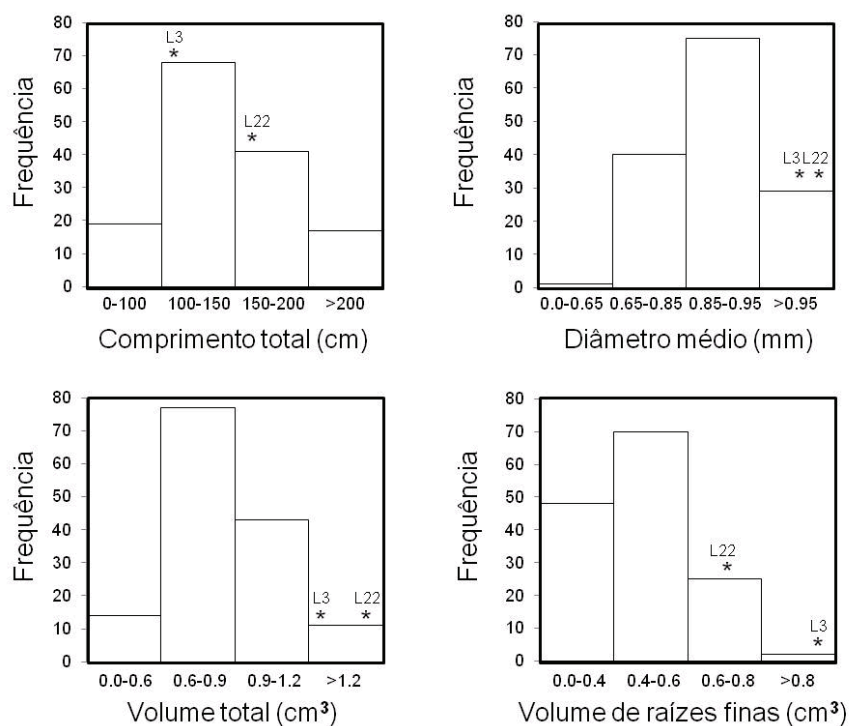
**Tabela 1.** Médias das características das raízes, coeficiente de variação (CV) e herdabilidade ( $h^2$ ) das 145 RILS.

Características	Média	CV (%)	$h^2$ (%)
Comprimento (cm)	140,48	22,04	86,09
Diâmetro médio (mm)	0,88	7,12	79,08
Volume (cm <sup>3</sup> )	0,83	19,38	81,65
Volume 1,0<d≤2,0 (cm <sup>3</sup> )	0,45	22,79	81,83

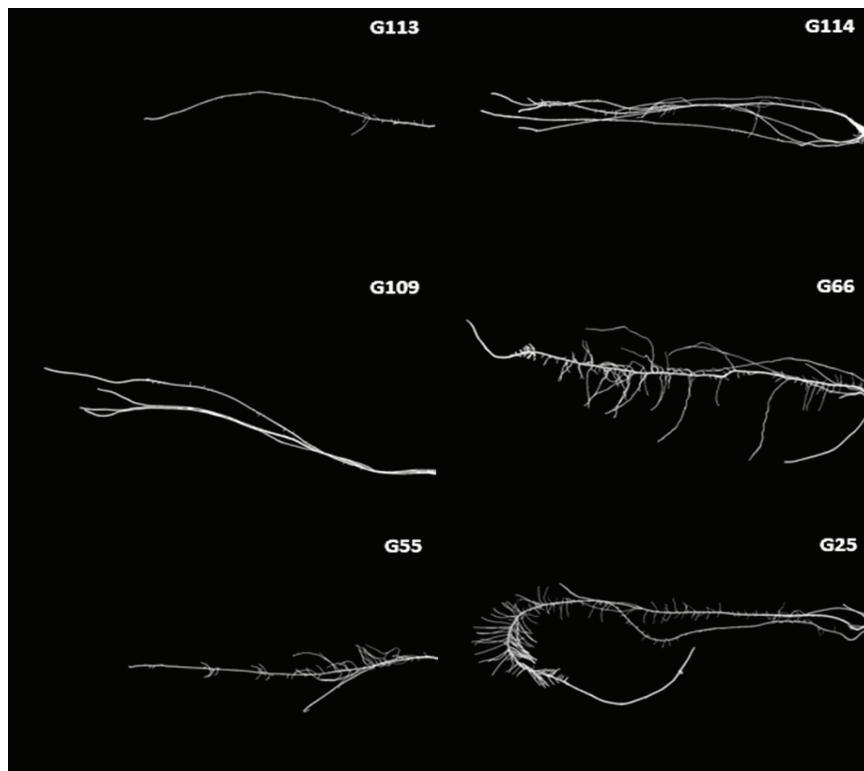
**Tabela 2.** Análise de Componentes Principais (PCA) das características da raiz (comprimento total, diâmetro médio, volume total, volume de raízes finas). Autovetores, autovalores e a proporção acumulativa da variância total (%) explicada são mostrados para cada componente principal (PC).

Variáveis	PC1	PC2
-----------	-----	-----

Comprimento total (cm)	0,57	-0,31
Diâmetro médio (mm)	-0,01	0,88
Volume total (cm <sup>3</sup> )	0,60	0,12
Volume 1,0<d≤2,0 (cm)	0,55	0,34
Autovetores	2,60	1,24
Variância acumulada	65,1 (%)	96,1 (%)



**Figura 1.** Distribuição em classes do comprimento total da raiz (cm), volume total (cm<sup>3</sup>), diâmetro médio da raiz (mm) e volume de raízes finas (1-2 mm) (cm<sup>3</sup>) na população de 145 RILs. Os parentais estão indicados por asteriscos.



**Figura 2.** Raízes de plântulas de RILs de milho (G113, G114, G109, G66, G55, G25) 13 dias após transplante para solução nutritiva de Magnavaca ( $2,5\mu\text{M P}$ ).