

**Variação da Comunidade Bacteriana na Rizosfera de Linhagens
de Sorgo
Selecionados para Eficiência no Uso de Nitrogênio**

[Previous](#) [Top](#)
[Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

ANDRÉA A. CARNEIRO, IVANILDO E. MARRIEL, DÉBORA F. RESENDE,
ELIANE A. GOMES e NEWTON P. CARNEIRO

Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151 –
andreac@cnpmc.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A rizosfera é a região do solo que é influenciada biológica e bioquimicamente pela raiz de uma planta. As alterações físico-químicas e biológicas que ocorrem neste ambiente sustentam uma intensa atividade microbiana (Rosado *et al.*, 1999). Microrganismos presentes na rizosfera disponibilizam nutrientes (fosfato inorgânico, nitrogênio), estimulam o crescimento de plantas (produção de reguladores de crescimento vegetal), controlam ou inibem a atividade de fitopatógenos e melhoram a estrutura do solo. Portanto, um maior entendimento das associações rizosféricas entre plantas e microrganismos, pode auxiliar na redução substancial de agroquímicos que atualmente são utilizados nas lavouras (Van Elsas *et al.*, 1999).

Mais de 99% dos microrganismos vistos ao microscópio não são ainda cultivados em meio de cultura. Entretanto, progressos têm sido feitos no desenvolvimento de ferramentas moleculares aplicadas aos estudos ecológicos de comunidades microbianas contornando a necessidade de se cultivar microrganismos para posterior identificação.

Atualmente, a estratégia molecular mais utilizada para análise de um ecossistema microbiano é a extração do DNA total do ambiente, seguido da amplificação do seu conjunto de genes SSU rDNA (small subunit ribossomal) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o grupo de microrganismos que se tem interesse em analisar (Wieland *et al.*, 2001). O gene rDNA possui regiões que são conservadas e outras variáveis dentro de uma mesma população, possibilitando o seu uso em estudos de ecologia microbiana. O fracionamento dos fragmentos de rDNA amplificados da partir de DNA total de solo pode ser realizado pela técnica do DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Nesta técnica, fragmentos de DNA de um mesmo tamanho mas com diferentes seqüências podem ser separados. A separação é baseada na variação da mobilidade eletroforética das diferentes conformações estruturais da molécula de DNA em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida). A separação das duplas fitas de DNA ocorre em regiões situadas ao longo da molécula, "melting domains", que possuem condições de desnaturação idênticas. Quando uma destas regiões se desnatura, ocorre mudanças na conformação da molécula de DNA passando de helicoidal para parcialmente desnaturada e, nessa situação, a migração no gel praticamente para. Portanto, moléculas com diferentes seqüências nucleotídicas vão parar de migrar em diferentes posições no gel (Muyzer & Smalla, 1998).

A Embrapa Milho e Sorgo tem realizado pesquisas voltadas para o desenvolvimento de genótipos de sorgo tolerantes aos estresses minerais, e pouco se conhece sobre a estrutura da comunidade microbiana presente na rizosfera dessas plantas. Nesse trabalho procurou-se caracterizar a comunidade bacteriana presente na rizosfera de linhagens de sorgo selecionadas para a eficiência de uso de nitrogênio, cultivados sob as mesmas condições de adubação nitrogenada. O objetivo do trabalho foi verificar se existem diferenças qualitativas ou quantitativas com relação às bactérias associada às raízes dos diferentes cultivares de sorgo estudados, que podem estar relacionadas com a eficiência de uso de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas amostras de solo da rizosfera de 11 linhagens de sorgo do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo previamente selecionadas para eficiência no uso de nitrogênio (kg grãos.kg^{-1} N aplicado) e de uma amostra de solo não rizosférico. Os diferentes genótipos foram cultivados em Latossolo Vermelho Distrófico, fase cerrado, com baixa disponibilidade de N, distribuídos em um delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições. De acordo com a análise química do solo, efetuou-se uma adubação básica com P_2O_5 , K_2O , além de micronutrientes e 12 kg.ha^{-1} N, como sulfato de amônio, aplicada no plantio. Não se efetuou adubação nitrogenada em cobertura. No florescimento, seis plantas de cada parcela foram retiradas com o sistema radicular inteiro. As mesmas foram transferidas para o laboratório, onde as raízes foram destacadas e deixadas secar à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o excesso de solo nas raízes foi dispensado e somente o solo bem aderido foi considerado como rizosférico. Amostras do solo compostas de seis sub-amostras retiradas nos espaços entre as parcelas experimentais, nas três repetições foram consideradas solo não rizosférico.

DNA total foi extraído de 500 mg de solo utilizando o Kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista CA USA). Os DNAs de solo isolados foram inicialmente amplificados por PCR, utilizando-se primers universais para amplificação do rDNA bacteriano F530 (5'- TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e R1401 (5'- GCG TGT GTA CAA GAC CC - 3'). Cada 25 µL de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de oligonucleotídeos iniciadores, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies - Brasil). As condições de amplificação desta região foram 20"- 92°C, 30"- 50°C, 1'- 72°C durante 35 ciclos. Estes fragmentos gerados foram reamplificados utilizando os primers 968CG (5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC - 3') e R1401, de maneira similar a primeira, modificando apenas as condições de amplificação (1' – 94°C, 1' – 55°C, 2' – 72°C; 35 vezes). Todas as reações foram finalizadas com uma extensão a 72°C por 7 min. Os produtos da amplificação dos conjuntos F 968CG e R1401 foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando a técnica do DGGE durante 16 horas, 70V à 60°C e corados com prata (Miethling *et al.*, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação por PCR do rDNA das bactérias da rizosfera das linhagens de sorgo utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores F530/R1401 e F968/R1401 resultou em fragmentos de 870 e 430 pares de bases, respectivamente (Figura 1A e 1B).

As bandas de rDNA amplificadas por PCR foram recuperadas de todas as amostras de solo rizosférico e do controle não rizosférico. Efeito do tipo de cultivar utilizado sobre a comunidade bacteriana presente foi claramente observado (Figura 2).

Os diferentes padrões de DGGE puderam, em parte, ser correlacionados com a eficiência no uso de nitrogênio (kg grãos.kg⁻¹ N aplicado). No solo não rizosférico um menor número de bactérias foi encontrado quando comparado com as demais amostras utilizadas. Cultivares com uma produtividade média maior do que 500 kg grãos.kg⁻¹ N aplicado (cultivares números 14 e 15), apresentaram uma rizosfera mais complexa do que os cultivares com produtividade média menor do que 100 kg grãos.kg⁻¹ N aplicado (cultivar 13). Nos cultivares com produtividade entre 200 e 500 kg grãos.kg⁻¹ N aplicado, observou-se maior variação no padrão de bandas do DGGE. Entretanto, todos apresentaram uma rizosfera mais complexa do que o cultivar com menor produtividade, a qual foi bastante similar ao solo não rizosférico. Assim pode-se hipotetizar a existência de associações entre bactérias e raízes de plantas de sorgo, para um melhor aproveitamento de nitrogênio do solo e, consequentemente, maior produtividade. Estas linhagens apresentando rizosferas contrastantes serão utilizadas em estudos futuros para um melhor entendimento da relação planta versus bactéria e eficiência no uso de nitrogênio.

LITERATURA CITADA

MIETHLING R G, WIELAND H, BACKHAUS H, TEBBE CC. 2000. Variation of microbial communities in response to crop species, soil origin and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L 33. *Microb. Ecol.* 40:43-56.

MUYZER G, SMALLA K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhek.* 73: 127-141.

ROSADO A S, DUARTE G F, MENDONÇA-HAGLER L C. 1999. In: Soil fertility, soil biology, and plant nutrition interrelationships. J O Siqueira, F M S Moreira, A S Lopes, L R G Guilherme, V Faquin, A E Furtini Neto, J G Carvalho (eds). Lavras. Minas Gerais. Brasil. pp. 429-448

VAN ELSAS J D, VAN OVERBEEK L S. WIELAND G, NEUMANN R, BACKHAUS H. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5849-5854

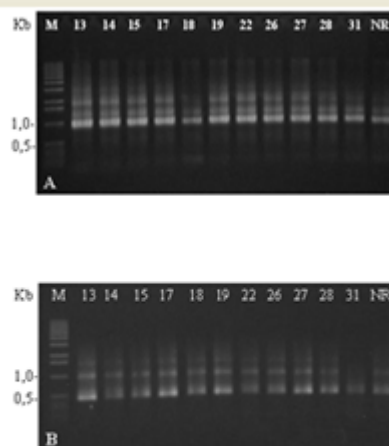


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F530R:1401 (A) e F968R:1401 (B). M - 1 Kb ladder, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 28 e 31 - solos rizotópicos de 11 linhagens de sorgo do Banco Ativo de Germoplasma da Empresa Milho e Sorgo previamente selecionadas para eficiência para eficiência no uso de nitrogênio (kg grão.kg^{-1} N aplicado), NR - solo não rizotófico.

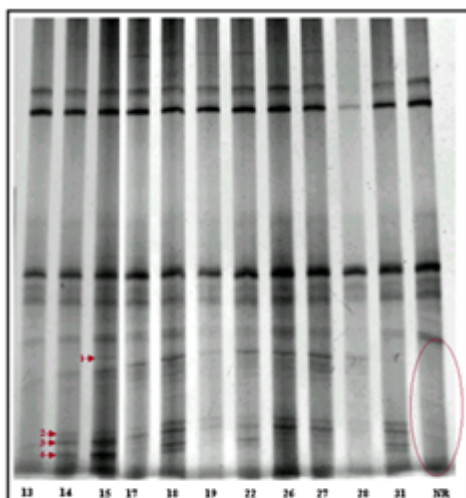


Figura 2 - Eletroforese em gel de D-DOE. Solos rizotópicos de 11 linhagens de sorgo do Banco Ativo de Germoplasma da Empresa Milho e Sorgo previamente selecionadas para eficiência no uso de nitrogênio (kg grão.kg^{-1} N aplicado), e de uma amostra de solo não rizotófico (NR). As linhagens 22 e 13 são consideradas como de baixa eficiência no uso de nitrogênio com produtividade média $< 100 \text{ kg grão.kg}^{-1}$ N aplicado, as linhagens 14 e 15 são consideradas como de alta eficiência no uso de nitrogênio com produtividade média $> 500 \text{ kg grão.kg}^{-1}$ N aplicado, as demais linhagens 31, 28, 27, 26, 19, 18 e, 17 apresentaram uma produtividade entre 200 e $500 \text{ kg grão.kg}^{-1}$ N aplicado.

