

Análise das Comunidades Bacterianas Presentes nas Rizosferas de Variedades de Milho Sensíveis e Tolerantes ao Alumínio Plantadas em Solo de Cerrado

Fabio F. Mota^{1*}, Eliane A. Gomes², Ivanildo E. Marriel², Edilson Paiva² e Lucy Seldin¹

¹ Instituto de Microbiologia – UFRJ & ² Embrapa Milho e Sorgo
E-mail *fabio@micro.ufrj.br

Palavras chaves: Alumínio, bactérias, Cerrado, DGGE e Milho

INTRODUÇÃO

Quarenta por cento dos solos aráveis do nosso planeta são ácidos e apresentam limitações para a produção agrícola [1]. O principal impedimento para o cultivo de plantas nesses solos é o alumínio, o qual é solubilizado pela acidez do solo, sendo encontrado na sua forma catiônica (Al^{3+}) que é tóxica para muitas espécies de plantas. A toxicidade por alumínio resulta, dentro de minutos ou horas, na inibição do crescimento das raízes, levando a uma deficiência na captação de água e nutrientes [2]. Os efeitos subsequentes da intoxicação por alumínio são a redução do crescimento e da produtividade da planta. A produção agrícola em solos ácidos pode ser viável através da neutralização da acidez do solo com calcário ($CaCO_3$) ou amônia (NH_4), por exemplo, e pelo uso de variedades de plantas mais tolerantes ao alumínio. Neste sentido, o desenvolvimento de cultivares de milho mais tolerantes ao alumínio vem ajudando a aumentar a produção agrícola em países em desenvolvimento. Muitos mecanismos de tolerância ao alumínio já foram descritos em milho. Dentre estes mecanismos, a exsudação de ácidos orgânicos aniônicos tem sido descrita como a mais eficiente forma de proteção para a planta. Esses ácidos orgânicos secretados pela raiz, como o malato, citrato e oxalato, são capazes de quelar a forma tóxica do alumínio (Al^{3+}), formando complexos não tóxicos e conferindo um efeito protetor à planta [4]. Os exsudatos liberados pela raiz também alteram a química do solo e influenciam a comunidade bacteriana que coloniza a rizosfera. Alterações nessas comunidades bacterianas podem ser influenciadas pela composição e quantidade de exsudatos liberados pela raiz. Estes exsudatos podem variar dentro de uma mesma variedade, dependendo da idade da planta, do metabolismo, da condição nutricional, de estresse e de outros fatores ambientais ou entre diferentes variedades de uma mesma espécie [5, 6, 7, 8]. O objetivo deste estudo foi comparar as comunidades bacterianas das rizosferas de variedades de milho sensíveis e tolerantes ao alumínio cultivadas sob diferentes condições de saturação de alumínio tóxico. Para tal, amostragens foram realizadas 30 e 90 dias após o plantio em solo de Cerrado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Variedades de milho (*Zea mays*) e condições experimentais: Duas variedades de milho tolerantes (Cateto 237 e L3) e uma sensível (L16) foram cultivadas em solo de Cerrado (EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas, MG) sob diferentes condições de saturação de alumínio tóxico (0 e 30%). Antes do plantio os valores de pH do solo foram ajustados para 5,0 (30% de saturação de alumínio) e 6,3 (0% de saturação de alumínio). Trinta e noventa dias após o plantio, amostras de solo rizosférico e de solo não rizosférico foram coletadas e mantidas a -20°C até a extração de DNA.

Extração de DNA e PCR-DGGE: Amostras de DNA foram extraídas pelo kit para solo Fastprep DNA Spin (Qbiogene, BIO 101 Systems, Carlsbad, CA, USA). O DNA obtido foi então amplificado por PCR com os iniciadores U968 + grampo de GC e L1401 como descrito

anteriormente por Peixoto *et al.* [9]. Perfis de DGGE das comunidades bacterianas foram obtidos através da análise do 16S rDNA das comunidades.

Comparação dos perfis das comunidades: Após o DGGE, os padrões de bandas obtidos foram comparados através do software NT-SYS (versão 2.02, Exeter Software, Setauket, NY), utilizando UPGMA (“Unweighted pair group with mathematical averages”) e o coeficiente de DICE.

Identificação das bandas de DGGE: As bandas foram retiradas dos géis de DGGE, reamplificadas usando os iniciadores U968 e L1401, clonadas no vetor pGEM-T e seqüenciadas com os iniciadores M13F e M13R em um seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As seqüências obtidas foram identificadas usando BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e o programa Seqmatch com o banco de dados RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora as variedades de milho sensíveis e tolerantes ao alumínio tenham tido o seu crescimento e produtividade afetados de maneiras diferentes, quando cultivadas na mesma condição de alumínio (dados não mostrados), suas rizosferas mostraram perfis de DGGE muito similares (Figura 1). Trinta dias após o plantio, as rizosferas obtidas sob a condição de estresse por alumínio apresentaram perfis mais semelhantes às amostras de solo não rizosférico do que das cultivadas sob uma condição não estressante de alumínio (Figura 1. I). Estes perfis mostraram algumas populações de Actinobacteria (bandas 3, 4 e 7) e Rhizobiales (bandas 6, 11 e 18) (Figura 1. I e Tabela 1) e outras bandas que não foram observadas nas rizosferas sem alumínio tóxico. Por outro lado, perfis rizosféricos obtidos sob a condição não estressante mostraram a prevalência de uma banda identificada como Burkholderiales (banda 5) nas plantas saudáveis. Noventa dias após o plantio, apenas as amostras de solo não rizosférico apresentaram uma população prevalente (Figura 1. II, banda 11) identificada como Rhizobiales (Tabela 1). Uma população de Actinobacteria (Figura 1. II, banda 6) foi observada somente em amostras de solo não rizosférico obtidas na condição de 30% de saturação de alumínio. Noventa dias após o plantio, amostras rizosféricas obtidas sob a condição de 30% de saturação de alumínio mostraram perfis de DGGE mais similares às amostras rizosféricas obtidas na condição de 0% de saturação de alumínio do que das amostras de solo não rizosféricos (Figura 1. II).

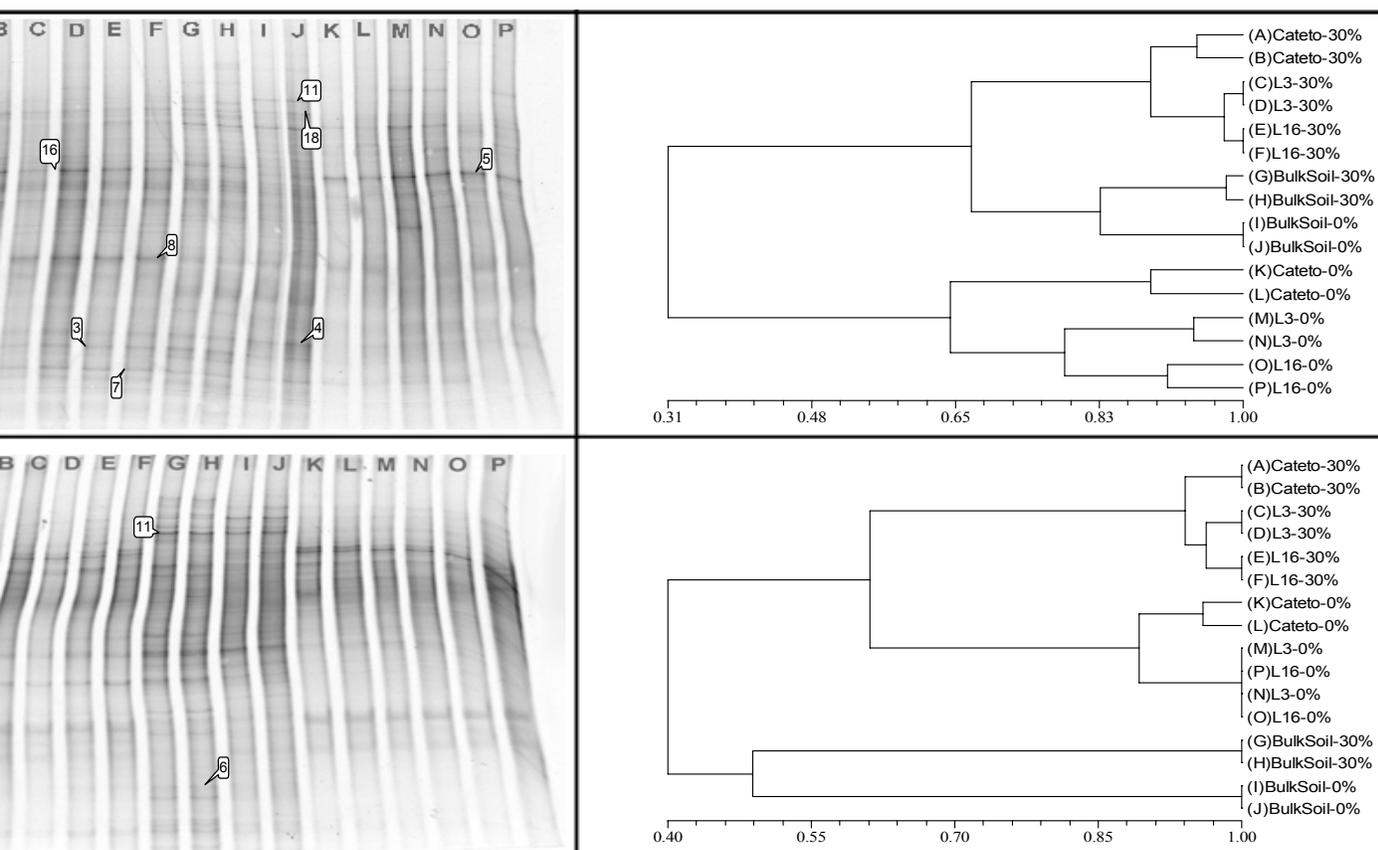
CONCLUSÃO

Comunidades bacterianas da rizosfera de milho foram mais afetadas pela condição de saturação de alumínio do que pelas variedades de milho cultivadas (sensíveis e tolerantes). Além disso, diferenças foram observadas entre os tempos de amostragem (30 e 90 dias após o plantio). Trinta dias após o plantio, as rizosferas obtidas na condição de estresse pelo alumínio mostraram perfis de DGGE mais similares ao solo não rizosférico do que as rizosféricas obtidas na condição não estressante, mostrando que o estresse metabólico da planta pode afetar a comunidade bacteriana na rizosfera.

LITERATURA CITADA

- [1] von Uexküll, H. R. & Mutert, E. (1995) *Plant Soil* **171**, 1–15.
- [2] Kochian, L. V. (1995) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 237–260.
- [3] Delhaize, E.; Ryan, P.; Hebb, D.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T. & Matsumoto, T. (2004) *PNAS* **101**, 15249-15254.
- [4] Ryan, P.; Delhaize, E. & Randall, P. (1995) *Planta* **196**, 103–110

- [5] De Leij, F.; Whipps, J. & Lynch, (1994) *Microb Ecol* **27**, 81–97
- [6] Griffiths, B.; Ritz, K.; Ebbelwhite, N. & Dobson, G. (1999) *Soil Biol Biochem.* **31**,145–153
- [7] Lupwayi, N.; Rice, W. & Clayton, G. (1998) *Soil Biol Biochem* **30**, 1733–1741.
- [8] Mahaffee, W. & Kloepper, J. (1997) *Microb Ecol* **34**, 210–223
- [9] Peixoto, R.; Coutinho, H.; Rumjanek, N., Macrae, A. & Rosado A. (2002) *Lett in Appl Microbiol* **35**, 316-320.



Perfis de DGGEs das comunidades bacterianas do solo não rizosférico e de solo rizosférico de variedades de síveis e tolerantes ao alumínio, cultivadas sob condições de estresse por alumínio e não estressante, obtidas 30 90 dias (II) após o plantio e seus respectivos dendrogramas construídos pelo coeficiente de DICE e o método 1A. As bandas indicadas nos géis de DGGE foram seqüenciadas e suas identificações são apresentadas na

Tabela 1. Identificação das bandas de DGGE obtidas 30 (I) e 90 (II) dias após o plantio pelos softwares SeqMatch com o banco RDP (Ordem) e BlastN com o banco NCBI (primeiro hit)

BANDAS	ORDEM (RDP)	BLASTN (NCBI 03/05/06)
I-6	Rhizobiales	AY917421.1 Uncultured bacterium clone 1700a-25
I-18	Rhizobiales	AJ863369.1 Uncultured bacterium associated with poplar (<i>Populus</i> sp.) trees
I-11	Rhizobiales	AY391680.1 Uncultured soil bacterium clone M64 from manure-treated agroecosystem
I-5	Burkholderiales	AY278883.1 Beta proteobacterium T2-17 isolate T2-17
I-16	Burkholderiales	AF297697.1 <i>Telluria mixta</i> from endophytic bacterial communities of potato
I-8	Acidobacteriales	AY930313.1 Uncultured soil bacterium clone Y8-18 from Australian soil
I-4	unclassified_Actinobacteria	AY326627.1 Uncultured soil bacterium clone 1202-2 from Amazon soil
I-7	Actinomycetales	AY917754.1 Uncultured bacterium clone 1969b-35
I-3	Actinomycetales	AY360165.1 Micromonospora sp. II9
II-6	Rubrobacterales	AY321277.1 Uncultured bacterium clone SM-OTU59
II-11	Rhizobiales	AJ863369.1 Uncultured bacterium associated with poplar (<i>Populus</i> sp.) trees

