

## Diversidade de *Paenibacillus* spp. na rizosfera de quatro cultivares de sorgo plantados em solo de Cerrado sob condições contrastantes de nitrogênio

Marcia R.R.Coelho<sup>1\*</sup>, Fabio Faria da Mota<sup>1</sup>, Ivanildo E. Marriel<sup>2</sup>, Edilson Paiva<sup>2</sup>, Alexandre S. Rosado<sup>1</sup>, Lucy Seldin<sup>1</sup> & Newton P. Carneiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Microbiologia – UFRJ & <sup>2</sup> EMBRAPA-CNPMS; \*marciarrc@ufrj.br

Palavras chaves: Rizosfera de sorgo, Adubo nitrogenado, *Paenibacillus*, *rpoB* e DGGE

### Revisão bibliográfica

Entre as 68 espécies do gênero *Paenibacillus*, nove (*P. polymyxa*, *P. durus*, *P. graminis*, *P. macerans*, *P. borealis*, *P. odorifer*, *P. wynnii*, *P. brasilensis*, e *P. peoriae*) possuem estirpes com habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico [1, 2]. São bactérias de vida livre que habitam o solo e a rizosfera de diversas plantas e, além de fixarem o nitrogênio atmosférico, algumas estirpes podem influenciar o crescimento e a saúde de plantas através da produção de fitormônios, quitinases, proteases, antibióticos e da solubilização do fosfato [3, 4, 5]. Estudos têm mostrado que a rizosfera de várias plantas não leguminosas, especialmente da família *Poaceae*, é colonizada por um ou mais gêneros de diazotróficos de vida livre, incluindo estirpes de *Paenibacillus* [3, 4]. Apesar da quantidade de nitrogênio fixado por diazotróficos de vida livre ser pequena, quando comparada aos diazotróficos simbiotes, microrganismos de vida livre estão presentes na maioria dos solos e algumas vezes podem representar uma fonte importante de nitrogênio [6, 7].

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma cultura importante no Brasil devido a sua alta produtividade de grãos e a larga utilização como ração animal. Esta planta se desenvolve bem nos meses com menor disponibilidade de chuvas, e essa característica faz desta planta uma cultura ainda mais promissora para o nordeste do Brasil. Diferentes cultivares de sorgo tem sido desenvolvidos pela EMBRAPA-CNPMS na tentativa de reduzir a utilização do adubo nitrogenado. Dentre 400 cultivares de sorgo plantados em solo de Cerrado com altos e baixos níveis de nitrogênio, 24 cultivares foram considerados eficientes por atingirem o crescimento máximo e não apresentarem os sintomas característicos da falta de nitrogênio (amarelamento das folhas e baixo crescimento). Os demais cultivares foram considerados ineficientes por necessitarem de altos níveis de nitrogênio para crescerem bem.

O gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, foi escolhido para este estudo pois estudos já comprovaram a utilidade do uso deste gene em experimentos de taxonomia e diversidade de *Paenibacillus* em solo e rizosfera

de plantas [8, 9]. Nesta abordagem, problemas relacionados a múltiplas cópias do gene que codifica o rRNA 16S em *Paenibacillus* podem ser evitados e, além disso, os perfis de DGGE são menos complexos e mais fáceis de se analisar do que os obtidos com fragmentos de rDNA 16S.

Neste estudo foram utilizados quatro cultivares de sorgo, dois considerados eficientes (IPA 1011 e FBS 8701-9) e dois ineficientes (IS 5322-C e IS 6320). Os cultivares foram plantados em solo de Cerrado com altos e baixos teores de nitrogênio, 12 kg/ha e 120 kg/ha respectivamente. Noventa dias após o plantio as amostras foram coletadas e a diversidade de populações de *Paenibacillus* foi avaliada através de métodos moleculares como PCR-DGGE e biblioteca de clones com base no gene *rpoB*. Assim pretende-se demonstrar se existe ou não uma influência do cultivar e da quantidade de nitrogênio aplicado no solo na composição das populações de *Paenibacillus*.

### **Materiais e Métodos**

Cultivares de sorgo e condições experimentais: Quatro cultivares de sorgo foram cultivados, sendo dois eficientes (IPA 1011 e FBS 8701-9) e dois ineficientes (IS 5322-C e IS 6320), em solo de Cerrado (EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas, MG) e submetidos a níveis contrastantes de adubação nitrogenada, 12 kg/ha e 120 kg/ha. As amostras foram coletadas na época de floração, 90 dias após o plantio, e mantidas a -20°C até a extração de DNA.

Extração de DNA e PCR-DGGE: Amostras de DNA foram extraídas utilizando-se o kit para extração de DNA do solo "Fast DNA Spin kit for soil" (Qbiogene, BIO 101 Systems, CA, USA). O DNA obtido foi primeiramente amplificado com os iniciadores *rpoB*1698f e *rpoB*2041r para a amplificação das seqüências do gene *rpoB*. Para a amplificação das seqüências de *rpoB* de *Paenibacillus* foi utilizado um sistema de PCR "semi-nested". Os produtos gerados na amplificação de seqüências de *rpoB* foram utilizados como molde para uma segunda reação de amplificação utilizando-se os iniciadores *rpoB*1698f + o grampo de GC em conjunto com *rpoB*PAEN como descrito por Mota et al. [10] gerando um produto de aproximadamente 280 pb. Estes produtos foram então submetidos a um gel de DGGE para a obtenção dos perfis da comunidade de *Paenibacillus* com base no gene *rpoB*. Algumas bandas foram retiradas do gel, reamplificadas e seqüenciadas. As seqüências obtidas foram identificadas usando-se BLAST-N ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) com o banco de dados Genbank.

Comparação dos perfis das comunidades: Os padrões de bandas obtidos no gel de DGGE 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.

Clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR: Os produtos de PCR *rpoB* do cultivares IPA1011 e IS 5322 foram clonados no vetor pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) e transformados em células competentes de *E. coli* JM109. A presença do inserto de tamanho correto nos clones foi verificada utilizando-se os iniciadores M13f e M13r. Os clones selecionados foram seqüenciados usando-se os iniciadores M13f e M13r em um seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As seqüências parciais do

gene *rpoB* obtidas foram comparadas às presentes no Genbank usando BLAST-N para identificar as seqüências de *rpoB* mais próximas existentes.

Análises estatísticas: Os dados dos perfis de DGGE foram plotados numa matriz de presença e ausência de bandas no gel através do programa Molecular Analyst software (version 1.61; Bio-Rad), utilizando UPGMA (“Unweighted pair group with mathematical averages”) e o coeficiente de DICE. A análise da biblioteca de clones foi feita pelo cálculo do índice de cobertura.

### Resultados e Discussão

Os resultados obtidos pela análise em gel de DGGE mostraram perfis que apresentavam uma clara diferença entre os cultivares porém não entre o tratamento com nitrogênio (Figura 1). Além disso, nenhuma correlação entre os dois cultivares eficientes e os dois ineficientes pode ser observada (Figura 1b), sugerindo que o tipo de cultivar é responsável pelas diferenças observadas nas populações de *Paenibacillus*. As sete bandas retiradas do gel (Figura 1a) foram identificadas com sendo relacionadas a *P. graminis* (banda A), *P. odorifer* (bandas B, C e D), *P. durus* (bandas E e F) e *P. campinasensis* (banda G).

Uma biblioteca de clones também foi construída com base nos fragmentos de *rpoB* gerados a partir das amostras de dois cultivares diferentes (IPA1011 e IS5322-C) crescidos com alta e baixa concentração de nitrogênio no solo. Foram obtidos 318 clones, e após a análise das seqüências, estas foram agrupadas em 14 espécies de *Paenibacillus*. Considerando somente o primeiro “hit” no BLAST-N feito com seqüências de *rpoB*, os clones obtidos mostraram-se próximos às espécies *P. graminis* (61%), *P. amylolyticus* (15%) e *P. macerans* (13%). As outras 11 espécies foram representadas por poucos clones nas bibliotecas (Tabela 1). A espécie *P. graminis* predominou em todas as bibliotecas, principalmente na do cultivar ineficiente IS5322-C plantado com baixo teor de nitrogênio. Uma maior diversidade de espécies de *Paenibacillus* foi observada no cultivar eficiente IPA1011 com baixo teor de nitrogênio. Seis espécies identificadas nas bibliotecas são consideradas espécies fixadoras de nitrogênio.

As análises estatísticas das seqüências mostraram que as quatro bibliotecas de clones obtidas neste estudo cobriram pelo menos 96.2% da diversidade total (Tabela 2). O PCA das bibliotecas mostrou que a diversidade bacteriana foi mais influenciada pelo cultivar do que pelo nível de nitrogênio aplicado (Figura 2), corroborando os dados obtidos no DGGE.

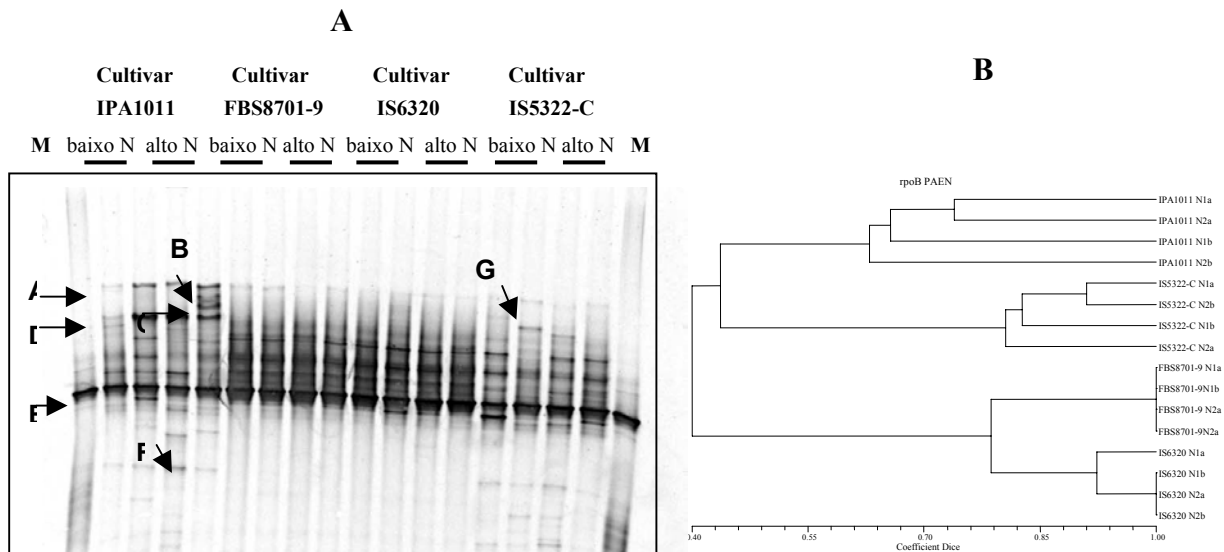
### Conclusão

Os resultados encontrados mostram a importância do cultivar na seleção de populações de *Paenibacillus*. Foi possível observarmos que o nível de nitrogênio utilizado como fertilizante parece não influenciar significativamente na distribuição de populações de *Paenibacillus*, sendo o tipo de cultivar o fator que mais influenciou a estrutura da comunidade de *Paenibacillus* presente no habitat estudado. Entretanto, mais estudos são necessários para se avaliar não somente a diversidade estrutural deste gênero, mas também a diversidade funcional.

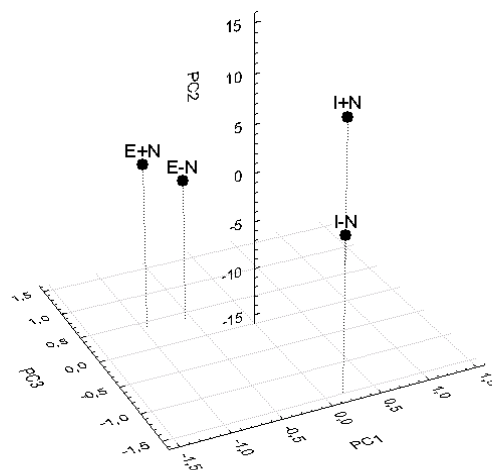
### Referências

- [1] Coelho, M.; von der Weid, I.; Zahner, V. & Seldin, L. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.* **222**, 243-250.

- [2] Rodriguez-Diaz, M.; Lebbe, L.; Rodelas, B.; Heyrman, J.; De Vos, P. & Logan, N. A. (2005) *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 2093-2099.
- [3] Seldin, L.; Rosado, A.; Cruz, D.; Nóbrega, A.; Van Elsas, J. & Paiva, E. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3860-3868.
- [4] Mavingui, P. & Heulin, T. (1994) *Soil. Biol. Biochem.* **26**, 801-803.
- [5] Rosado, A. & Seldin, L. (1993) *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 521– 528.
- [6] Bürgmann, H.; Meier, S.; Bunge, M.; Widmer, F. & Zeyer, J. (2005) *Environ. Microbiol.* **11**, 1711-1724.
- [7] Kanungo, P.; Kamakrishnan, B. & Rao, V. (1997) *Biol. Fertil. Soils.* **25**, 103-108.
- [8] Lovell, C.; Friez, M.; Longshore, J. & Bagwell, C. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5308-5314.
- [9] Mota, F.; Gomes, E.; Paiva, E.; Rosado, A. & Seldin, L. (2004) *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 34– 40.
- [10] Mota, F.; Gomes, E.; Paiva, E. & Seldin, L. (2005) *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 317-328.



**Figura 1:** (A) Perfis de DGGGE da comunidade de *Paenibacillus* das rizosferas dos cultivares IPA1011, FBS8701-9, IS6320 e IS5322-C plantados com baixos e altos teores de nitrogênio. Os traços representam as réplicas. As setas indicam as bandas que foram seqüenciadas. Um fragmento de *rpoB* de *Paenibacillus durus* P3L5<sup>1</sup> foi usado como marcador (M). (B) Dendrograma mostrando os níveis de similaridade da comunidade de *Paenibacillus* presente nos cultivares IPA1011, FBS8701-9, IS6320 e IS5322-C plantados com baixos e altos teores de nitrogênio. O dendrograma foi construído pelo método de UPGMA e pelo coeficiente de DICE. O numero 1 representa baixos teores de nitrogênio (12 Kg/ha) e o número 2 representa altos teores de nitrogênio (120 Kg/ha), letras a e b representam as réplicas.



**Figura 2:** Plot cultivares IPA pela Análise de Componente Principal (PCA).

biotecas dos  
(nio) testados

<b>Espécies de Paenibacillus</b>	<i>IPA1011</i> (E - N) <sup>a</sup>	<i>IPA1011</i> (E + N) <sup>b</sup>	<i>IS5322-C</i> (I - N) <sup>c</sup>	<i>IS5322-C</i> (I + N) <sup>d</sup>
<i>P. graminis</i>	30	41	65	59
<i>P. amylololyticus</i>	21	10	8	10
<i>P. macerans</i>	8	19	2	11
<i>P. thiaminolyticus</i>	5	0	0	0
<i>P. pabuli</i>	4	0	0	0
<i>P. durus</i>	3	6	1	0
<i>P. favisporus</i>	1	0	0	0
<i>P. dentritiformis</i>	2	0	0	0
<i>P. campinasensis</i>	1	4	0	0
<i>P. odorifer</i>	2	0	0	0
<i>P. curdlanolyticus</i>	1	1	0	0
<i>P. sanguinis</i>	0	1	0	0
<i>P. peoriae</i>	0	1	0	0
<i>P. polymyxa</i>	0	0	1	0
total	78	83	77	80

**Tabela 1:** Numero de clones identificados como sendo do gênero *Paenibacillus*, obtidos das quartros bibliotecas (cultivares IPA1011 e IS5322-C plantados em baixos e altos teores de nitrogênio).<sup>a</sup> (E - N) cultivar eficiente plantado em solo de Cerrado com baixos teores de nitrogênio (12 Kg/ha); <sup>b</sup> (E + N) cultivar eficiente plantado em solo de Cerrado com altos teores de nitrogênio (120 Kg/ha); <sup>c</sup> (I - N) cultivar ineficiente plantado em solo de Cerrado com baixos teores de nitrogênio; <sup>d</sup> (I + N) cultivar ineficiente plantado em solo de Cerrado com altos teores de nitrogênio

<b>Cultivares / fertilizante nitrogenado<sup>a</sup></b>	Shannon-Wiener <sup>b</sup>	Evenness <sup>c</sup>	Cobert <sup>d</sup>
<b>E+N</b>	1.437	0.691	0.964
<b>E-N</b>	1.764	0.735	0.962
<b>I+N</b>	0.757	0.689	1.000
<b>I-N</b>	0.586	0.364	0.974

**Tabela 2:** Análise estatística das bibliotecas de clones. <sup>a</sup> E (cultivar IPA 1011) + N = cultivar eficiente plantado em solo de Cerrado com baixos teores de nitrogênio (12 Kg/ha); E - N = cultivar eficiente plantado em solo de Cerrado com altos teores de nitrogênio (120 Kg/ha); I (cultivar IS 5322-C) + N = cultivar ineficiente plantado em solo de Cerrado com baixos teores de nitrogênio; I - N = cultivar ineficiente plantado em solo de Cerrado com altos teores de nitrogênio. <sup>b</sup> Índice de Shannon-Wiener <sup>c</sup> Evenness, <sup>d</sup> Índice de cobertura.