

# Monitoramento do Impacto de Genótipos de Sorgo Tolerantes e Sensíveis à Toxidez de Alumínio Sobre as Comunidades Microbianas da Rizosfera

Yasmin Souza Frade<sup>1</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>2</sup>, Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>2</sup>, Ubiraci G. de Paula Lana<sup>3</sup>, Claudia Teixeira Guimarães<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UNIFEMM, Sete Lagoas, MG.  
Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970.

<sup>3</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970.

\* Trabalho financiado pela FAPEMIG/EMBRAPA

## Introdução

A toxidez de alumínio é um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade agrícola em solos ácidos, que ocupam aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis do mundo (UEXKÜLL; MUTERT, 1995) e 68% do território brasileiro. O ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica desse metal e o sintoma mais visível do estresse é a inibição do crescimento do sistema radicular (RYAN et al., 1992). Assim, o volume de solo explorado pelas plantas sensíveis ao alumínio é reduzido, o que resulta em limitações na absorção de água e nutrientes, com consequente decréscimo na produtividade das culturas.

Dentre os mecanismos de tolerância ao Al, um grande número de evidências tem indicado que o principal é a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes. Ácidos dicarboxílicos com massa molecular reduzida são capazes de formar complexos estáveis com o Al<sup>3+</sup> presente na rizosfera, reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Adicionalmente, o sítio de exsudação de ácidos orgânicos localiza-se no ápice radicular, coincidindo com o sítio alvo da toxicidade do Al.

Em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), a tolerância ao Al parece ser controlada por um gene de efeito maior localizado na porção terminal do cromossomo 3, *Alt<sub>SB</sub>*. Recentemente, pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, em parceria com equipes internacionais, clonaram o gene *Alt<sub>SB</sub>* que foi isolado em sorgo pela técnica de clonagem posicional, auxiliada pela genômica comparativa. O gene *Alt<sub>SB</sub>* é um transportador de citrato ativado por alumínio, membro de uma família de *Multidrug and Toxic*

*Compound Extrusion* (família MATE), responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo (MAGALHÃES et al., 2007).

Como os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas podem atuar diretamente na comunidade microbiana do solo, modificando sua densidade, composição e atividade, esse efeito deve ser avaliado em detalhes, em genótipos que apresentem exsudação diferencial desses componentes. Isso ocorre porque os exsudatos podem agir como mensageiros que estimulam as interações entre as plantas e os microrganismos, além de servir como nutrientes para o metabolismo microbiano (MARSCHNER et al., 2006). Assim sendo, a composição e a atividade da microflora da rizosfera podem se alterar em função de mudanças nos padrões de exsudatos das raízes, conforme a idade e o genótipo das plantas.

Existem numerosos métodos para avaliar as comunidades microbianas do solo, incluindo cultivo e técnicas moleculares que independem do crescimento dos microrganismos. O método de BIOLOG que avalia a utilização de diferentes substratos, também conhecido como *fingerprinting* metabólico, é frequentemente usado e tem se mostrado eficiente na detecção de variações nas comunidades microbianas do solo.

O objetivo deste trabalho é avaliar, pela técnica de BIOLOG, o efeito da exsudação diferencial de ácidos orgânicos sobre a biodiversidade de microrganismos da rizosfera de genótipos convencionais de sorgo, contrastantes quanto à exsudação de ácidos orgânicos e tolerância ao alumínio.

## **Material e Métodos**

### **Experimento em casa de vegetação**

O experimento foi realizado sob condições controladas em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho-Escuro distrófico, coletado sob vegetação de cerrado na profundidade de 0-20 cm. O solo foi peneirado, homogeneizado e a fertilidade corrigida quantos aos níveis recomendados de N, P, K, S e micronutrientes, de acordo com a análise química inicial.

Para a máxima exsudação de ácidos orgânicos em sorgo, o índice de saturação de Al do solo deve ser próximo de 30%, pois a exsudação é induzida pela presença de Al. Portanto, o solo coletado, que apresentava inicialmente 26,7% de saturação de Al, foi considerado como de alta saturação de Al. Ele foi corrigido com  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgO}$ , resultando em um solo com moderada saturação (18,9%) e com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ ,

resultando em baixa saturação de alumínio (7,1%). As características químicas dos solos estão descritas na Tabela 1.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 12 tratamentos e três repetições, resultando em 36 parcelas. Foram utilizados três tipos de solo: alta (AS), moderada (MS) e baixa saturação de alumínio (BS) e quatro genótipos de sorgo (SC 566 e ATF 14 tolerantes ao alumínio e BR 007 e ATF 13 susceptíveis ao alumínio), cultivados em vasos de 5 kg. A semeadura foi realizada com cinco sementes de sorgo e o desbaste, efetuado aos 15 dias após a semeadura, deixando-se uma planta por vaso.

Durante o florescimento, as plantas foram coletadas com o sistema radicular inteiro e as raízes, lavadas para retirar o excesso de solo. Após a lavagem, 5 g das raízes mais finas e centrais de cada amostra, com solo rizosférico aderido, foram retiradas, adicionadas a 50 mL de pirofosfato de sódio 0,1% e agitadas por 30 min em homogeneizador horizontal. Centrifugaram-se 5 mL desta solução a 4.000 rpm por 15 min e procedeu-se à etapa de análise da diversidade biológica.

### **Diversidade metabólica**

Para determinação da diversidade funcional microbiana foram utilizadas placas denominadas como Ecoplates® (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) que apresentam três grupos iguais de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), cavidades controle sem substrato e violeta tetrazol como corante indicador do potencial redox. Em cada poço das placas de Biolog, foram inoculados 120 µL da solução do solo rizosférico em pirofosfato de sódio obtido na etapa anterior, e as placas foram incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. A leitura das placas, ou seja, o desenvolvimento de cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos, foi realizada por um espectrofotômetro leitor de placas (Labstems, MultSkán, MS, EUA) em 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A leitura de 72 horas foi utilizada para cálculos dos componentes da diversidade funcional por representar o tempo médio entre as leituras realizadas. Esses dados foram utilizados para se estimar a riqueza de substratos (S-atividade), o índice de diversidade de Shannon (H) e a distribuição dos indivíduos entre as espécies (E-equitabilidade) de acordo com Zak et al. (1994). O valor S refere-se ao número de diferentes substratos que podem ser utilizados pela comunidade microbiana, enquanto H compreende tanto a riqueza de substratos quanto a intensidade com que as fontes de C são utilizadas pela

microbiota do solo. Os resultados de S, H e E foram submetidos ao teste Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR.

## **Resultados e Discussão**

### **Atividade metabólica e índice de diversidade**

A análise das placas de Biolog mostrou que a atividade de utilização dos substratos medida pelo desenvolvimento de cor (expressa em AWCD) foi diferente ao longo do tempo de incubação para cada genótipo nos diferentes tratamentos de saturação de Al no solo (Figura 1). Na alta saturação de Al, o genótipo SC566 apresentou menor atividade metabólica em comparação com os demais genótipos, a partir de 24 h de incubação. Na média saturação, ATF 13 apresentou menor atividade a partir de 48 h, enquanto na baixa saturação, tanto BR007 e ATF 14 apresentaram menor atividade de utilização dos substratos que os demais durante o período de incubação das amostras (Figura 1). Esta mesma tendência foi observada quando a atividade microbiana foi avaliada após 72 h de incubação, que corresponde ao pico máximo de atividade dos microrganismos neste experimento (Tabela 2).

O genótipo SC 566 é tolerante ao alumínio e apresenta altas taxas de exsudação de ácidos orgânicos em solos ácidos (CANIATO et al., 2007). No entanto, esta característica não acarretou aumento na distribuição e diversidade das bactérias presentes na rizosfera deste genótipo, uma vez que este genótipo apresentou os menores valores de atividade de utilização de substratos (S) nestes solos. Além disso, entre os genótipos que apresentaram os menores índices para todas as variáveis avaliadas (atividade, equitabilidade e índice de Shannon – Tabela 2) existem tolerantes e susceptíveis ao alumínio cultivados em solos com alta, média ou baixa saturação de Al. Portanto, não foi observada correlação entre a tolerância/sensibilidade dos genótipos para toxidez de Al, teor de saturação de Al no solo e os índices avaliados. Segundo Marschner et al. (2006), a alta taxa de liberação de carbono orgânico pelas raízes favorece o aumento da densidade populacional de microrganismos na rizosfera, especialmente de bactérias, em relação ao restante do solo. Assim, seria esperado que os genótipos tolerantes ao Al apresentassem maior atividade microbiana, devido ao mecanismo de tolerância que é baseado na exsudação de ácidos orgânicos. No entanto, nos nossos resultados esse efeito não foi observado, uma vez que o genótipo SC566 sendo tolerante ao Al e conseqüentemente com maior potencial de exsudação deveria ter favorecido uma maior densidade de células de bactérias em situação de estresse de Al.

Por outro lado, a exsudação de ácidos orgânicos específicos pode favorecer o desenvolvimento de determinadas populações restringindo a diversidade. Essa hipótese teria que ser avaliada em outros estudos.

O índice de diversidade de Shannon (H) indica maior diversidade em amostras com maior variedade de utilização de diferentes fontes de carbono. A escala de H para as placas EcoPlate varia de 0 a 4 (ZAK et al., 1994). Na rizosfera dos genótipos estudados, as amostras coletadas apresentaram valores de H próximos de 3, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos (Tabela 2).

A avaliação da diversidade de bactérias (H) em condições de alta saturação de Al no solo também apresentou a mesma tendência que a avaliação do índice de atividade dos microrganismos, ou seja, o genótipo SC 566 apresentou a menor diversidade de bactérias em comparação com os demais genótipos (Tabela 2). Isto significa que as bactérias da rizosfera deste genótipo utilizaram menos substratos, demonstrado no índice de diversidade (H) e com menor intensidade de utilização, demonstrada pela avaliação da atividade relacionada ao desenvolvimento de cor. Portanto, não foi observada associação entre os valores de diversidade de Shannon entre genótipos e níveis de saturação de Al no solo. Resultados semelhantes foram observados para a Equitabilidade que avalia a distribuição dos indivíduos entre as espécies (Tabela 2). Possivelmente, o mecanismo de tolerância à toxidez de Al está baseado na exsudação de ácidos orgânicos específicos que podem estar selecionando populações de bactérias específicas, explicando assim a menor diversidade encontrada. Novos estudos são necessários para elucidar essa questão.

## **Conclusão**

- Não foi observada correlação entre o genótipos tolerantes e sensíveis à toxidez de Al, o teor de saturação de Al no solo e os índices metabólicos avaliados por Biolog.
- O genótipo SC566 tolerante ao Al apresentou menores índices de atividade metabólica e diversidade determinados por Biolog.

## **Referências**

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHÃES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, p. 863-876, 2007.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-solo-carbon-source-utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 394, p. 431, 1998.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poacea genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.

MOTA, F. F.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 805-814, 2008.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: **Molecular microbial ecology manual**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 244, p. 9-17, 2002.

RYAN, P. R.; SHAFF, J. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminium toxicity in roots: correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminium-sensitive and aluminium-tolerant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Washington, v. 99, p. 1193-1200, 1992.

UEXKÜLL, H. R. von; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMET, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. The Netherlands: Kluwer Academic, 1995. p. 5-19.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZAK, J. C.; WILLING, M. R.; MOOREHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

**Tabela 1.** Propriedades químicas de um Latossolo Vermelho-Escuro com alta, média e baixa saturação de Al.

SOLO	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem	
	H <sub>2</sub> O	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----								-----%-----		dag kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
Alta saturação	4,89	7,6	67	1,8	0,17	0,78	8	2,14	2,92	10,14	21,1	26,7	4,21	19	
Média saturação	5,37	113	203	1,82	0,19	0,59	8,7	2,53	3,12	11,23	22,5	18,9	4,35	23,6	
Baixa saturação	4,22	23,1	143	4,06	0,69	0,39	8,2	5,12	5,51	13,32	38,4	7,1	4,48	18,6	

pH em água - Relação 1:2,5

P - K - Extrator Mehlich 1

Ca -Mg -Al - Extrator: KCl - 1mol/L

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5mol/L - pH 7,0

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V= Índice de Saturação de Bases

m= Índice de Saturação de Alumínio

Mat. Org. (MO) = C.Org x 1,724 -Walkley-Black

P-rem= Fósforo Remanescente



**Tabela 2.** Atividade de utilização de substratos (S), diversidade metabólica (índice de Shannon, H) e equitabilidade (E) com base na utilização de fontes de C presentes nas microplacas Biolog EcoPlate™, após 72 horas de incubação a 28 °C, pelas comunidades bacterianas em um Latossolo Vermelho-Escuro com alta (AS), média (MS) e baixa saturação de Al (BS).

Sorgo / tipo de solo	S-Atividade	H-Shannon	E-Equitabilidade
BR 007 - BS	22,2a*	3,35a	0,976a
ATF 14 - BS	22,2a	3,36a	0,981a
ATF 13 - MS	23,9a	3,39b	0,988b
SC 566 - AS	26,8b	3,37a	0,982a
SC 566 - BS	26,8b	3,39b	0,988b
ATF 13 - BS	27,8b	3,41b	0,993b
ATF 14 - AS	28,8b	3,41b	0,994b
BR 007 - MS	29,0b	3,41b	0,994b
ATF 14 - MS	29,0b	3,41b	0,994b
SC 566 - MS	29,3b	3,40b	0,992b
ATF 13 - AS	29,4b	3,41b	0,993b
BR 007 - AS	31,9b	3,40b	0,993b

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Erro! Indicador não definido.

