



EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill)

MÍRIAN LOBO SÁBER¹; FERNANDO D. ANDREOTE²; ROSA T. S. FRIGHETTO³;
ITAMAR SOARES DE MELO⁴

¹ Doutoranda, ESALQ/USP, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, miriansaber@yahoo.com.br

² Pesquisador, ESALQ/USP, Piracicaba-SP, fdandreo@gmail.com

³ Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, rosa@cnpma.embrapa.br

⁴ Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, itamar@cnpma.embrapa.br

RESUMO: Este estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos da Radiação Ultravioleta B (UV-B) na diversidade da comunidade bacteriana epifítica de dois cultivares de soja (IAC 100 e BRS 262), crescidas sobre três diferentes tratamentos: UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Em geral, alguns parâmetros, tais como as etapas de desenvolvimento vegetal tiveram maiores efeitos na comunidade bacteriana que habitam a filosfera, onde a fase conhecida como R1 mostraram um maior número de bactérias cultiváveis. Análise independente de cultivo revelou que cultivares distintos e etapa de desenvolvimento da soja obtiveram maior relevância de acordo com os parâmetros deste estudo ao invés da radiação UV. Os resultados podem oferecer um melhor entendimento na relação entre micro-organismos e a soja. A resposta das comunidades epifíticas de acordo com o aumento da incidência de radiação ultravioleta B pode indicar uma baixa pressão de seleção exercida sobre esta comunidade em caso de mudanças climáticas.

PALAVRAS-CHAVE: mudanças climáticas, micro-organismos epifíticos, soja, radiação UV-B

INTRODUÇÃO

As plantas podem ser consideradas um micro ecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias. Neste aspecto, bactérias são habitantes comuns da superfície e do interior da maioria dos vegetais, podendo apresentar relações neutras e simbióticas com a planta hospedeira. As bactérias associadas às plantas são chamadas de epifíticas quando crescem e vivem sobre a superfície vegetal. A superfície das folhas das plantas, denominada filosfera, representa um nicho com grande significância agrícola e ambiental, visto que é considerado um ambiente hostil, exposto à rápida variação na temperatura e umidade relativa, nutrientes limitados e exposição à radiação ultravioleta (BEATTIE; LINDOW, 1999).

Os mecanismos envolvidos na interação bactérias-planta podem envolver diversos fatores bióticos e abióticos. Estes mecanismos necessitam de mais estudos para um melhor entendimento e posterior utilização de suas propriedades. Desta forma, estudos de ecologia microbiana que buscam aumentar e consolidar os conhecimentos a respeito dos processos interativos no ambiente podem auxiliar o entendimento deste processo, já que foi observado que estas bactérias podem conferir ao seu hospedeiro maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas e proteção contra organismos patogênicos (BAILEY et al., 2006).

Atualmente, a capacidade de bactérias associadas ao desenvolvimento e saúde da planta, seja por antagonismo a patógenos ou por proteção contra estresses, têm recebido especial atenção. Sabe-se que diversos fatores ambientais podem atuar sobre esta comunidade benéfica para a planta hospedeira, sendo, portanto, de grande importância o conhecimento destes fatores e suas implicações para a agricultura.

Um dos importantes fatores ambientais que podem atuar sobre a comunidade microbiana da filosfera é a radiação ultravioleta B (UV-B), que age diretamente no DNA, incitando a formação de lesões que resultam no bloqueio da replicação e transcrição podendo ser letal (LUCAS et al., 2006; JACOBS; SUNDIN, 2001).

As comunidades bacterianas em interação com as plantas respondem rapidamente a alterações do ambiente. Desta forma, podem ser usadas como indicadores de alterações ambientais, sendo estas comunidades as primeiras a serem afetadas. Assim, o possível desequilíbrio que o aumento da incidência de radiação pode acarretar refletirá na saúde e produtividade das plantas.

Em contraponto, os micro-organismos possuem mecanismos de reparo e de proteção para melhor sobrevivência, que incluem reparo de dano no DNA, produção de pigmentação e exopolissacarídeos (EPS) ou menor crescimento na copa das plantas e a colonização em sítios protegidos de UV, como locais sombreados (EHLING-SCHULZ; BILGER; SCHERER, 1997). A produção de EPS pode proteger as bactérias do estresse hídrico, grandes incidências de radiação e ajudar a ancorar as células na superfície foliar e, juntamente com a pigmentação, absorvem a radiação ultravioleta. Contudo, a alteração que a radiação ultravioleta B ocasiona na filosfera é diferenciada de planta para planta ou mesmo em partes diferentes da mesma planta. Portanto, para estudar a alteração da UV-B na filosfera da soja, há a necessidade do estudo não somente com métodos dependentes de cultivo, mas também com metodologias que analisam tais comunidades como um todo, onde se pode acessar a comunidade microbiana total deste habitat.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de dois cultivares de soja, por meio de técnica independente de cultivo, avaliar os efeitos dos tratamentos sobre os micro-organismos cultiváveis, bem como a resistência dos isolados sobre a radiação, além do potencial antagonico dos residentes bacterianos da filosfera da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O experimento de campo com soja foi desenvolvido na EMBRAPA Meio Ambiente em Jaguariúna, onde foram montados 9 canteiros com estruturas metálicas, com dimensão de 4, 5 X 2 m cada. Nos canteiros foram plantadas duas cultivares de soja, IAC 100 e BRS 262, sob três tratamentos: radiação solar (controle positivo); UV-B diminuído (controle negativo) e UV-B aumentado. O delineamento experimental utilizado foram blocos casualizados, com os tratamentos em triplicata.

No tratamento UV-B aumentado, a radiação UV-B foi acrescida 4h por dia, por 8 unidades de lâmpadas fluorescentes (EL UVB-313, Q-Lab, EUA), envolvido com uma película de acetato de celulose (Crystal) para filtrar uma parte do espectro de UV-C (280-290 nm), posicionado a aproximadamente 40 cm acima do topo da copa das plantas. O filme de acetato de celulose foi trocado a cada 5 dias. Para o tratamento UV-B diminuído, as parcelas foram cobertas por um filme de poliéster (Du Pont) de 0,152 mm, que absorve toda a radiação UV-B. A irradiância foi medida por um espectrômetro (USB2000 + RAD, Ocean Optics, EUA). Ao longo do desenvolvimento da soja, a altura da lâmpada e do filtro foi ajustada para aproximadamente 40 cm de altura da copa das plantas.

A coleta do material vegetal foi realizada em três fases de desenvolvimento, V3 (15 dias após a germinação), V6 (30 dias após a germinação) e R1 (60 dias após a germinação).

Durante todo o experimento a radiação solar UV-B foi monitorada de 2 a 3 vezes por semana usando um espectrômetro (USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA). O espectrômetro foi colocado aproximadamente na mesma altura do dossel, as leituras de UV solar foram integradas ao longo de 6 horas, produzindo uma saída quantitativa em kJ m^{-2} . A média das medições ao longo do experimento foi calculada e a quantidade de radiação UV-B solar recebida pelas plantas foi $6,82 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$.

As parcelas UV-B aumentado também foram monitoradas e as leituras foram integradas ao longo de 4 horas por dia, a média durante todo o experimento foi de $11,28 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$. Portanto, no tratamento UV-B aumentado houve um acréscimo médio de $4,46 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$ comparado com o tratamento UV solar (KADIVAR; STAPLETON, 2003; GUNASEKERA; PAUL; AYRES, 1997). O cálculo em $\text{kJ m}^{-2}/\text{dia}$ foi realizado de acordo com Quaite et al, 1992.

Isolamento de bactérias epifíticas de soja (cultivares IAC 100 e BRS 262)

Folhas dos cultivares de soja foram removidas e levadas em sacos plásticos estéreis para o laboratório, onde foram imediatamente processadas. Para o isolamento de bactérias epifíticas 10 discos de folhas de $1,76 \text{ cm}^2$ cada, foram colocados em frascos Erlenmeyer (500 ml) contendo 50 ml de tampão PBS. Estes frascos foram submetidos ao ultrassom por 30 seg. e mantidos sob agitação (100

rpm) a 25°C e por 2 h, sendo após este período preparadas diluições seriadas das suspensões celulares. Tais diluições foram semeadas em placas de cultivo contendo meio de cultura não seletivo TSA 10%. Estas placas foram incubadas a 25°C por 4-15 dias.

A população bacteriana por grama de tecido vegetal fresco (UFC/g TVF) foi estimada pela contagem de colônias cultivadas em meio TSA 10%. Colônias bacterianas foram repicadas das placas, purificadas e mantidas em TSA 10% suplementado com 20% de glicerol a -80°C (ARAÚJO, et al., 2002).

Extração de DNA genômico bacteriano

As linhagens foram cultivadas em 5 ml de TSB 10% por 24 horas a 25°C sob agitação de 150 rpm. Dois a 4 ml da cultura foram centrifugados por 5 minutos a 14000 g e as células ressuspensas em 500 µl de TE (10 mM de Tris-HCl; pH 8,0), centrifugadas e ressuspensas em 500 µl de TE com o acréscimo de 0,5 g de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 15 µl de SDS 20%. As células foram agitadas em um homogeneizador (*Mine-BeadbeaterTM*, *Biospec Products*) por 30 s a 350 bpm. Ao lisado celular foram adicionados 500 µl de fenol, homogeneizados por inversão e centrifugado por 5 min a 14000 g. A fase aquosa foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio, então, o DNA foi precipitado com 1/10 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol (3 min à temperatura ambiente) e coletado por centrifugação (10 min a 14000 g). O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspendido em 50 µl de água ultrapura esterilizada. O DNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com brometo de etídio (0,5 500 µg/ml).

Amplificação do gene 16S DNAr

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene 16S ribossomal (16S DNAr) em reação de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores R1387 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') e P027F (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'). As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 1 min a 62,5°C; 1 min a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultravioleta.

Teste de resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B

A sensibilidade a UVR foi avaliada através da determinação da dose mínima inibitória (MID) de radiação UV-B (pico em 310 nm), necessária para inibir o crescimento de células em placas de TSBA. As células foram preparadas em meio TSB a uma densidade de 10⁸ ufc/mL. As células foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e cerca de 10⁴ células foram plaqueadas (25 µL) em triplicatas em meio TSBA 10%.

As lâmpadas (EL UVB-313, Q-Lab, EUA) foram envolvidas por uma película de acetato de celulose (Crystal) para filtrar uma parte do espectro de UVC (280-290 nm), e a irradiância foi medida por um espectrômetro (USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA). De acordo com as condições utilizadas neste estudo, a energia de saída das lâmpadas eram aproximadamente 0,52 J m⁻² s⁻¹.

A lâmpada foi ligada 15 minutos antes do uso para permitir a estabilização da radiação. As placas com os isolados foram expostas por 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos, e foram casualizadas a cada 30 min. Após a dose de UV, as placas foram incubadas por 72 horas a 25°C no escuro, para minimizar a fotoreativação, onde se fez a contagem das UFC. A MID foi designada como a dose de UV que resultou em uma inibição do crescimento em comparação com as células crescidas nas placas não irradiadas e com o controle de sensibilidade *Echerichia coli* (KUHLMAN et. al, 2005).

Análise por meio da técnica de PCR-DGGE

Na técnica de PCR-DGGE, o DNA extraído diretamente da amostra ambiental foi utilizado para amplificação e posterior separação dos fragmentos gerados em gel com gradiente desnaturante.

Primeiramente uma reação de PCR específica foi realizada contendo 1 μL da amostra de DNA extraído em 35 ciclos de amplificação com os oligonucleotídeos seletivos para os grupos Bacteria e β -Proteobacteria. As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o oligonucleotídeo 1492R, para β -Proteobacteria foi utilizado o oligonucleotídeo Beta-2 (GOMES et al., 2001). Os iniciadores seletivos para *Pseudomonas* spp. (GARBEVA et al., 2004) foram utilizados conforme descrito pela literatura.

O produto de amplificação dos grupos acessados foi utilizado com o DNA molde na segunda reação de PCR para amplificação com os iniciadores para DGGE. Estas reações foram realizadas em volume de 50 μL contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 400 nM de cada oligonucleotídeo universal U968-GC e R1378 utilizando 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C.

A amplificação de *Pseudomonas* spp. foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores específicos U986-GC e R1459 utilizando 29 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C. O produto da PCR de todos os grupos foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão TAE 1x, com posterior coloração com brometo de etídio (1,0 mg/l^{-1}) e visualização sob luz ultra-violeta.

O DGGE foi realizado com equipamento phorU2 system (Ingeny, Goes, Holanda). O produto de amplificação da segunda reação foi aplicado em gel de poliácridamida (6,0% p/v) em tampão TAE 1x. Este gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 45% a 65% (onde 100% de desnaturação significam concentração de 7M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 16 h a 100 V à temperatura de 60°C e posteriormente foi corado com nitrato de prata e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação *in vitro* da resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B

Oito isolados foram selecionados de acordo com a produção de EPS, pigmentação e com o tratamento de campo para avaliar a resistência à radiação UV-B, com pico em 310 nm, como mostram as Figuras 1 e 2. Alguns isolados demonstraram resistência para produzir colônias em placas de TSA depois da exposição por 150 min (4720 J m^{-2}) de radiação UV-B, comparado com o controle *E. coli* que foi sensível já nos primeiros 30 min (940 J m^{-2}).

Os isolados produtores de EPS (EP 209 e EP 188) e os pigmentados (EP 10, EP 139, EP 242 e EP 96) sobreviveram à exposição a 4720 J m^{-2} , com porcentagem de sobrevivência de 85% (EP 209), 40% (EP 188), 43,9% (EP 10), 63% (EP 139), 80% (EP 242) e 27% (EP 96). De acordo com os dados, os isolados com pigmentação laranja e rosa, EP 242 e EP 139, respectivamente, são os que possuem maior resistência quando comparados aos que produzem pigmento amarelo, EP 96 e EP 10.

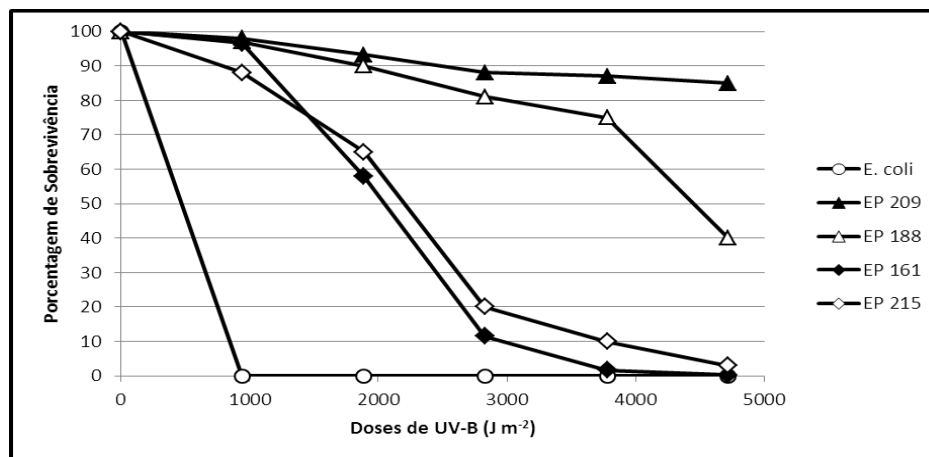


FIGURA.1 – Sobrevivência de isolados não pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 209 (▲) e EP 188 (△) são bons produtores de EPS. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento

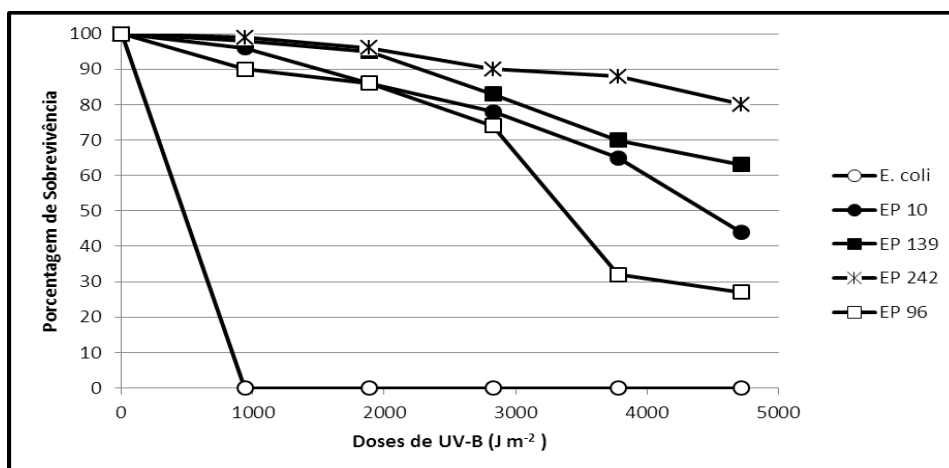


FIGURA. 2 - Sobrevivência de isolados pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 10 (●) e EP 96 (□) produzem pigmentos amarelos, EP 139 (■) produz pigmento rosa e EP 242 (x) produz pigmento laranja. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento

Análise de DGGE da comunidade bacteriana epifítica de soja

A análise de DGGE da comunidade bacteriana epifítica foi realizada em amostras de folhas dos cultivares IAC 100 e BRS 262, nos estádios de desenvolvimento vegetal V3, V6 e R1, além dos diferentes tratamentos em campo (UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído). Os perfis de DGGE obtidos foram convertidos e analisados por meio de metodologias multivariadas, correlacionando a ocorrência das bandas com as variáveis ambientais.

A análise de redundância (RDA) mostrou a interação da distribuição das espécies (banda nos perfis de DGGE) com os fatores ambientais determinantes (Fig. 3). A principal variável interferindo na composição da comunidade bacteriana epifítica de soja foi o estágio de desenvolvimento. Com valores de λ -1 o grupo Bacteria de 0,26 e 0,22; o grupo β -Proteobactéria 0,29 e 0,17 e o gênero *Pseudomonas* foram 0,12 e 0,20 para as análises das cultivares IAC 100 e BRS 262, respectivamente. Isto levou a separação das amostras no primeiro eixo de acordo com os estádios de desenvolvimento. Considerando a separação no segundo eixo, é possível observar a separação pelos tratamentos, porém sem significância estatística ($p > 0,05$), sendo tal variável apresentada com valores menores de λ -1, variando entre 0,02 e 0,06, para cada tratamento de irradiação avaliado.

Os resultados mostram que as diferenças nas estruturas das comunidades microbianas na filosfera estudadas estão correlacionadas com o estágio de desenvolvimento (tempo de cultivo) das plantas para grupos Bacteria e β -Proteobactéria, porém para o gênero *Pseudomonas*, teve um valor de correlação menor com esse atributo.

Em relação às comunidades bacterianas da filosfera de cada cultivar, é possível observar um comportamento análogo de acordo com fatores ambientais analisados, sendo as separações dos grupos analisados (Bacteria, β -Proteobactéria, e *Pseudomonas*) similares nos dois cultivares analisados.

As amostras de Bacteria foram plotadas de forma mais dispersa em relação ao estágio de desenvolvimento, porém mantendo a ordenação similar à plotada para a comunidade de β -Proteobactéria. Desta forma, a distribuição da estrutura das comunidades de Bacteria seguiu o mesmo padrão das comunidades de β -Proteobactéria. Diferentemente, as comunidades de *Pseudomonas* apresentaram um agrupamento mais distinto, formando um único grupo contendo as amostras, não sendo influenciado pelos fatores ambientais estudados

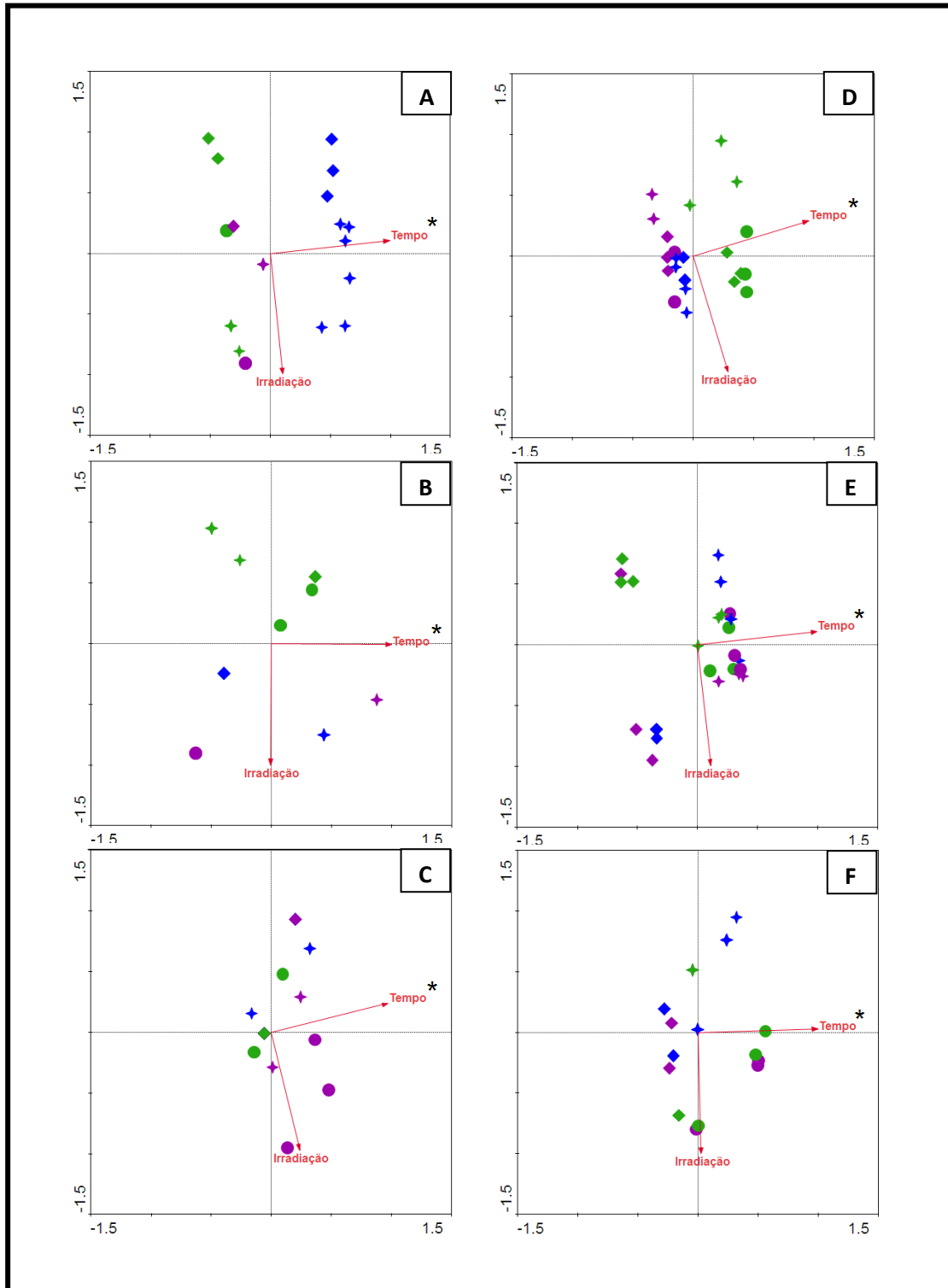


FIGURA. 3 – Análise de redundância (RDA) entre o perfil de bandas de DGGE, obtidos das amostras de folhas de soja dos cultivares IAC 100 (A, B e C) e BRS 262 (D, E e F), com oligonucleotídeos universais para Bacteria (A e D); específicos para β -Proteobacteria (B e E) e para o gênero *Pseudomonas* (C e F). O fator ambiental marcado com * foi significativo para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de permutação de Monte Carlo

CONCLUSÕES

A sobrevivência à radiação ultravioleta B (4720 J m^{-2}) dos isolados com capacidade de produção de EPS e produção de pigmentos, principalmente rosa e laranja, foi superior quando comparados ao controle (*Escherichia coli*). Desta forma, pode-se corroborar que a produção de pigmentos e exopolissacarídeos são importantes mecanismos de proteção no *habitat* filosfera.

Os tratamentos de campo (UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído) não alteraram significativamente a densidade total de bactérias cultiváveis. No entanto, houve diferença significativa nessa densidade de acordo com o estágio fenológico da soja, sendo maior na fase R1. Além disso, a porcentagem de isolados pigmentados foi superior à frequência de não pigmentados, porém não houve alteração significativa entre os tratamentos.

Neste estudo, a análise independente de cultivo mostrou que a diferença na estrutura das comunidades bacterianas da filosfera de soja, principalmente para os grupos Bacteria e β -Proteobacteria, está relacionada com o estágio de crescimento da planta e não sofre influência significativa dos diferentes tratamentos de campo. Já o grupo das *Pseudomonas* mostrou um baixo valor de correlação com esses atributos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA Meio Ambiente e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de isolamento de microorganismos endofíticos**. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002. 60 p.

BAILEY, M. J. et al. **Microbial ecology of aerial plants surface**. Centre for Ecology & Hidrology: Mansfield Road, Oxford, UK. 2006. 340 p.

BEATTIE G. S; LINDOW S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, 1999. Berkeley, v. 89, p. 353-359.

EHLING-SCHULZ, M.; BILGER, W.; SCHERER, S. UV-B – induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Bacteriology**, 1997. Germany, v. 179, n.6, p. 1940-1945.

GARBEVA P., VAN VEEN J. A., VAN ELSAS J. D. Microbial diversity in soil: selection of the microbial populations by plant and soil type and implementations for disease suppressivenss. **Annual Review Phytopathology**, 2004. Wageningen, v. 42 p. 243-270.

GOMES, N. C. M. et al. Bacterial diversity of the rizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, 2001. The Hague, v. 232, p. 167-180.

GUNASEKERA, T. S.; PAUL, N. D.; AYRES, P. G. Responses of phylloplane yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: interspecific differences in sensivity. **Mycology Research**, 1997. Lancaster, v. 101, n. 7, p. 779-785.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied Environmental Microbiology**, 2001. Texas, v. 67 p. 5488-5496.

KADIVAR, H.; STAPLETON, A. E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. **Microbial Ecology**, 2003. Chattanooga, v. 45 p. 353-361.

KUHLMAN K. R. et al. Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. **Icarus**, 2005. v. 74 p. 585-59.

LUCAS, R. et al. **Solar ultraviolet radiation global burden of disease from solar ultraviolet radiation**. Public Health and the Environment, Geneva. 2006. 250p.

QUAITE, F. E., SUTHERLAND, B.M; SUTHERLAND, J.C. Action spectrum for DNA damage in alfafa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, 1992. v.358, p. 576-578.