

# Diversidade Bacteriana Endofítica Associada a Raízes de Linhagens de Milho Sob Condições de Alto e Baixo Fósforo<sup>1</sup>

Carla Cristina e Avelar Oliveira<sup>2</sup>, Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>3</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig

<sup>3</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM

<sup>4</sup> Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

## Introdução

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais cultivados no mundo. O Brasil apresenta-se como o terceiro maior produtor mundial e a sua produção deve alcançar 79 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2015). O fósforo (P) é um importante nutriente na produção do milho. As plantas absorvem o P principalmente na forma de íon-ortofosfato  $H_2PO_4^-$  e  $HPO_4^{2-}$  (NAHAS, 1991) por meio de difusão, necessitando de contato direto com o elemento (PARENTONI et al., 2011) que pode se fixar às partículas do solo e ser de difícil disponibilização em níveis satisfatórios ao milho (NAHAS, 1991). A maior parte do solo nas regiões tropicais apresenta alta concentração de oxi-hidróxidos de ferro e alumínio, compostos que têm grande afinidade com o P e atuam como agentes quelantes, inclusive sobre o P aplicado na fertilização (ZONTA; LIMA, 2006). Sendo assim, todas essas dificuldades caracterizam o P como um fator limitante da produção.

As plantas desenvolveram mecanismos que aumentam a área de absorção dos nutrientes presentes no solo emitindo maior número de raízes, além de aumentar seu comprimento e as suas ramificações (MATOS et al., 2012) e ainda associando-se a microrganismos presentes no solo, que agem solubilizando o P por meio dos seus metabólitos, deixando parte disponível para ser absorvido pelo vegetal (BARROTI; NAHAS, 2000).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a comunidade de bactérias endofíticas presentes nas raízes de genótipos de milho contrastantes quanto a eficiência no uso de P.

## Material e Métodos

### Amostragem

Duas linhagens de milho, L3 eficiente e L22 ineficiente no uso de P e o cruzamento entre elas, foram cultivadas em solos com baixo ( $4 \text{ mg P.dm}^{-3}$ ) e alto nível de P ( $30 \text{ mg P.dm}^{-3}$ ) em um delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Na fase de florescimento, 60 dias após o plantio, amostras de raízes foram coletadas e lavadas em uma solução de 0,1% (m/v) de pirofosfato de sódio. O DNA foi extraído das raízes utilizando o kit DNAeasy (Qiagen, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

### Amplificação por PCR

Para a amplificação parcial da região 16S rDNA foram utilizados 5  $\mu\text{l}$  de DNA (1 ng/ $\mu\text{l}$ ), 28,8  $\mu\text{l}$  de água autoclavada, 5,0  $\mu\text{l}$  de tampão 10x (Invitrogen, EUA), 2,5  $\mu\text{l}$  de  $MgCl_2$  50 mM (Invitrogen, EUA), 1  $\mu\text{l}$  de primer 1401R (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de primer 968F\_GC (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  de dNTP's 2,5 mM, 2  $\mu\text{l}$  de DMSO 20% (v/v), 0,5  $\mu\text{l}$  de formamida HiDi, 0,2  $\mu\text{l}$  de Taq DNA Polimerase Recombinante 5U/ $\mu\text{l}$  (Invitrogen,

EUA). Além das 30 amostras de DNA, foi realizada também a PCR das amostras controle, utilizando água em substituição à amostra de DNA. As amostras foram submetidas a 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, finalizando com 72 °C por 5 minutos, seguido de 10 °C no equipamento Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). Após o término das reações foram retirados 10 µl de cada amostra e adicionados 4 µl de corante contendo o fluoróforo gel red diluído 100 X (Biotium, EUA). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,0% (m/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0) e submetidas a eletroforese a 100V. O gel foi fotografado no equipamento Transilluminator L.PIX Molecular Imaging – Locus biotecnologia, sob luz UV.

### **Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)**

A análise por DGGE foi realizada utilizando DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos das reações de PCR foram aplicados em géis de poliacrilamida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Os gradientes de desnaturação foram de 40-65% formados com 6% de solução estoque de acrilamida contendo entre 0 e 100% de desnaturantes (7 M ureia e 40% formamida deionizada). Os fragmentos foram separados por eletroforese a 70 V por 16 horas na temperatura constante de 60 °C. A seguir, os géis foram imersos em água deionizada por 5 minutos e então corados com solução de gel red (30 µl de gel red estoque, 2 ml de NaCl 5 M, 98 ml de água) sob agitação e coberto com papel alumínio por 20 minutos. O gel foi fotografado no equipamento Transilluminator L.PIX Molecular Imaging – Locus biotecnologia, sob luz UV.

Uma matriz de similaridade entre as amostras foi inferida a partir da imagem do gel de DGGE usando o programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) com o método Dice e uma tolerância de posição 1%. Posteriormente foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (unweighted pair group with mathematical average).

### **Resultados e Discussão**

A amplificação do rDNA 16S de bactérias endofíticas presentes na raiz das linhagens e do híbrido de milho com os primers 1401R e 968F\_GC resultou em fragmentos de aproximadamente 430 pares de base. Não houve amplificação de bandas nas amostras em branco (**Figura 1**).

O DGGE resultou em diferentes bandas, indicando grande diversidade de bactérias endofíticas presentes em ambos tratamentos das linhagens e do híbrido (**Figura 2**). Bandas exclusivas ocorreram nitidamente apenas nas linhagens L3 e L22 quando submetidas ao tratamento de baixo fósforo. Essas bandas podem indicar uma colonização preferencial nessas linhagens sob condição de baixo P. Essas bandas serão futuramente sequenciadas para identificação dos microrganismos.

A análise das imagens dos géis de DGGE permitiu a construção de dendrograma, conforme a **Figura 3**. Três grandes grupos foram observados. No grupo I foram observadas as linhagens L3 e L22 cultivadas em solos com baixa disponibilidade de fósforo.

No grupo II foram apresentadas a linhagem L3 e o cruzamento L3xL22 ambos sob alto P. Com isso, observamos que determinadas comunidades endofíticas, presentes

na linhagem L3 em condições de alto fósforo, também estão presentes nos cruzamentos L3 x L22, quando submetidos a este mesmo tratamento. Podemos sugerir que as comunidades de bactérias endofíticas que colonizam as raízes dos híbridos em alto fósforo são similares às da linhagem L3 quando submetida ao mesmo tratamento, que é conhecidamente eficiente na aquisição de P.

No terceiro grupo foram observadas as amostras da linhagem L22 sob alto P e a maioria das repetições do cruzamento L3xL22 sob baixo P. É importante observar que em condições de baixo P as linhagens L3 e L22 foram colonizadas por comunidades similares. Já quando o híbrido foi cultivado em condições de baixo P, foram encontradas comunidades endofíticas similares àquelas observadas na linhagem L22 em alto P.

## Conclusão

Os resultados demonstram que há influência do nível de P no solo e dos genótipos de milho na diversidade das comunidades bacterianas que colonizam as raízes.

## Referências

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2043-2050, out. 2000.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: quarto levantamento: janeiro/2015: monitoramento agrícola cultivos de verão - safra 2014/15. Brasília, 2015.

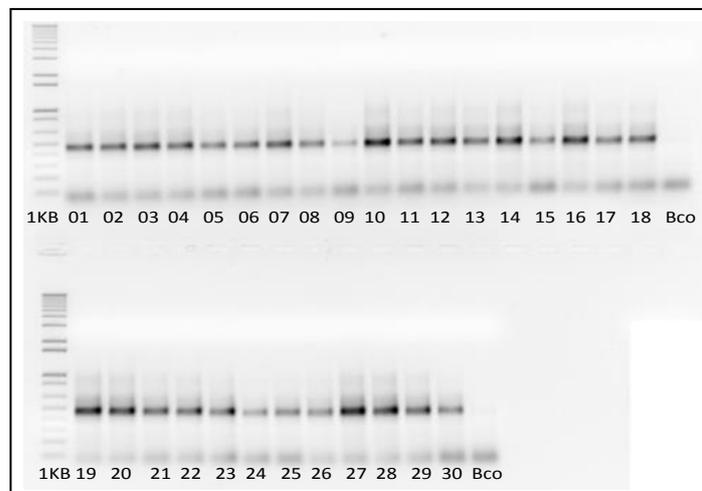
MATOS, F. M. de; MEIRELLES, W. F.; NEGRI, B. F.; MENDES, F. F.; GUIMARAES, L. J. M.; PARENTONI, S. N.; VIDIGAL FILHO, P. S.; SOUSA, S. M. de. Análise da diversidade do sistema radicular de linhagens e híbridos de milho cultivados em solução nutritiva em diferentes níveis de fósforo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Diversidade e inovações na era dos transgênicos**: resumos expandidos. Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. p. 3096-3101. 1 CD-ROM.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo**: transformações microbianas. Jaboticabal Unesp, 1991. 67 p.

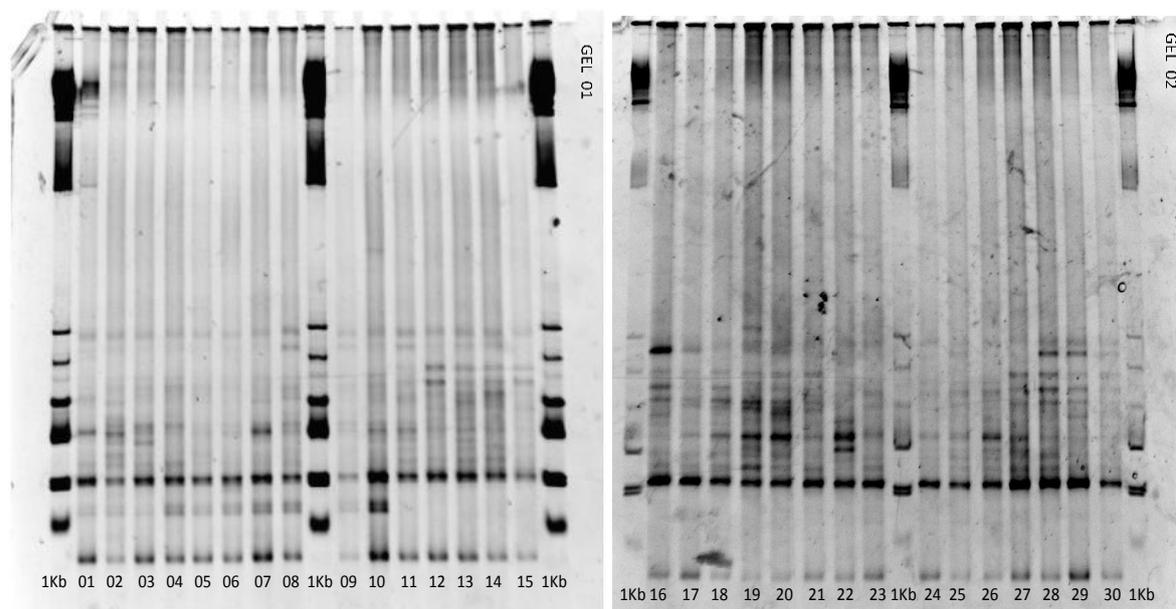
PARENTONI, S. N.; MENDES F. F.; GUIMARAES, L. J. M. Melhoramento para eficiência no uso de fósforo. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Org.). Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 101-126.

ZONTA, E.; LIMA, E. Tópico 4: Fertilidade e nutrição mineral de plantas. In: ZONTA, E.; CARVALHO, N. B.; ZOFFOLI, H. J. O.; FREITAS, F. C. Sistema solo-planta: um enfoque para as atividades de perfuração terrestre. Natal: [s.n], 2006. p. 1-43.

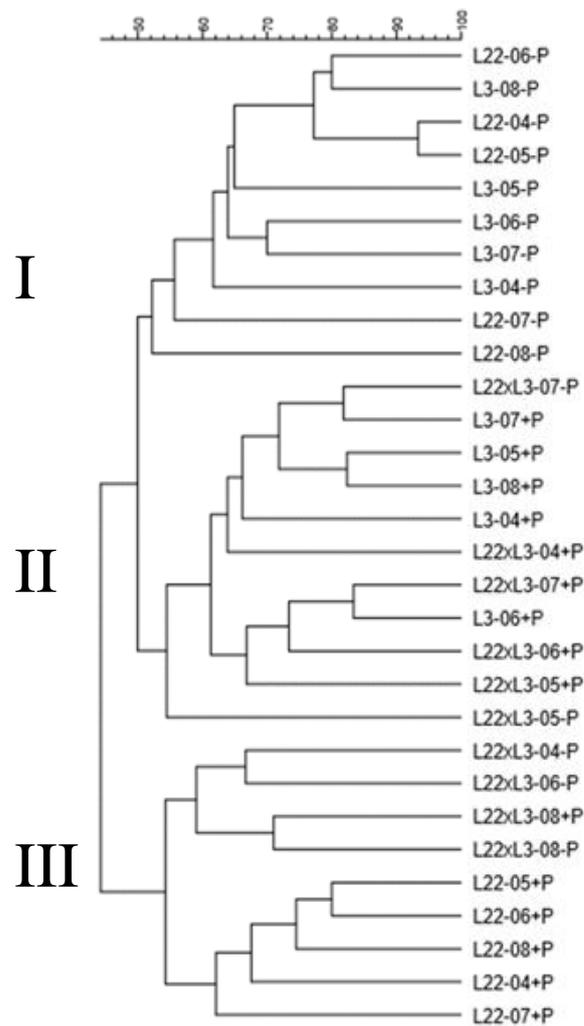
**Figuras:**  
011



**Figura 1.** Perfil de amplificação da região 16S rDNA de amostras de bactérias endofíticas colonizadoras da raiz das linhagens de milho. 01 a 05: repetições de L3 em baixo P, 06 a 10: repetições de L22 em baixo fósforo, 11 a 15: repetições de L3 em alto P, 16 a 20: repetições de L22 em alto P, 21 a 25: repetições do cruzamento L22xL3 em baixo P, 26 a 30: repetições do cruzamento L22xL3 em alto P. Bco: amostras em branco. 1Kb: marcador molecular 1 kb ladder (Invitrogen, EUA).



**Figura 2.** Gel de DGGE de fragmentos amplificados da região 16S rDNA de bactérias endofíticas das linhagens L3 e L22 e do cruzamento entre elas. A seta indica bandas exclusivas nas linhas L3 e L22 sob baixo P. Identificação das amostras conforme Figura 1.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade do perfil do 16S rDNA PCR-DGGE de amostras de bactérias endofíticas da raiz das linhagens de milho L3 e L22 e híbrido cultivados em alto e baixo P.