

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE PROTEOBACTERIAS E ACTINOBACTERIAS EM SOLOS CULTIVADOS COM MORANGO SOB DIFERENTES PRÁTICAS DE MANEJO

ANALYSIS OF PROTEOBACTERIA AND ACTINOBACTERIA DIVERISTY IN SOIL CULTIVATED WITH STRAWBERRY UNDER DIFFERENT MANAGEMENT PRACTICES

ANDREOTE, F.D.¹; TEIXEIRA, M.A.³; DIAS, A.C.F.^{1,2}; VIEIRA, R.F.¹

¹ Embrapa meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, SP

³ Universidade do Vale do Sapucaí, CP 13, CEP 37550-000, Pouso Alegre, MG

e-mail:fdandreo@gmail.com

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do cultivo orgânico certificado e do cultivo convencional do morangueiro na diversidade de Proteobacterias e Actinobacterias do solo por meio da utilização da técnica independente de cultivo de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE). Os solos destes dois sistemas de cultivo foram coletados em uma área produtora de morango nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm. As alterações nas comunidades bacterianas foram observadas para as Proteobacterias (Alfa e Beta), que se diferenciaram na análise dos perfis de DGGE por similaridade e análise de componentes principais (PCA). A comunidade de Actinobacterias mostrou-se resiliente, não sendo alterada devido à alteração da metodologia de cultivo. Desta maneira, pode-se propor que as bactérias mais diretamente ligadas às plantas e, responsivas a fatores que interferem diretamente na suplementação nutricional e proteção desta, respondem às alterações das condições de manejo, alterando sua composição e a estrutura da comunidade.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effects of the organic and traditional cultivation of strawberry plants in the diversity of Proteobacteria and Actinobacteria from soil by the application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Soils from these two cultivation systems were sampled in a strawberry producer area, in depths of 0-10 and 10-20 cm. Shifts in bacterial communities were observed for the Proteobacteria (Alpha and Beta), which were distinct in the DGGE analysis for similarity and principal components analysis (PCA). The Actinobacterial community revealed to be resilient, not altered by the change in cultivation traits. Considering the results obtained it is possible to suggest that bacteria more related to plants, and responsive to changes in its nutritional supplying and protection, also are responsive to the cultivation management, changing the composition and structure of the communities.

Introdução

Os problemas oriundos do uso excessivo de agrotóxicos têm levado diversos produtores a adotarem o sistema de produção orgânico no cultivo do morango. Vários estudos mostram que o sistema de cultivo orgânico aumenta a atividade microbiológica com conseqüente melhora na qualidade do solo, quando comparado ao sistema de cultivo convencional. No entanto, não é descrita na literatura as alterações em comunidades específicas de bactérias do solo, em áreas cultivadas com morango, em razão da aplicação dos métodos de cultivo orgânico. As aplicações das técnicas independentes de cultivo, como o DGGE, apresentam-se como ferramentas úteis para este estudo. O DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas. No início do desenvolvimento da técnica, as comparações entre comunidades bacterianas eram feitas utilizando *primers* para o domínio Bacteria (Heuer et al., 1997). No entanto, existem *primers* específicos para grupos bacterianos, que tem como vantagem a acessibilidade a determinados grupos, separadamente, permitindo uma melhor definição de perfis nas análises de comunidades bacterianas complexas e a avaliação da resposta de cada grupo aos fatores considerados no estudo.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do manejo orgânico e convencional do morangueiro na diversidade das comunidades de Alfa e Betaproteobactérias e de Actinobactérias do solo, por meio da utilização da técnica de DGGE.

Material e Métodos

Solos de duas áreas vizinhas com históricos de cultivo convencional e orgânico do morangueiro (variedade Oso Grande) foram amostrados em agosto de 2007 (Tabela 1). A área com sistema de manejo orgânico é certificada e não utiliza pesticida. Os dois locais situam-se na região de Pouso Alegre, ao sul de Minas Gerais. Três amostras, compostas de seis sub-amostras, foram obtidas, em cada local, nas profundidades de 0-10 cm e 10-20 cm. A partir de cada amostra, 0,5g de solo foi utilizado para extração do DNA, utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante do kit de extração *Ultra Clean Soil DNA kit* (MoBio, EUA). A alíquota de 1 µL (5 a 10 ng) destes DNAs foram utilizadas para a reação de PCR específica para os grupos bacterianos, seguindo os protocolos previamente descritos para Alfa e Betaproteobactérias (Gomes et al., 2001) e Actinobactérias (Heuer et al. 1997). O produto de amplificação desta primeira PCR foi utilizado (20 ng) como DNA molde para a segunda PCR, realizada de acordo com a metodologia descrita previamente (Heuer et al., 1997). O produto desta segunda PCR foi utilizado para a eletroforese em gradiente desnaturante de uréia e formamida. O DGGE foi realizado em gel de poliacrilamida 6%, de acordo com a metodologia descrita por Heuer et al. (1997), utilizando um gradiente desnaturante de 45 a 65%, onde 100% correspondem a 7M de uréia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos a eletroforese a 60°C por 16 horas a 100 V. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR Green I e fotografado em luz ultra-violeta.

Os perfis de DGGE obtidos foram analisados e comparados, sendo os perfis de bandas observados em cada amostra convertidos em uma matriz de presença e ausência, considerada como a ocorrência de grupos bacterianos nas amostras avaliadas. Esta matriz foi utilizada para análise de similaridade, realizada com o coeficiente de Jaccard, com auxílio do programa NTSys (Versão 2.2 for Windows) e para análise de componentes principais, realizada no programa Canoco 4.5 (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda).

Resultados e Discussão

A análise do perfil das comunidades bacterianas acessadas revelou a alta complexidade encontrada no ambiente solo, sendo estas comunidades compostas de uma grande diversidade de espécies, evidenciada pelo grande número de bandas observadas nos géis de DGGE (Figura 1).

No presente estudo, a análise dos perfis de DGGE, por meio da análise de similaridade ou de componentes principais, evidenciou os efeitos das práticas de cultivo orgânico sobre as comunidades de Alfa e Betaproteobactérias, enquanto que a comunidade de Actinobactérias não variou de maneira dependente das condições de cultivo das plantas de morango (Figura 2). Isto pode ser explicado pelo fato de as Proteobactérias serem mais responsivas às alterações nas condições ambientais, enquanto que as Actinobactérias apresentam maior independência destas condições, sendo típicas bactérias de solo, resistentes ao estresses e mudanças frequentes neste ambiente. Ainda assim, pode-se sugerir que a alta diversidade deste grupo, que apresentou uma menor definição nos perfis de DGGE, esteja ligada a falta de resposta à alteração nas condições de cultivo do morangueiro. Considerando esta hipótese, esta alta diversidade mascara as alterações específicas que podem ocorrer em sub-grupos, que ocorrem em menor densidade, dentro da comunidade de Actinobactérias.

Analisando as Proteobactérias (Alfa e Beta), tanto na separação por similaridade (Figura 2a, 2b e 2c), como na PCA (Figura 2d, 2e e 2f), foi possível diferenciar as amostras oriundas de cada um dos métodos de cultivo das plantas. Na análise de similaridade, a formação de ramos específicos para os tratamentos é observada, sendo esta separação mais clara para o grupo das Betaproteobactérias. Para o grupo das Alfaproteobactérias, a separação é também observada, porém uma repetição do tratamento convencional, se assemelha mais às amostras oriundas do tratamento orgânico (Figura 2a). No entanto, a PCA baseada nos perfis de bandas de DGGE, que apresenta maior sensibilidade para a separação das amostras, mostrou a separação clara dos dois tratamentos tanto para o grupo das Alfaproteobactérias como para as Betaproteobactérias. Da mesma maneira, esta análise confirmou a não distinção da comunidade de Actinobactérias encontrada em solo sob os diferentes tratamentos. A PCA evidencia estas observações devido à separação no primeiro eixo (x) das amostras mais

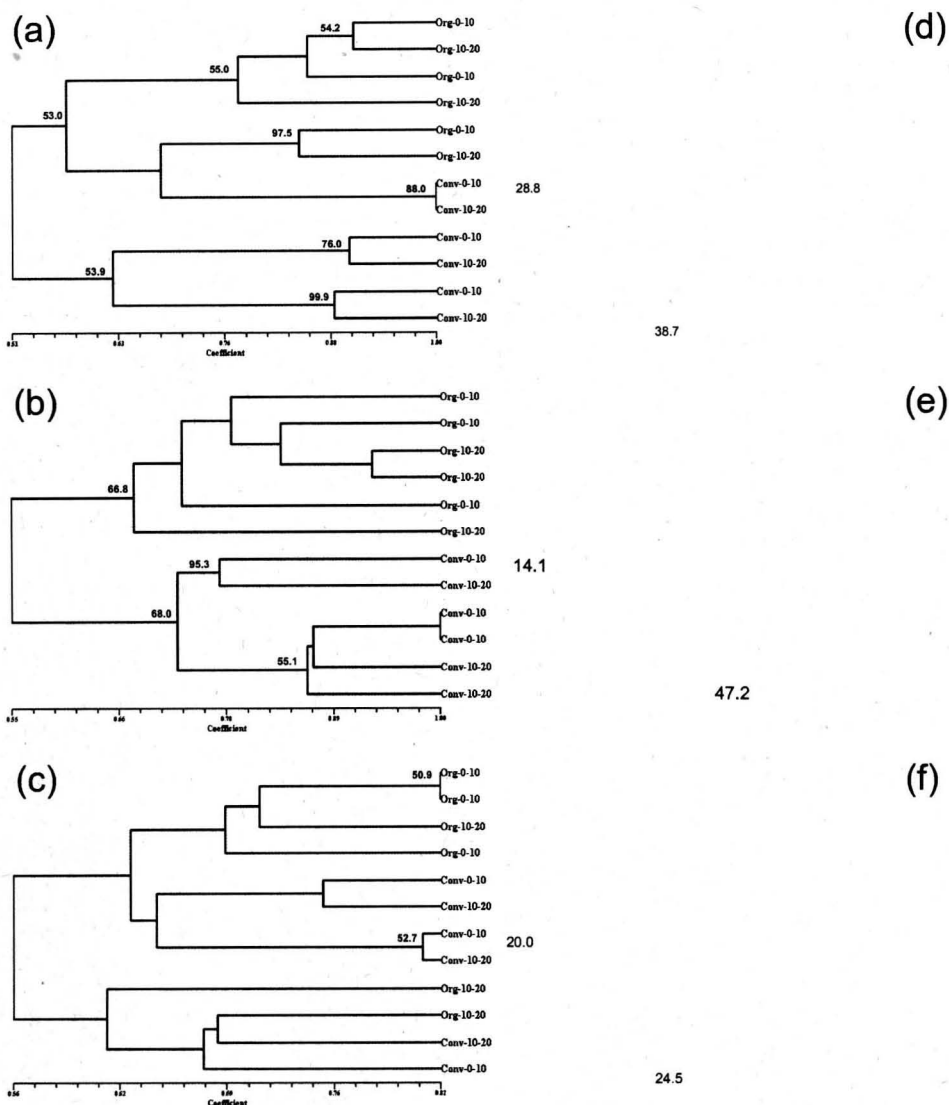


Figura 2. Análise dos perfis de DGGE com base no coeficiente de similaridade de Jaccard (a, b, c) e na análise de componentes principais (d, e, f). As análises foram feitas separadamente para as comunidades de Alphaproteobactérias (a, d), Betaproteobactérias (b, e) e Actinobactérias (c, f). A barra nas análises de similaridade indica o valor referente à semelhança entre as amostras e os valores nos eixos das PCAs indicam a porcentagem da variância dos dados explicada em cada eixo. Similarmente a figura 1, amostras indicadas com 'Conv' indicam cultivo convencional, amostras com 'Org' indicam cultivo orgânico. Da mesma maneira, amostras indicadas com '0-10' indicam amostragem de 0-10 cm no perfil do solo, e amostras indicadas com '10-20' indicam amostragem no perfil de 10-20cm do solo.

distintas, o que corresponde à separação das amostras dos diferentes tratamentos quando as Proteobactérias são consideradas. Não foi possível distinguir as comunidades bacterianas em relação às profundidades do solo.

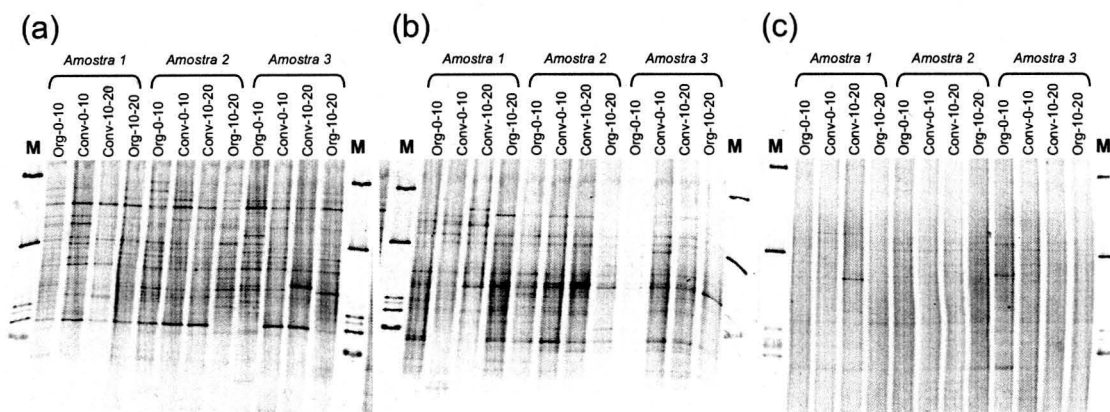


Figura 1. Perfis de DGGE para os grupos de Alfaproteobactérias (a), Betaproteobactérias (b) e Actinobactérias (c) encontrados em amostras de solo de área cultivadas com morangueiro sob diferentes tipos de manejo. Amostras indicadas com 'Conv' indicam cultivo convencional, amostras com 'Org' indicam cultivo orgânico. Da mesma maneira, amostras indicadas com '0-10' indicam amostragem de 0-10 cm no perfil do solo, e amostras indicadas com '10-20' indicam amostragem no perfil de 10-20cm do solo.

Os dados mostram que as Proteobactérias são responsivas a alteração do manejo das plantas do modo tradicional para o modo orgânico. Estas bactérias são relatadas em interação com as plantas por possuírem diversas características, como a colonização das plantas como endófitos, por fixarem nitrogênio (noduladoras ou não) (Raymond et al., 2004), ou ainda estarem presentes como agentes de biocontrole e indutoras de resistência sistêmica (Madhaiyan et al., 2004).

Conclusão

As comunidades de Alfaproteobactérias e Betaproteobactérias encontradas no solo são responsivas a alteração no manejo das plantas de morango, enquanto que a comunidade de Actinobactérias não é afetada por este tipo de alteração.

Referências

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167-180, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3233-3241, 1997.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.315-324, 2004.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.541-554, 2004.