

Anderson P. de B. Ferreira¹Márcio Voss²Henrique P. dos Santos²Helvécio De-Polli³Maria C. P. Neves³Norma G. Rumjanek³

Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito do sistema de manejo do solo (plantio direto e plantio convencional) e da rotação de culturas na diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes isoladas de rizoplano e no solo das entrelinhas de trigo, com base nas características morfológicas e genotípicas destas bactérias. Na análise morfológica, a maioria dos isolados obtidos de rizoplano apresentou características de *P. fluorescens*, enquanto naqueles obtidos de solo foram observadas características de *P. putida*. A análise de correspondência, realizada com os dados morfológicos, comprovou que os isolados de solo são mais semelhantes aos da mata que os de rizoplano. A população de *Pseudomonas* do rizoplano é muito homogênea e não sofreu efeito do sistema de manejo do solo nem da rotação de culturas. Por outro lado, a população do solo das entrelinhas formou dois grupos, um para o plantio direto e outro para o convencional. A análise por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) resultou em três grupos genotípicos, com predominância dos isolados obtidos de rizoplano, com características morfológicas de *P. fluorescens*. Esses dados indicam a existência de um processo de seleção da comunidade bacteriana, controlado pela planta, que apresenta em seu rizoplano uma prevalência *Pseudomonas* com características morfológicas de *P. fluorescens*.

Palavras-chave: análise multivariada, características morfológicas, marcador molecular

Fluorescent *Pseudomonas* diversity in different soil management and crop rotation systems

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effects of different soil management (no-tillage and conventional system) and crop rotation systems on the diversity of fluorescent *Pseudomonas* obtained from the rhizoplane and soil samples of wheat interlines, assessed by morphological and genotypic data. Morphological data analysis indicates that the majority of the isolates from the rhizoplane show characteristics of *P. fluorescens*, while the isolates from the soil have characteristics of *P. putida*. The correspondence analysis based on morphological data showed that the soil isolates are more similar to the ones of a forest area than the ones of the rhizoplane. *Pseudomonas* population from the rhizoplane is very homogeneous, without any effect of both management system and crop rotation. On the other hand, population from the interline soil samples formed two groups, one for the no-tillage system and another for the conventional system. ARDRA analysis showed three genotypic groups, dominated by the isolates obtained from the rhizoplane, with morphological characteristics of *P. fluorescens*. These data indicate a selection process on the bacterial community controlled by the plant, where the presence of fluorescent *Pseudomonas* with morphological characteristics of *P. fluorescens* in the wheat rhizoplane is prevalent.

Key words: molecular marker, morphological characteristics, multivariate analysis

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, Km 12, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO.

² Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS.

³ Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74.505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ.

INTRODUÇÃO

O modelo de exploração agrícola preconizado pela Revolução Verde, ainda hoje em uso, tem contribuído para grandes perdas de recursos naturais, como a fertilidade do solo, a capacidade de armazenamento de água e a biodiversidade. O uso de práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente, como o sistema de plantio direto (PD), proporciona melhoria em algumas propriedades do solo, resultando em maior sustentabilidade do agroecossistema (Malhi & Lemke, 2007).

Por mais que a agricultura moderna tenha avançado na utilização de técnicas e insumos variados, é importante não perder de vista que a melhoria da produtividade das culturas depende, também, da manutenção da qualidade do solo. Portanto, garantir a viabilidade da comunidade biótica do solo é essencial para garantir a manutenção da qualidade.

O uso de microrganismos em bioprodutos possibilita manter a qualidade do solo, mas exige a identificação e caracterização destes microrganismos. A partir da década de 90, o desenvolvimento de métodos moleculares possibilitou a identificação de um número cada vez maior de microrganismos (Widmer et al., 1998), o que tem contribuído para o avanço da caracterização da diversidade de microrganismos presentes no solo e em outros substratos (Silva et al., 2003; Jones & Thies, 2007; Miletto et al., 2007; Zhang et al., 2007), principalmente pelo uso de métodos baseados em extração direta de DNA do solo, que permitem reduzir erros relacionados ao acesso e à caracterização de microrganismos não-cultiváveis (Robe et al., 2003).

Entre os grupos de bactérias do solo, as espécies do gênero *Pseudomonas* destacam-se por sua grande versatilidade nutricional e pela habilidade de crescer em ampla variedade de ambientes e substratos. São reconhecidas como *Pseudomonas* (*stricto sensu*) apenas as espécies que se agrupam com *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* no grupo I de homologia DNA-rRNA (Palleroni et al., 1973) e na subclasse g das Proteobactérias (Woese, 1987), com pelo menos 30 espécies validadas.

Com base nas características fenotípicas, as espécies do gênero *Pseudomonas* do grupo I DNA-rRNA são divididas em dois grupos distintos, segundo suas propriedades de produzir pigmentos fluorescentes (pioverdinas) ou de acumular nas células inclusões de poli-a-hidroxibutirato (não-fluorescentes) (Kimura & Ribeiro, 1994). No entanto, muitas dúvidas ainda permanecem quanto à taxonomia desse gênero. Em estudos recentes, o rearranjo nomenclatural acarretou a criação de muitos novos agrupamentos gênicos a partir de espécies anteriormente classificadas como *Pseudomonas*, como os Gêneros *Comamonas* (Tamaoka et al., 1987), *Acidovorax* (Willems et al., 1990), *Brevundimonas* (Segers et al., 1994) e *Burkholderia* (Yabuuchi et al., 1992).

Embora algumas espécies de *Pseudomonas* apresentem fitopatogenicidade, muitos membros desse grupo, como as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, têm sido relacionados a efeitos benéficos observados em plantas (Ji et al., 2006), o que as caracteriza como promissoras rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) usam diferentes mecanismos para supressão de patógenos de plantas e promoção de crescimento vegetal, como a competição por nutrientes por meio da produção de sideróforos (Dobbelaere et al., 2003), antibiose (Jetiyanon & Kloepper, 2002), síntese de hormônios vegetais como: auxinas (Picard & Bosco, 2005), citocininas (Aslantas et al., 2007) e giberelinas (Probanza et al., 2002) e fornecem nutrientes às plantas, como o nitrogênio, pela fixação biológica de nitrogênio (Dobbelaere et al., 2003).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade morfológica e genotípica de *Pseudomonas* fluorescentes do solo e associadas ao rizoplane de trigo, cultivado sob plantio direto e convencional, em rotação de culturas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, em um Latossolo Vermelho Distrófico (areia grossa: 10 g kg⁻¹ de solo; areia fina: 230 g kg⁻¹ de solo; silte: 130 g kg⁻¹ de solo; argila: 630 g kg⁻¹ de solo; pH = 4,7; Al trocável = 24,7 mmol_c dm⁻³; Ca+Mg trocáveis = 74,0 mmol_c dm⁻³; matéria orgânica = 75 g kg⁻¹; P extraível = 14,0 mg kg⁻¹; e K trocável = 163 mg kg⁻¹). As coordenadas geográficas do campo experimental são: 28°12'56" S e 52°23'43" W e 684 metros de altitude. A área de estudo apresenta declividade de 3 a 5%, boa drenagem e ligeira erosão laminar. O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso, com parcelas subdivididas e três repetições, de modo que as parcelas principais representavam os sistemas de manejo de solo e as subparcelas, os sistemas de rotação de culturas para o trigo. Cada parcela principal media 90 m × 4 m (360 m²) e cada subparcela 10 m × 4 m (40 m²).

A área experimental é utilizada há 20 anos com os mesmos sistemas de manejo de solo e rotação de culturas. As rotações de culturas foram avaliadas em dois sistemas de manejo do solo: sistema de plantio direto (PD) e sistema de plantio convencional (PC). Como culturas principais de inverno e verão, utilizaram-se trigo (*Triticum aestivum* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill), respectivamente, e, como culturas secundárias, ervilha (*Vicia sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e aveia-branca (*Avena sativa* L.). Foram usados três sistemas de rotação: 1 - trigo/soja (T/S), 2 - trigo/soja/ervilhaca/milho (T/S/E/M); e 3 - trigo/soja/ervilhaca/milho/aveia branca/soja (T/S/E/M/AB/S), de modo que todas as possibilidades de rotação de culturas fossem executadas no período de amostragem.

Aos 90 dias após a emergência (DAE), foram coletadas raízes de trigo, em um total de 6 plantas por parcela, e amostras de solo, em seis pontos das entrelinhas de cultivo, na profundidade de 0-10 cm. Amostragem simultânea de solo foi feita em área de floresta secundária (mata) próxima do ensaio.

Foram pesados 10 g de solo, que foram colocados em *erlenmeyer* contendo 90 mL de solução de NaCl (0,85%). As raízes de trigo foram cortadas e lavadas em solução de NaCl (0,85%) e secas em papel-toalha autoclavado. Sequencialmente, 1,0 g foi colocado em *erlenmeyer* contendo 20mL de solu-

ção de NaCl (0,85%). As amostras de solo e raízes foram agitadas em agitador horizontal (30 minutos, 200 RPM) e uma alíquota de 100 mL foi transferida para microtubo contendo 900 mL de água destilada estéril (ADE) para diluição seriada até 10^{-9} .

As diluições de 10^{-3} a 10^{-9} das amostras do rizoplano e do solo foram inoculadas em placa de Petri contendo meio King B adicionado de antibióticos: ciclohexamina – 100 ppm, ampicilina – 50 ppm e clorafenicol - 12,5 ppm (King et al., 1954; Geels & Schippers, 1983), espalhadas sobre a superfície do meio de cultura com uma alça de Drigalski e incubadas (27°C; 48 horas). Após o aparecimento das colônias, aquelas que diferiam na aparência foram selecionadas e transferidas para uma nova placa contendo meio King B sem antibiótico e incubadas (27°C; 48 horas).

Após a incubação, os isolados foram caracterizados com base nas características morfológicas da colônia: tamanho (puntiforme, 1-2 e >2mm), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), cor (amarelo-forte, amarelo-esverdeada, amarela e creme), transparência (opaca ou translúcida), aparência (homogênea e heterogênea) e elevação (plana, elevada e muito elevada); do muco - quantidade (pouca, média e muita) e elasticidade (pouca, média e muita); e da massa celular - fluorescência, observação da presença e da intensidade de fluorescência, de modo que aqueles isolados que não apresentavam fluorescência eram descartados. Essas características morfológicas foram usadas para agrupar os isolados, originando inicialmente 70 grupos morfológicos (GM) que posteriormente foram reagrupados em 7 grandes grupos morfológicos (GGM).

Com base nas características morfológicas dos isolados agrupados nos 70 GM, foi realizada análise de correspondência pelo programa ADE-4 NetMul (Thioulouse et al., 1997).

A caracterização genotípica dos isolados foi realizada pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - ARDRA), usando como padrões quatro espécies-tipo de *Pseudomonas*: *P. putida*, estirpe PH6 (Fuhrmann & Wollum, 1989a,b), *P. fluorescens*, estirpe GN 1102 (Cattelan et al., 1999), *P. aeruginosa*, estirpe EF-5 (Zago et al., 2000) e *P. chlororaphis*, estirpe GN 2118 (Cattelan et al., 1999).

A extração de DNA dos microrganismos foi realizada de acordo com Ausubel et al. (1992). A reação de PCR do 16S rDNA foi realizada em um volume final de 50 mL, contendo 1 L do DNA molde, solução tampão (10 mM), $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM de cada), BSA (0,17 mg mL⁻¹), *Taq* DNA polimerase (0,7 U- Invitrogen) e os iniciadores Y1 e B3 (12,5 pMol de cada) (Young et al., 1991). A amplificação do DNA consistiu de um ciclo inicial (95°C; 2 minutos) seguido da técnica de “touchdown” PCR, na qual foi usada a temperatura inicial de anelamento (65°C), com diminuição de 1°C a cada ciclo até atingir 58°C. Foram realizados, então, 30 ciclos (95°C; 1 minuto desnaturação, 58°C; 45 s- anelamento, 72°C; 2 minutos - alongamento) e um ciclo final (72°C; 5 minutos).

A partir dos produtos de amplificação do 16S rDNA, foi feita a análise de ARDRA usando-se as endonucleases de restrição *Cfo* I e *Hinf* I (Laguerre et al., 1994). Os fragmentos da restrição foram submetidos a eletroforese (70 V; 3 h) em

gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo das *Pseudomonas* em meio King B permitiu a observação de colônias morfológicamente distintas e individualizadas, que foram transferidas para outras placas de Petri contendo meio King B, totalizando 391 isolados.

No sistema de manejo do solo, o número de isolados obtidos em plantio direto foi muito similar ao obtido em plantio convencional, 51% e 49%, respectivamente. Entretanto, quando considerado o compartimento, aproximadamente 67% das bactérias foram isoladas de rizoplano, enquanto 33% foram isoladas de solo das entrelinhas, o que comprova o efeito do rizoplano das plantas na seleção de microrganismos do solo. Segundo Yang & Crowley (2000), os exsudatos radiculares influenciam seletivamente no crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera, pois alteram as propriedades químicas do solo nas regiões próximas às raízes das plantas, tornando este substrato seletivo ao crescimento desses microrganismos. Esses efeitos são observados tanto entre plantas de diferentes espécies (Rajaniemi e Allison, 2008) quanto entre cultivares da mesma espécie (Ferreira et al., 2008).

A fluorescência foi avaliada quanto à intensidade sob luz ultravioleta e dividida em 3 níveis crescentes, N1, N2 e N3 (Figura 1). Além disso, foi observada a olho nu a ocorrência ou não de um halo de coloração esverdeada, no meio de cultura em volta da massa celular. Em todos os casos em que se

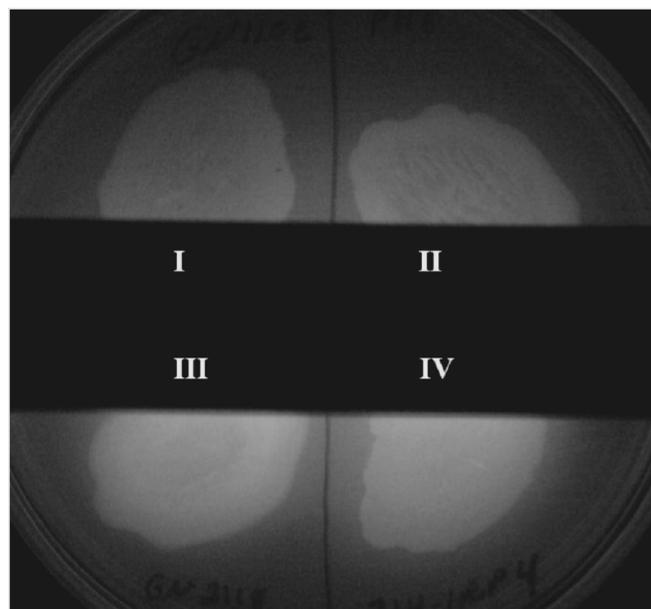


Figura 1. Níveis de fluorescência dos isolados de *Pseudomonas* sob luz UV. I- N1; II- N2; III- N3 e IV- N3. Os isolados III e IV apresentaram o mesmo nível de fluorescência sob luz UV, entretanto no isolado IV observou-se a olho nu a presença de halo esverdeado em volta da colônia

Figure 1. Fluorescence levels of *Pseudomonas* isolates under UV light. I- N1; II- N2; III- N3 and IV- N3. Isolates III and IV show the same fluorescence level, however, isolate IV shows at naked eye a green halo surrounding the colony

verificou a presença desse halo, as colônias apresentavam nível 3 de fluorescência.

As características morfológicas observadas com maior frequência foram: pouca elasticidade (48,3%), cor amarela (67,3%), tamanho da colônia >2 mm (50,9%), aparência da colônia translúcida (78%) e nível 2 de fluorescência (60,9%). Dos isolados de cor amarela, 34% apresentaram muco com pouca elasticidade, característica comum entre os isolados de cor amarelo-forte e amarelo-esverdeada. A maioria dos isolados de cor creme apresentou elasticidade média. Segundo Zago et al. (2000), bactérias com esse tipo de elasticidade pertencem à espécie *P. fluorescens*.

Nos isolados com tamanho de colônia inferior a 2 mm, foi comum a característica de pouca elasticidade, enquanto naqueles com colônias maiores que 2 mm o muco apresentou elasticidade (Figura 2A) e fluorescência médias (Figura 2B).

O número de bactérias com pouca elasticidade do muco foi praticamente o mesmo nas colônias com tamanho >2 e de 1-2 mm (79 e 89 isolados, respectivamente). Entretanto, quando o tamanho da colônia foi puntiforme, o número de isolados com pouca elasticidade do muco diminuiu para 21 isola-

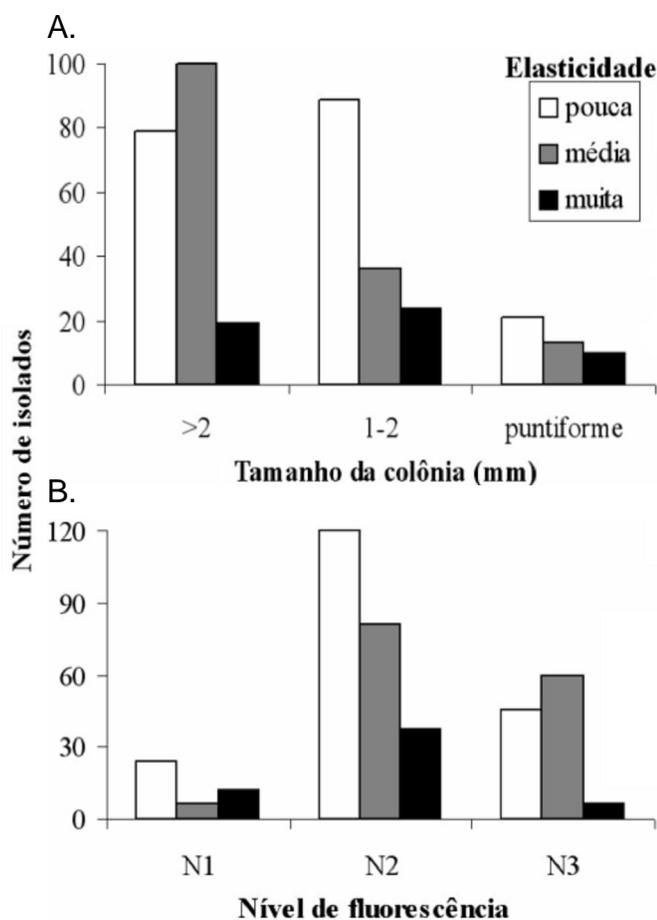


Figura 2. Distribuição dos isolados fluorescentes de *Pseudomonas* de acordo com (A) tamanho das colônias e elasticidade do muco e (B) nível de fluorescência e elasticidade do muco.

Figure 2. Distribution of fluorescent isolates of *Pseudomonas* according to (A) colony size and mucous elasticity and (B) fluorescence level and mucous elasticity.

dos. No grupo das bactérias com muco de elasticidade média, do total de 149 isolados, 100 formaram colônias com tamanho >2 mm. O número de isolados com muita elasticidade não variou muito entre os tamanhos de colônia. Portanto, quando as colônias isoladas apresentam tamanhos de 1-2 mm e puntiforme, predominam bactérias com pouca elasticidade, mas, quando o tamanho das colônias é >2 mm, bactérias produzindo muco com elasticidade média aparecem em maior número (Figura 2A).

Apesar do baixo número de isolados com cor de colônia amarelo-forte e (n=7 isolados), nenhum destes isolados apresentou nível de fluorescência N3 (Figura 3A). Os isolados que apresentaram cor da colônia amarelo-esverdeada distribuíram-se nos três níveis de fluorescência, enquanto que predominaram os isolados com nível de fluorescência N2, nas cores amarelo e creme (Figura 3A).

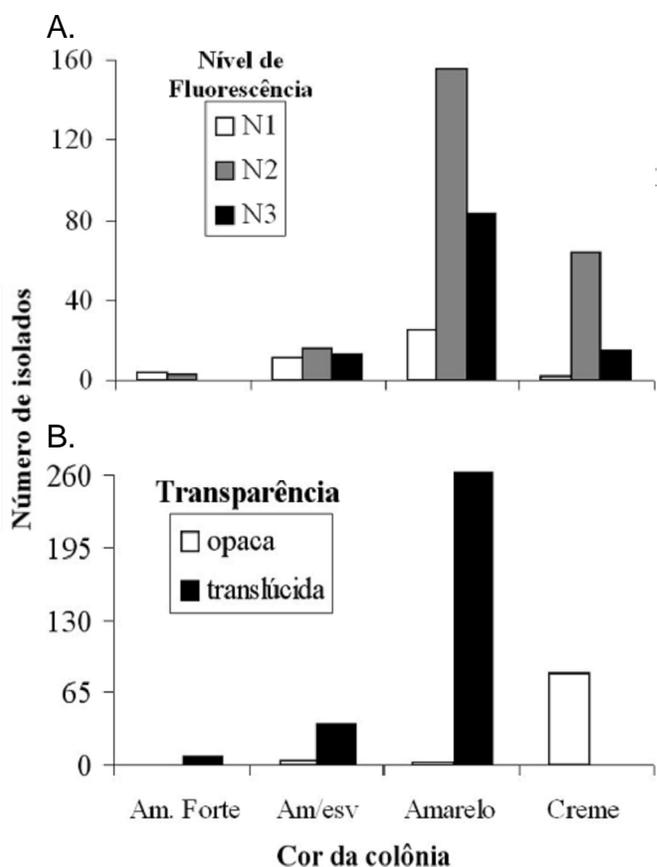


Figura 3. Distribuição dos isolados fluorescentes de *Pseudomonas* de acordo com (A) cor das colônias e nível de fluorescência e (B) cor das colônias e transparência.

Figure 3. Distribution of fluorescent isolates of *Pseudomonas* according to (A) colony color and fluorescence level and (B) colony color and transparency

As colônias com aspecto translúcido predominaram em todas as cores de colônia relacionadas, exceto a cor creme, uma vez que todos os isolados dessa cor apresentaram aspecto opaco e formaram um grupo característico (Figura 3B). Além disso, dos 305 isolados com colônia de aparência translúcida, 86% se agruparam na cor de colônia amarela, enquanto

94% dos isolados com colônia de aparência opaca apresentaram cor creme.

As bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* são muito diversas e as tentativas de caracterização dos isolados por meio de características morfológicas das colônias nem sempre apresentam bons resultados. Zago et al. (2000), no entanto, demonstraram que a elasticidade do muco produzido pelos isolados fluorescentes é uma característica capaz de discriminar, entre as espécies de *P. putida* e *P. fluorescens*, quais as bactérias caracterizadas pelo sistema API 20 NE, como *P. putida*, apresentam pouca elasticidade do muco, ou como *P. fluorescens*, que apresentam média ou muita elasticidade. Além disso, esses autores relacionaram a cor amarela como predominante para *P. fluorescens*, creme para *P. putida* e amarelo forte para *P. aeruginosa*, identificadas como pelo método API 20 NE.

Na coleção obtida, 77% dos isolados apresentaram cor amarelo-típica ou amarelo-esverdeada. O restante dos isolados apresentaram colônia com cor amarelo-forte (7 isolados) ou creme (81 isolados).

Os dados relacionados a cor, tamanho, transparência, elasticidade e nível de fluorescência foram utilizados no agrupamento dos isolados, resultando em 70 grupos morfológicos (GM). Os 15 grupos morfológicos mais abundantes englobaram 53,7% dos isolados e, em um dos grupos, 24 isolados apresentaram elasticidade média e colônias de cor amarela, características morfológicas de *P. fluorescens*, de acordo com Zago et al. (2000). Em seguida, os 70 grupos morfológicos (GM) foram reagrupados em 7 grandes grupos morfológicos (GGM) (Tabela 1).

Aproximadamente 52% dos isolados foram agrupados nos grandes grupos morfológicos I, II, III e IV, enquanto 48% distribuíram-se nos grandes grupos morfológicos V, VI e VII. Os isolados pertencentes aos grandes grupos morfológicos I, II, III e IV apresentaram média e muita elasticidade do muco e das colônias, em sua maioria, de cor amarela. Os grandes grupos morfológicos V, VI e VII, no entanto, apresentaram muco com pouca elasticidade e cor de colônia amarela ou creme (Tabela 1). Segundo Zago et al. (2000), as características dos isolados pertencentes aos quatro primeiros grandes grupos morfológicos correspondem às características morfológicas de *P. fluorescens*, enquanto os isolados agrupados nos GGM V, VI e VII apresentam características morfológicas de *P. putida*.

Aproximadamente 60% desses isolados oriundos dos rizoplanos se agruparam nos grupos morfológicos I, II, III e IV, ou seja, apresentaram características morfológicas de *P. fluorescens*. Por outro lado, cerca de 65% dos isolados oriundos do solo das entrelinhas se agruparam nos grupos V, VI e VII, com características morfológicas de *P. putida* (Figura 4A). Embora a literatura relate o efeito do tipo de manejo do solo sobre a microbiota (Lupwayi et al., 2007), não foi possível observar diferenças entre plantio direto e plantio convencional nos GGM (Figura 4B).

A análise de correspondência realizada com os dados da caracterização morfológica comprovou separação bem definida entre as comunidades bacterianas oriundas do rizoplano, do solo das entrelinhas e de uma área de mata (Figura 5).

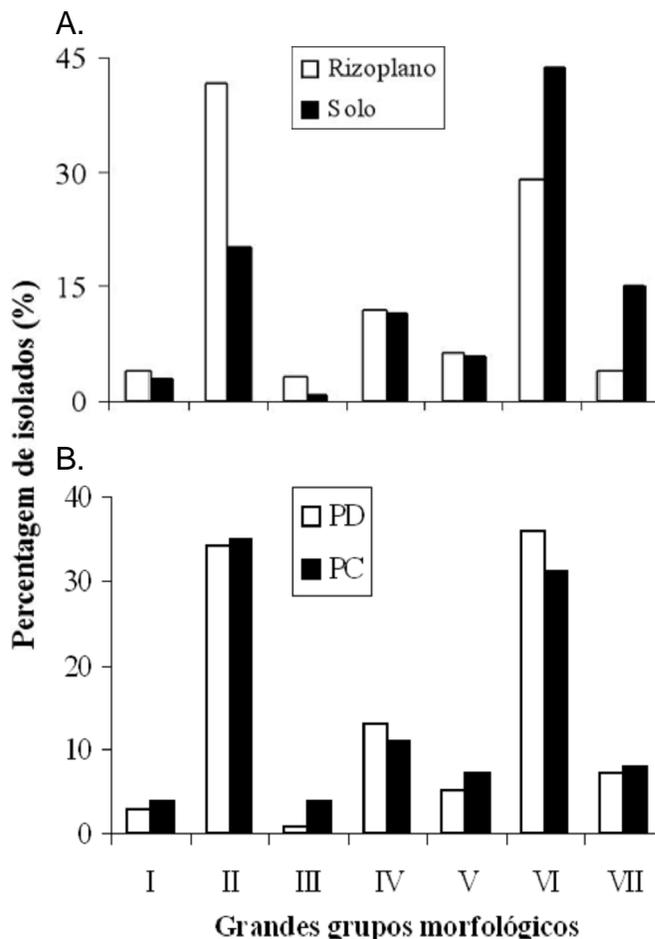


Figura 4: Percentual de isolados fluorescentes de *Pseudomonas* obtidos de (A) rizoplano (n=252) e solo das entrelinhas (n=139) e (B) de plantio direto - PD (n=192) e plantio convencional - PC (n=187), em cada grande grupo morfológico

Figure 4. Percentage of fluorescent isolates of *Pseudomonas* obtained from (A) Rhizoplane (n=252) and interline soil (n=139) and (B) from no-tillage - PD (n=192) and conventional tillage - PC (n=187) in each great morphological group

O primeiro fator, que explica 16% da variância (eixo de X), separou as bactérias isoladas de solo das entrelinhas e solo de mata daquelas isoladas de rizoplano. O segundo fator (eixo de Y) explica 13% da variância e mostra separação entre as amostras de solo coletadas nas entrelinhas de trigo sob plantio direto e plantio convencional, além de enfatizar a distância entre as amostras dos sistemas de manejo e de rotação de culturas para a mata (Figura 5).

Os isolados de *Pseudomonas* sp. das amostras de solo das entrelinhas sob sistema de plantio direto agruparam-se mais próximos das amostras coletadas na área de mata que as amostras obtidas do plantio convencional, sugerindo que no plantio direto a comunidade microbiana sofre um impacto menor que no plantio convencional, mantendo-se, portanto, similar à comunidade encontrada na mata. O material isolado de rizoplano formou um único grupo, independentemente do tipo de manejo ou rotação utilizado, comprovando que a interação entre a planta e a comunidade bacteriana associada ao seu sistema radicular é muito estável e não é afetada por

Tabela 1. Características morfológicas e percentuais de cada característica usada para a formação dos grandes grupos morfológicos (GGM)**Table 1.** Morphological characteristics and percentage of each characteristic used in the great morphological groups (GGM) assembling

GGM	Características morfológicas					
	EM	Cor	Presença de halo	NF	Tamanho (mm)	Transparência
I	Média	7% a.forte 93% a.esv	86% não 14% sim	26% N1 26% N2 48% N3	53% >2 33% 1-2 14% punt	100% translúcida
II	Média	72% amarela 28% creme	79% não 21% sim	2% N1 58% N2 40% N3	70% >2 22% 1-2 8% punt	72% translúcida 28% opaca
III	Muita	22% a.forte 78% a.esv.	100% não	44% N1 56% N2 0% N3	67% >2 22% 1-2 11% punt	100% translúcida
IV	Muita	71% amarela 29% creme	96% não 4% sim	17% N1 70% N2 13% N3	30% >2 50% 1-2 20% punt	72% translúcida 28% opaca
V	Pouca	18% a.forte 82% a.esv.	75% não 25% sim	33% N1 42% N2 25% N3	58% >2 29% 1-2 13% punt	87% translúcida 13% opaca
VI	Pouca	amarela	91% não 9% sim	11% N1 66% N2 23% N3	36% >2 53% 1-2 11% punt	99% translúcida 1% opaca
VII	pouca	creme	100% não	6% N1 68% N2 26% N3	55% >2 35% 1-2 10% punt	100% opaca

GGM - grande grupo morfológico; EM - elasticidade do muco; NF - nível de fluorescência; NI - número de isolados; a. forte - amarelo-forte; am/esv - amarelo-esverdeada; punt - puntiforme

fatores externos, como o tipo de manejo do solo e a rotação de culturas. Neste caso, na zona de quimiotaxia, a liberação

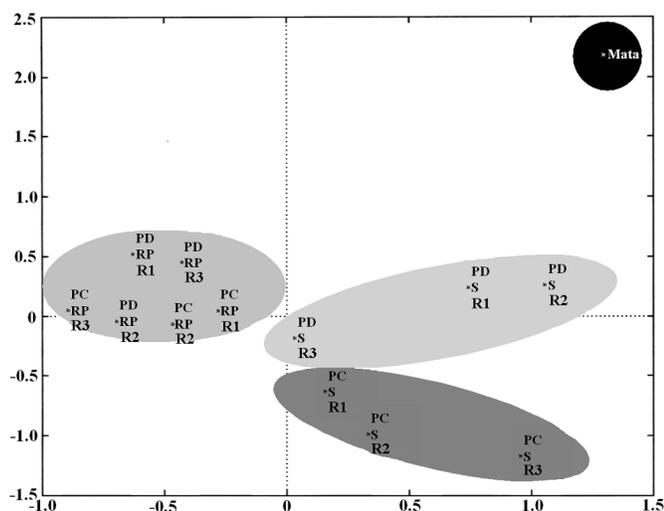


Figura 5. Análise de correspondência realizada com base nas características morfológicas dos isolados fluorescentes de *Pseudomonas* sob plantio direto (PD) e convencional (PC), isolados de rizoplane (RP) e de solo das entrelinhas (S), nas rotações de culturas trigo/soja (R1), trigo/soja/ervilhaca/milho (R2) e trigo/soja/ervilhaca/milho/aveia branca/soja (R3) e de solo de floresta secundária (mata)

Figure 5. Correspondence analysis performed according to the morphological characteristics of the fluorescent isolates of *Pseudomonas* under no-tillage (PD) and conventional system (PC), obtained from rhizoplane (RP) and interline soil (S) with the crop rotations of wheat/soybean (R1), wheat/soybean/vetch/maize (R2) and wheat/soybean/vetch/maize/oats/soybean (R3) and of a secondary forest soil

de exsudatos radiculares e outros compostos resultantes da atividade microbiana, parecem ser os fatores determinantes da estrutura desta comunidade.

A partir dos isolados agrupados nos GGM, foram selecionados aleatoriamente cerca de 10% do total de isolados de cada grupo para a caracterização genotípica, com exceção do GGM III, representado por apenas nove isolados, pois nenhum deles voltou a crescer no meio de cultivo. A amplificação do gene 16S rRNA dos isolados representativos dos grupos morfológicos e das espécies-tipo resultou em um produto com cerca de 1,5 Kb (Figura 6A). Os produtos de PCR gerados pelos *primers* Y1 e B3 foram digeridos com as enzimas de

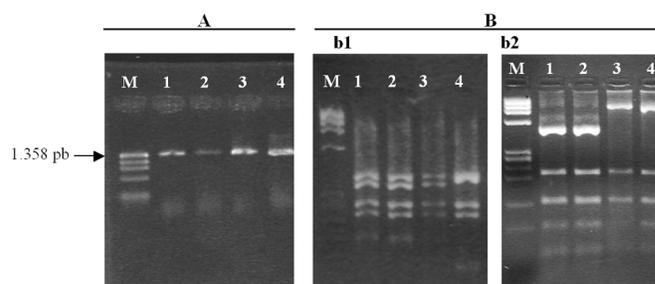


Figura 6. (A) Gel de agarose 1% dos produtos de amplificação do 16S rDNA das espécies-tipo. (B) Gel de agarose 3% dos fragmentos de restrição do 16S rDNA das espécies-tipo com as endonucleases de restrição *Cfo* I (b1) e *Hinf* I (b2). M- marcador ϕ -X174-RF DNA, *Hae* III Digest; 1- *P. putida*; 2- *P. fluorescens*; 3- *P. aeruginosa* e 4- *P. chlororaphis*.

Figure 6. (A) 1% agarose gel of the amplified 16S rDNA of the type-species. (B) 3% agarose gel of the 16S rDNA restriction fragments of the type-species using the restriction endonucleases *Cfo* I (b1) and *Hinf* I (b2). M- DNA marker ϕ -X174-RF DNA, *Hae* III Digest; 1- *P. putida*; 2- *P. fluorescens*; 3- *P. aeruginosa* e 4- *P. chlororaphis*

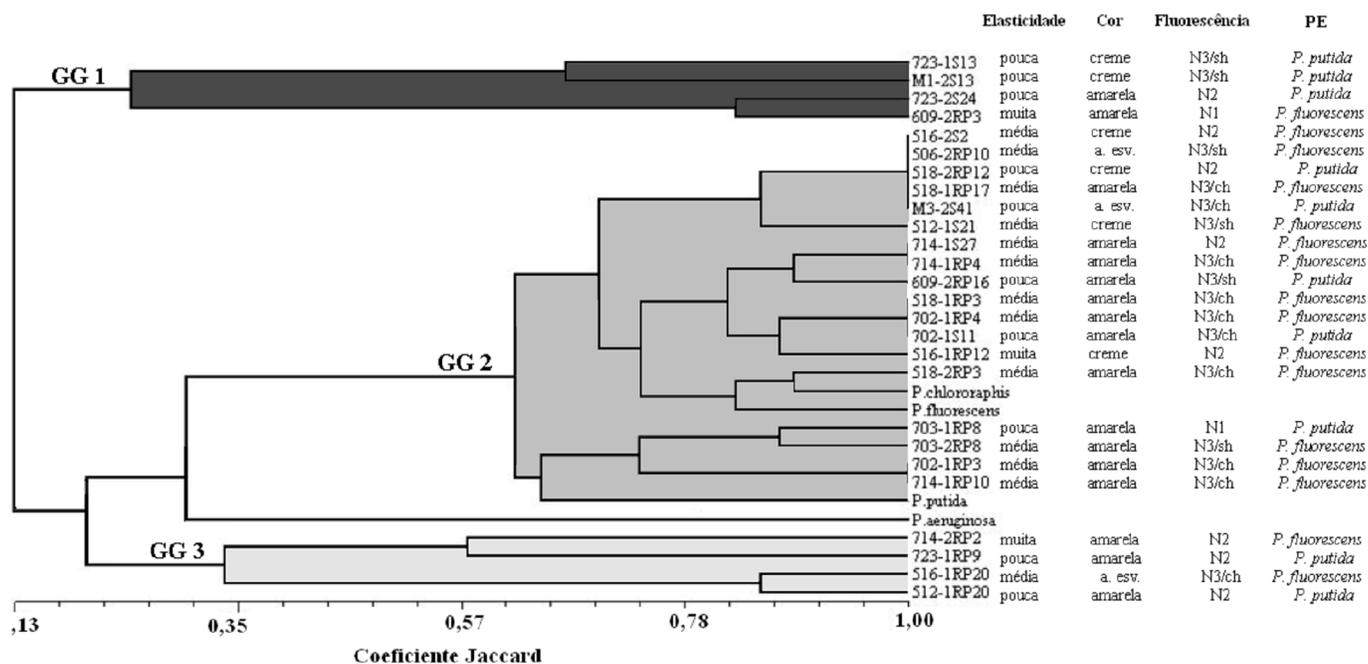


Figura 7. Dendrograma de similaridade dos isolados representativos dos grandes grupos morfológicos de *Pseudomonas*, construído a partir da análise de restrição do 16S rDNA com as endonucleases *Cfo I* e *Hinf I*. GG- Grupo genotípico; PE- Possível espécie de acordo com Zago et al. (2000); a. esv.- amarelo-verdeada; N- nível de fluorescência N1, N2 e N3; sh- sem halo; ch- com halo.

Figure 7. Similarity dendrogram of the representative isolates of *Pseudomonas* great morphological groups, performed through 16S rDNA restriction analysis using the endonucleases *Cfo I* and *Hinf I*. GG- Genotypic group; PE- Possible specie according to Zago et al. (2000); a. esv.- greenish yellow; N- fluorescence level N1, N2 and N3; sh- without halo; ch- with halo.

restrição *Cfo I* e *Hinf I*, produzindo 3 a 7 fragmentos, dependendo da enzima e do isolado (Figuras 6B).

A análise da restrição do 16S rDNA (ARDRA) das espécies-tipo de *Pseudomonas* com a endonuclease *Cfo I* resultou em dois padrões de bandas para as quatro espécies usadas como padrão (Figura 6b1). O primeiro padrão de restrição refere-se às linhas 1, 2 e 4 e representa as espécies-tipo *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. chlororaphis*, respectivamente. O segundo padrão, representado pela linha 3, corresponde à espécie-tipo *P. aeruginosa*. Com a endonuclease *Hinf I*, foram observados dois padrões de bandeamento: o primeiro, representado pelas linhas 1 e 2, corresponde às espécies-tipo *P. putida* e *P. fluorescens*; e o segundo, representado pelas linhas 3 e 4, corresponde às espécies-tipo *P. aeruginosa* e *P. chlororaphis*, respectivamente.

A análise dos fragmentos de restrição, com a endonuclease *Cfo I*, dos isolados representativos do GGM resultou em 12 diferentes padrões de bandas. A maioria dos isolados estudados apresentou padrão de restrição que corresponde às espécies-tipo *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis*. Com a endonuclease *Hinf I*, foram observados oito padrões de restrição e a maioria dos isolados apresentou o padrão de restrição que corresponde às espécies-tipo *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. chlororaphis*.

A partir desses dados, foi gerado um dendrograma com os isolados representativos dos grupos morfológicos e das espécies-tipo de *Pseudomonas* (Figura 7), no qual se observou a formação de três grupos genotípicos (GG1, GG2 e GG3). Os agrupamentos GG1 e GG3 apresentaram, cada um, quatro iso-

lados com similaridade inferior a 30%. No GG1, três dos quatro isolados foram obtidos de solo das entrelinhas e apresentaram características morfológicas de *P. putida*. No GG3 todos os isolados foram obtidos do rizoplano de trigo e apresentaram características morfológicas de *P. fluorescens* e *P. putida*. O agrupamento GG2 apresentou cerca de 60% de similaridade e foi o mais abundante, com total de 18 isolados, além das espécies-tipo *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis*. Aproximadamente 70% dos isolados presentes neste agrupamento foram obtidos de rizoplano de trigo e cerca de 70% deles apresentaram características morfológicas de *P. fluorescens* (Figura 7).

A maior parte dos isolados com características morfológicas de *P. fluorescens* foi obtida do rizoplano de trigo, enquanto a maioria dos isolados com características morfológicas de *P. putida* foi obtida do solo das entrelinhas de trigo, o que sugere a ocorrência de seleção bacteriana no rizoplano do trigo com predominância da espécie *P. fluorescens*, à qual tem sido atribuída grande capacidade de promover o crescimento de plantas por meio da produção de hormônios vegetais (Probanza et al., 2002; Picard & Bosco, 2005; Aslantans et al., 2007).

CONCLUSÕES

A população de bactérias do rizoplano de trigo apresenta maior contraste, morfológica e genotipicamente, com a presença de bactérias com características de *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida*, com predomínio de *P. fluorescens*. Entre-

tanto, há clara diferença para a população bacteriana do solo das entrelinhas, a qual é composta predominantemente por bactérias com características de *Pseudomonas putida*.

O rizoplano do trigo promove seleção na comunidade bacteriana de forma que os isolados de *Pseudomonas* obtidos do rizoplano são semelhantes morfológicamente, impedindo que sejam observados efeitos do sistema de manejo do solo ou da rotação de culturas.

As características morfológicas dos isolados obtidos do solo das entrelinhas diferem claramente entre os sistemas de plantio direto e convencional.

A análise genotípica permite separar os isolados de *Pseudomonas* em três grupos: em um deles, 75% dos isolados foram provenientes do rizoplano, enquanto os demais grupos foram formados somente por bactérias isoladas do rizoplano ou do solo das entrelinhas.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agrobiologia, à Embrapa Trigo e à CAPES, pelo apoio técnico e financeiro.

LITERATURA CITADA

- Aslantas, R.; Cakmakci, R.; Sahin, F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae*, v.111, n.4, p.371-377, 2007.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1992. v.1.
- Cattelan, A.J.; Hartel, P.G.; Fuhrmann, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, v.63, n.6, p.1670-1680, 1999.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- Ferreira, E.P.B.; Dusi, A.N.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.5, p.605-612, 2008.
- Fuhrmann, J.J.; Wollum II, A.G. *In vitro* growth responses of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean rhizosphere bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, v.21, n.1, p.131-135, 1989a.
- Fuhrmann, J.J.; Wollum II, A.G. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biology and Fertility of Soils*, v.7, n.2, p.108-112, 1989b.
- Geels, F.P.; Schippers, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Journal of Phytopathology*, v.108, n.3-4, p.207-214, 1983.
- Jetiyanon, K.; Kloepper, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, v.24, n.3, p.285-291, 2002.
- Ji, P.; Campbell, H.L.; Kloepper, J.W.; Jones, J.B.; Suslow, T.V.; Wilson, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, v.36, n.3, p.358-367, 2006.
- Jones, C.M.; Thies, J.E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *Journal of Microbiological Methods*, v.69, n.2, p.256-267, 2007.
- Kimura, O.; Ribeiro, R.L.D. Taxonomia do gênero *Pseudomonas*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.2, p. 209-228, 1994.
- King, E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v.44, n.2, p.301-307, 1954.
- Laguerre, G.; Riggotier-Gois, L.; Lemanceau, P. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction(PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Molecular Ecology*, v.3, n.5, p.479-487, 1994.
- Lupwayi, N.Z.; Hanson, K.G.; Harker, K.N.; Clayton, G.W.; Blackshaw, R.E.; O'Donovan, J.T.; Johnson, E.N.; Gan, Y.; Irvine, R.B.; Monreal, M.A. Soil microbial biomass, functional diversity and enzyme activity in glyphosate-resistant wheat-canola rotations under low-disturbance direct seeding and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, v.39, n.7, p.1418-1427, 2007.
- Malhi, S.S.; Lemke, R. Tillage, crop residue and N fertilizer effects on crop yield, nutrient uptake, soil quality and nitrous oxide gas emissions in a second 4-yr rotation cycle. *Soil and Tillage Research*, v.96, n.1-2, p.269-283, 2007.
- Miletto, M.; Bodelier, P.L.E.; Laanbroek, H.J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, v.70, n.1, p.103-111, 2007.
- Palleroni, N.J.; Kunisawa, R.; Contopoulou, R.; Doudoroff, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.23, n.4, p.333-339, 1973.
- Picard, P.; Bosco, M. Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. *FEMS Microbiology Ecology*, v.53, n.3, p.349-357, 2005.
- Probanza, A.; García, J.A.L.; Palomino, M.R.; Ramos, B.; Mañero, F.J.G. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (B. licheniformis CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, v.20, n.2, p.75-84, 2002.
- Rajaniemi, T.K.; Allison, V.J. Abiotic conditions and plant cover differentially affect microbial biomass and community composition on dune gradients. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, n.1, p.102-109, 2009.

- Robe, P.; Nalin, R.; Capellano, C.; Vogel, T.M.; Simonet, P. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, v.39, n.4, p.183-190, 2003.
- Segers, P.; Vancanneyt, M.; Pot, B.; Torck, U.; Hoste, B.; Dewettinck, D.; Falsen, E.; Kersters, K.; De Vos, P. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.44, n.3, p.499-510, 1994.
- Silva, K.R.A.; Salles, J.F.; Seldin, L.; Elsas, J.D. van. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, v.54, n.2, p.213-231, 2003.
- Tamaoka, J.; Ha, D.; Komagata, K. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.37, n.1, p.52-59, 1987.
- Thioulouse, J.; Chessel, D.; Dolédec, S.; Oliver, J.M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, v.7, n.1, p.75-83, 1997.
- Widmer, F.; Seidler, R.J.; Gillevet, P.M.; Watrud, L.S.; Di Giovanni, G.D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.7, p. 2545-2553, 1998.
- Willems, A.; Falsen, E.; Pot, B.; Jantzen, E.; Hoste, B.; Vandamme, P.; Gillis, M.; Kersters, K.; De Ley, J. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.40, n.4, p.384-398, 1990.
- Woese, C.R. Bacterial evolution. *Microbiology Review*, v.51, n.2, p.221-271, 1987.
- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Arakawa, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacea* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiological Immunology*, v. 36, n.12, p.1251-1275, 1992.
- Yang, C.H.; Crowley, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.1, p.345-351, 2000.
- Young, J.P.W.; Downer, H.L.; Eardly, B.D. Phylogeny of the phototropic rhizobium strain BTAIL by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rDNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n.7, p.2271-2277, 1991.
- Zago V.; De-Polli H.; Rumjanek N. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia/EMBRAPA-CNPAB, 2000. 32p. (Documento, 127).
- Zhang, P.; Zheng, J.; Pan, G.; Zhang, X.; Li, L.; Rolf, T. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 58, n.2, p.264-270, 2007.