Análise Quantitativa e Molecular de Bactérias Diazotróficas na Rizosfera de Plantas de Sorgo Cultivadas em Solo Ácido

Emanuela M Soares[2], César H. Lúcio[3], Eliane A. Gomes[1], Poliana S. Guimarães[1], Samyra H. O .Sales[4], Anne C. Pinto[1] e Ivanildo E. Marriel[1]

[1]Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas-MG, Brasil; [2]PUC- Minas, [3]UNI-BH, [4]UFOP
e-mail: imarriel@cnpms.embrapa.br,

Palavras-chave: Diazotróficos, *Azospirillum,* cerrado, gramínea, sequenciamento do rDNA.

Revisão Bibliográfica

O agronegócio é um dos setores mais importantes da economia nacional, tanto nos aspectos sociais quanto econômicos. Esta importância deve-se basicamente aos investimentos em pesquisa e tecnologia que possibilitaram a ampliação da fronteira agrícola para área antes consideradas inadequadas, como os cerrados.

O sorgo é o quinto cereal mais importante no mundo. A vantagem do sorgo, em relação ao milho, é sua ampla adaptação aos estresses ambientais, principalmente deficiência hídrica e alta temperatura, condições desfavoráveis à maioria dos cereais (SANTOS *et al*., 2005), que contribuiu para sua expansão nos cerrados.

Os solos sob vegetação de cerrado caracterizam-se pela acidez e deficiência extrema de nutrientes, especialmente nitrogênio e níveis elevados de alumínio, manganês. Solos ácidos associados a metais tóxicos são uma das maiores restrições à produção agrícola e, entre os metais o alumínio destaca-se como um dos maiores problemas em solos ácidos, com pH $\leq$ 5,0, por representar um fator limitante de crescimento para as plantas (FOY e FLEING, 1976).

Como o nitrogênio é o único elemento que não faz parte da composição do material de origem na formação dos solos, somente torna-se incorporado ao sistema solo-planta através de duas vias: processo químico (aplicação de fertilizantes) ou via processo biológico (fixação biológica de nitrogênio).

O processo químico para a produção de fertilizantes nitrogenados, representa custos elevados para os produtores, parcela importante do custo total de produção de algumas culturas, além de contaminarem o ar, água e alimentos, prejudicando a saúde humana e animal.

Por outro lado, o processo biológico, via fixação biológica de nitrogênio, ocorre utilizando fonte de energia renovável. Neste caso, a redução do nitrogênio atmosférico a amônio ocorre em função de um complexo enzimático, chamado nitrogenase, presente em alguns microrganismos existente na natureza. Este grupo de microrganismos é denominado diazotróficos ou mais comumente, de fixadores de nitrogênio (DÖBEREINER *et al,* 1995), que utilizam fundamentalmente compostos orgânicos, produtos da fotossínte como fonte de energia.

Entre os diazotróficos de interesse em associações com gramíneas e cereais tem sido isolados predominante, segundo Döbereiner e Baldani, (1982), grupos do gênero

Azospirillum. Essas bactérias constituem o grupo de diazotróficos mais bem estudados, em razão de sua ampla distribuição em diferentes plantas e condições edafoclimáticas.

Atualmente, considera-se que a incorporação dos métodos baseados no sequenciamento de fragmentos de genes rRNA 16S de microrganismos contribuirão para ampliar o conhecimento da diversidade microbiana do solo, e suas interações com as plantas.

Esses conhecimentos são indispensáveis para produção de inoculantes microbianos visando a substituição do N aplicado em culturas e, conseqüentemente, a sustentabilidade da agricultura, sem desconsiderar seus aspectos sociais e ambientais.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo em região do ecossistema Cerrado sob Latossolo Vermelho-Escuro. Os tratamentos constaram de duas épocas de amostragem, dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor L. Moench*), um tolerante ao Al (BR310- G1), e outro sensível ao Al (BR304- G2), cultivados sobre três concentrações de alumínio (0%, 20%, 40%). Os três níveis da saturação de alumínio desejados foram obtidos através de adubação química do solo de acordo com os resultados da análise química, além da calagem. Amostras de raiz e de solo rizosférico e não-rizosférico foram coletadas aos 30 dias e 90 dias após a germinação.

A análise quantitativa e o isolamento de bactérias diazotróficas associativas, para espécies *Azospirillum* spp, foram realizados utilizando-se os meios semi-sólidos específicos , sem nitrogênio, de acordo com Döbereiner *et al*. (1995). O Meio NFb favorece o crescimento de bactérias das espécies *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense e Herbaspirillum* sp, e o LGI favorece o crescimento de *Azospirillum amazonense*. Os resultados, estimados através da técnica do número mais provável (NMP), foram analisados com a utilização do software MSTAR-C, versão 2.10 (MSTAT Director, Michigan State University), utilizando-se os dados transformados para logaritmo.

Após o crescimento em meio batata-malato sólido, 17 estirpes, selecionadas com base na diversidade fenotípica, foram caracterizadas e identificadas através de métodos moleculares. O DNA genômico bacteriano foi extraído de acordo com o procedimento preconizado por DOYLE e DOYLE (1990).

As reações de PCR foram feitas segundo protocolo de Pazoutová et al. 2000, utilizando-se os primers 968F e 1401R. Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit "Gel Extraction" da Qiagem. O sequenciamento dos fragmentos obtidos foi feito em um sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystens Hitachi) utilizando-se os primers ITS1 e ITS2 separadamente e o kit "Big Dye Terminator"v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City , CA) de acordo com as recomendações do fabricante. As seqüências foram analisadas pelo programa BAST N (ALSCHUL et al., 1997) e comparadas com as do banco de dados "GenBank".

Resultados e discussões

Foram obtidas 193 estirpes de bactérias diazotróficas associadas à cultura de sorgo, em solo de cerrado, a partir de amostras de solo e de raiz. Destas culturas 27,27% foram positivas para o meio NFb; 17,05% foram positivas tanto para o meio NFb quanto para o meio LGI, e 12,5% positivas para o meio LGI e 43,18% foram negativas para ambos meios de cultura. Esses dados demonstram que praticamente metade dos isolados obtidos não são de bactérias diazotróficas.

Observou-se uma predominância de bactérias que utilizam preferencialmente malato (meio NFb) como fonte de carbono, que incluem principalmente as espécies *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense e Herbaspirillum* sp (DOBEREINER *et al*., 1995). Notou-se também, um número relativamente elevado de bactérias que utilizaram indistintamente malato e sacarose (meio LGI), pois cresceram em NFB e LGI, indicando uma versatilidade metabólica destes isolados.

Em relação a população de estimada aos 30 dias após a germinação das plantas, os valores variaram entre 4,0 x 10^3 e 8,5 x 10^4 células g^{-1} de solo rizosférico e entre 2,5 x 10^2 e 2,5 x 10^3 células g^{-1} de solo não rizosférico. E aos 90 dias após a germinação, os valores variaram entre 5,0 x 10^4 e 4,6 x 10^6 células g^{-1} de solo e de 3,1 x10^4 e 1,0 x10^6 células g^{-1} para as amostras de solo rizosférico e não rizosférico, respectivamente. As diferenças encontradas entre as épocas de avaliação foram significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. A influência da idade da planta sobre a população de bactérias diazotróficas associativas tem sido relato em várias outras pesquisas (REIS Jr. *et al*., 2000).

Entre os genótipos do sorgo testados não houve diferenças significativas (Figuras 1), independente da idade da planta. No entanto, comparando os valores observados na presença de plantas (genótipos BR310e BR304) e o solo não rizosférico, observou-se que a população de bactérias diazotróficas foi superior nas amostras de rizosfera (Figura 1). Este fato pode ser explicado pela liberação de exsudados e secreções pelas raízes de plantas, que estimula a população e a atividade microbiana nesse ambiente (BOWEN e ROVIRA, 1991).

As amostras de solo não-rizosférico apresentaram os menores valores de densidade bacteriana, em ambas as épocas, corroborando com o resultado de Magalhães e Döbereiner (1984) que relatam baixas densidades destas bactérias, sendo muitas vezes nulas em solos desprovidos de cobertura e com baixa fertilidade, como os de cerrado.

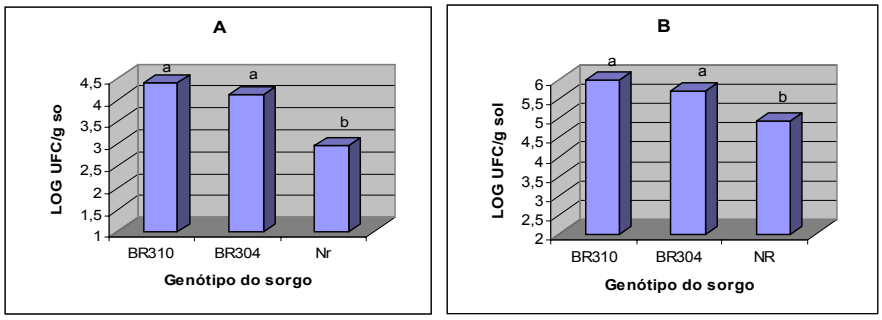

Figura 1: População de bactérias diazotróficas em amostra de solo rizosférico e não rizosférico de plantas de sorgo, em solo de cerrado. Gráfico (A) 30 dias após a germinação e gráfico (B) após 90 dias de germinção. Valores médios de três repetições, três níveis de Al e de dois meios de cultura. Média seguida pela mesma letra não se diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A influência do alumínio sobre a população de bactérias diazotróficas pode ser observada nas figuras 2. Na primeira coleta, houve redução significativa da densidade bacteriana em função do alumínio, independente do nível de saturação e dos genótipos testados. Em contraste, na segunda avaliação, 90 dias após a germinação, ocorreu efeito significativo deste elemento sobre a população bacteriana no nível mais elevado de saturação de alumínio, 40%.

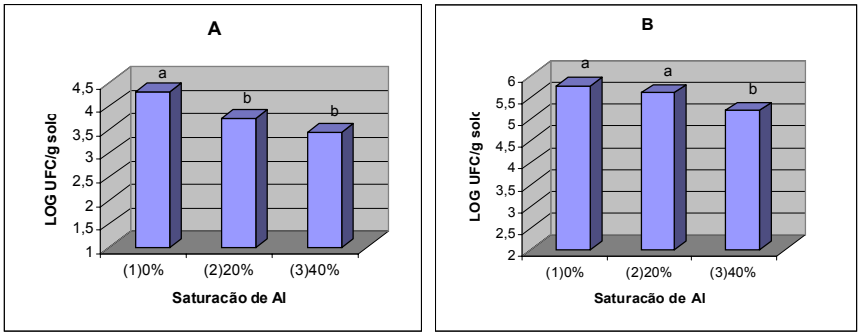

Figura 2: População de bactérias diazotróficas em amostras de solo rizosférico e não rizosférico de plantas de sorgo, em solo de cerrado, sob três níveis de saturação de Al, aos30 dias após a germinação (A) e após 90 dias de germinação (B). Valores médios de três repetições, dois genótipos e de dois meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra não se diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Nesta época, provavelmente a idade da planta tenha favorecido a liberação de mais exsudatos estimulando o crescimento das diazotróficas mesmo na presença de 20% de alumínio. Está bem estabelecida a habilidade dos ácidos orgânicos na complexação e eliminação da atividade tóxica do alumínio, tanto internamente como na rizosfera (DELHAIZE *et al*. 1993).

Na presença do genótipo tolerante, houve menor alteração na densidade bacteriana, em função dos diferentes níveis de saturação de alumínio, embora as diferenças não tenham sido significativas. Entretanto, nas amostras de solo não rizosférico, houve tendência de prevalência de *Azospirillum amazonense* em todos os níveis de Al (0%, 20% 40%), independente da idade da planta, sugerindo que estas bactérias não são tão dependentes de exsudados específicos quanto as demais espécies e que apresentam maior tolerância ao alumínio. De fato, essas bactérias crescem em meio de cultura mais ácidos, LGI (DOBEREINER *et al*., 1995).

Em relação às analises moleculares, o protocolo SDS/CTAB para extração do DNA de bactérias diazotróficas se mostrou eficiente, com rendimento aproximado de 100 ng /µl de DNA para a maioria das amostras, exceto o isolado 3. Os produtos de amplificação por PCR apresentaram uma única banda com aproximadamente 430 pb, dentro do tamanho de fragmento esperado. O sequenciamento dos amplicons e o alinhamento das seqüências obtidas com as do banco de dados confirmou a caracterização preliminar para 78% dos isolados como pertencentes ao gênero *Azospirillum* com índices de identidade considerados satisfatórios, variando entre 95% e 98%, sendo três dos isolados das espécies *A. brasilense*. Enquanto os isolados 7, 14 e 15 foram identificados como *Xilela fastidiosa* não cultivável, *Stentrophomonas maltophila e Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente, sendo os dois primeiros não relatados ainda como bactérias diazotróficas.

Conclusões

A presença de Al em solo de cerrado altera a composição quantitativa da comunidade de bactérias diazotróficas associativas reduzindo a população, independente da presença da planta de sorgo.

Não houve diferenças significativas entre os genótipos testados, em relação à densidade de bactérias diazotróficas na rizosfera.

A idade da planta influencia a população da *Azospirillum* na rizosfera de sorgo, sendo mais elevada aos 90 dias pós a germinação. Na ausência de plantas, há predominância de *Azospilillum amzonense* em solo de cerrado, independente da presença de alumínio.

A análise molecular confirmou a predominância do gênero *Azospirillum* entre os isolados avaliados.

O uso de meios semi-sólidos sem N não permite afirmar que todos os isolados obtidos são bactérias diazotróficas.

Literatura citada

Altschui SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. **Gappod BLAST and PSI BLAST**: a new generation of pretein database search programs. Nucleite Acids Research 25: 3389-3402.

BOWEN E ROVIRA. **Plants roots: The hidden half**. Marcel Dekker: Waisel, 1991. p. 349-388.

DELHAIZE, E., CRAIG, S., BEATON, C.D., et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, v.103, p.685-693, 1993.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar Bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**.Brasília, EMBRAPA-SPI e Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DÖBERREINER, J.; BALDANI, J.l. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura,** São Paulo, v.34, n.7, p.69-81, 1982.

DOYLE J. J. and DOYLE J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus , v. 12, p. 13-15, 1990.

FOY, C.D., FLEMING, A.L. Crop tolerance to sub-optimal land con**ditions.** Madison : ASA Meet., Houston, 1976. **The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils**: p.301-328.

GEN BANK NUCLEOTIDE DATABASE. Disponível em <http://ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em 9 jun 2006.

MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **R. Microbiol**., v.15, p. 246-252, 1984.

PAZOUPOVÁ, S.; BANDYOPADHYAY,R.; FREDERICKSON, D.E.; MANTLE,P.G.& FREDERIKSEN, R. A Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease** v.84, p.437-442.2000.

REIS Jr., F.B.; SANTOS, S.T.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. & DÖBEREINER, J. N2-fixing bacteria associated with *Brachiaria* pastures. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity.** Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.432.

SANTOS, F. G. dos; CASELA, C. R.; WAQUIL, J. M. Melhoramento de sorgo. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 605-658.