

# POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA RIZOSFERA DE SORGO INFLUENCIADA PELA IDADE DA PLANTA E SATURAÇÃO DE ALUMÍNIO

Emanuela Mansur Soares<sup>2</sup>; César H. Lúcio<sup>3</sup>; Eliane A. Gomes<sup>1</sup>; Anne C. Pinto<sup>1</sup>; Ivanildo E. Marriel<sup>1</sup>.

## RESUMO

A eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> é afetada por fatores bióticos e abióticos. Objetivou-se avaliar a influencia da idade da planta e da toxidez de alumínio sobre a população de bactérias diazotróficas na rizosfera de plantas de sorgo no cerrado sob três níveis de Al (0%, 20% e 40%). Amostras de solo não rizosférico foi usado como controle. A população foi estimada utilizando-se o NMP e dois meios de cultura seletivos (NFb e LGI). Dentre 193 isolados obtidos de solo e de raízes, 27,27% foram positivos para o meio NFb; 17,05% para NFb e LGI, 12,5% para LGI e 43,18% negativos para ambos os meios (não diazotróficos). As populações destas bactérias variaram de 2,5x10<sup>2</sup> a 4,6x10<sup>6</sup> células g<sup>-1</sup> solo, dependendo da saturação de Al da presença e da idade da planta (30 e 90 dias). A população bacteriana foi mais elevada aos 90 dias e reduzida pelo Al. Na presença de plantas, houve ligeira predominância das espécies *Azospirillum brasilense*, *A. Lipoferum* (positivo NFb) e, na ausência, de *A. Amazonense* (positivo LGI). A caracterização molecular demonstrou 78% das 14 seqüências analisadas foram identificadas como sendo do gênero *Azospirillum*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Azospirillum*, cerrado, gramíneas, sequenciamento rDNA

## DIAZOTROPHIC BACTERIA POPULATION IN SORGHUM RHIZOSPHERE AFFECTED BY PLANT AGE AND ALUMINUM SATURATION

### ABSTRACT

The efficiency of biological nitrogen fixation in grass is affected by biotic and abiotic factors. The objectives of the work were to isolate and to evaluate the influence of plant age and aluminum toxicity on the diazotrophic bacteria population from sorghum rhizosphere in the cerrado soil with three level of saturation Al (0, 20 e 40%). A control of non rhizosphere was used. The population was estimated by the NMP method, using two selective medium (NFb e LGI). It has been obtained a total

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas-MG, Brasil; <sup>2</sup>PUC-Minas, <sup>3</sup>UNI-BH., e-mail: [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br)

of 193 isolate of bacteria and it shown that only 57% were considered diazotrophic bacteria. The population size was found to range from  $2,5 \times 10^2$  to  $4,6 \times 10^6$  cells  $g^{-1}$  soil, depending of the aluminum saturation level, and plant age (30 e 90 days). The population density was higher at 90 days and reduced by aluminum presence. Rhizospheric soil have shown a bacteria density higher than in non- rhizosphere. In the presence of the plant, there was predominance of the species *Azospirillum brasilense*, *A. Lipoferum* and, in the absence, *A. Amazonense*. The amplification and sequencing of region 16S from rand shown that from total of 14 sequences analyzed 78% were similar to *Azospirillum*.

**KEY-WORDS:** *Azospirillum*, cerrado, graminaceous, rDNA sequence.

## INTRODUÇÃO

Os solos de cerrado contribuem atualmente com a maior parcela da oferta de grãos e oleaginosas, inclusive de sorgo com 81% de sua produção. Os grãos de sorgo constituem um componente importante na cadeia produtiva da indústria de proteína animal. A utilização desses solos tem exigido elevados investimentos pelos agricultores, especialmente no uso intensivo de insumos agrícolas, os quais possibilitam alcançar altos níveis de produtividade.

Entretanto, sistemas agrícolas que procuram eliminar o uso de insumos químicos sintéticos nos processos produtivos, ganham espaço na preferência do consumidor, pois, além de ofertar alimentos mais saudáveis, atende aos preceitos de uma agricultura de base ecológica, ou seja, orientada para a prevenção do meio ambiente, melhoria da qualidade de vida do produtor e do consumidor e equidade social (MARRIEL ET al, 2006).

Nesse contexto, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico torna-se de grande importância como fonte de nitrogênio para as plantas, como uma tecnologia de baixo custo e sem efeito negativo para o ambiente (DÖBEREINER e BALDANI, 1982). No caso de cereais, a principal bactéria envolvida nesse processo biológico tem sido descrita como pertencente ao gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER e BALDANI, 1982), sendo que a eficiência da associação planta-bactéria é influenciada pelos fatores bióticos e abióticos.

Este trabalho tem como objetivo efetuar a análise quantitativa e molecular da comunidade de bactérias diazotróficas na rizosfera de planta de sorgo em solo de cerrado.

## MATERIAL E MÉTODOS

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas-MG, Brasil; <sup>2</sup>PUC-Minas, <sup>3</sup>UNI-BH., e-mail: [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br)

Dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), um tolerante ao Al (BR310-G1), e outro sensível ao Al (BR304-G2) foram cultivados em solo de cerrado, sob três concentrações de alumínio (0%, 20%, 40%).

A análise quantitativa de bactérias diazotróficas associativas, foi estimado pelo método número mais provável (NMP), utilizando-se dois meios semi-sólidos seletivos; NFB, para *Azospirillum brasilense* e *a. lipoferum* e LGI para *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995), em dois estádios de desenvolvimento da planta, 30 e 90 dias após a germinação. Para análise filogenética, extraiu-se o DNA genômico bacteriano de 17 estirpes selecionadas com base na diversidade fenotípica conforme DOYLE e DOYLE (1990). As reações de PCR foram feitas segundo protocolo de Pazoutová et al. 2000, utilizando-se os primers 968F e 1401R. O sequenciamento dos fragmentos obtidos utilizou os primers ITS1 e ITS2 separadamente e o kit "Big Dye Terminator" v.3.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas 193 estirpes de bactérias, das quais 57% foram consideradas diazotróficas porque formaram películas em meio semi-sólido NFB e LGI, as demais como não diazotróficas.

Em relação à densidade bacteriana observou-se que, população estimada aos 30 dias após a germinação variou entre  $4,0 \times 10^3$  e  $8,5 \times 10^4$  células  $g^{-1}$  de solo rizosférico e entre  $2,5 \times 10^2$  e  $2,5 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  de solo não rizosférico. E aos 90 dias, oscilou entre  $5,0 \times 10^4$  e  $4,6 \times 10^6$  células  $g^{-1}$  de solo e de  $3,1 \times 10^4$  e  $1,0 \times 10^5$  células  $g^{-1}$  para as amostras de solo rizosférico e não rizosférico, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas para influência do alumínio da idade da planta e entre solo rizosférico e não rizosférico (Figura 1).

As amostras de solo não-rizosférico apresentaram os menores valores de densidade bacteriana, independente da idade da planta e da presença de Al. O Al reduziu a população de bactérias diazotróficas nas amostras analisadas independente dos genótipos e da idade (Figura 1).

Em relação às análises moleculares observou-se que os produtos de amplificação por PCR apresentaram uma única banda com aproximadamente 430 pb (dados não mostrados). O sequenciamento dos amplicons e o alinhamento das seqüências obtidas com as do banco de dados confirmaram a caracterização preliminar para 78% dos isolados como pertencentes ao gênero *Azospirillum* com índices de identidade considerados satisfatórios, variando entre 95% e 98%, sendo

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas-MG, Brasil; <sup>2</sup>PUC-Minas, <sup>3</sup>UNI-BH., e-mail: [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br)

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.

### LITERATURA CITADA

MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C. A.; MIRIAM KAORI UTIDA, M. K.; MONTEIRO, G.G.; ALVARENGA, R. C.; CRUZ, J. C. **Bioindicadores de qualidade do solo de cerrado sob sistemas de manejos para produção orgânica**. Sete Lagoas, MG, EMBRAPA/CNPMS, 2006. 12p. EMBRAPA/CNPMS- circular técnica.

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.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. 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.

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.

### TABELAS E FIGURAS

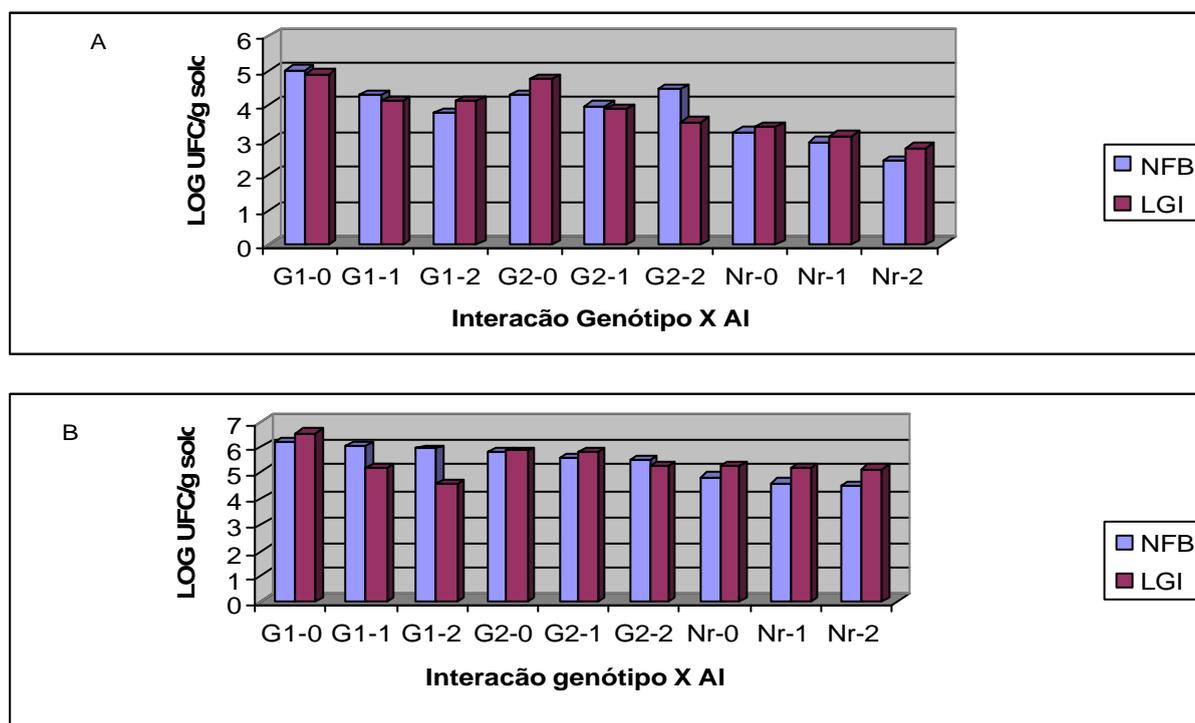


Figura 1: interação Genótipo X AI na população de bactérias diazotróficas de plantas de sorgo, em solo de cerrado. Aos 30 dias após a germinação (A) e aos 90 dias após a germinação (B). G1-0 = Genótipo BR310 - 0% de AI; G1-1 = Genótipo BR310 - 20% de AI; G1-2 = Genótipo BR310 - 40% de AI; G2-0 = Genótipo BR304 - 0% de AI; G2-1 = Genótipo BR304 - 20% de AI; G2-2 = Genótipo BR304 - 40% de AI; Nr-0 = Solo não rizosférico - 0% de AI; Nr-1 = Solo não rizosférico - 20% de AI; Nr-2 = Solo não rizosférico - 40% de AI.