

## Influência da Dose de Fósforo na Diversidade Genética Bacteriana na Rizosfera de Linhagens Endogâmicas Recombinantes de Sorgo

Amanda A. de Oliveira Neves Viana<sup>1</sup>, Daiane C. Diniz Caldeira<sup>2</sup>, Patrícia Gomes Silva<sup>3</sup>, Bianca Braz Mattos<sup>4</sup>, Ivanildo Evódio Marriel<sup>5</sup>, Christiane A. Oliveira Paiva<sup>6</sup>, Robert Eugene Schaffert<sup>7</sup>, Cláudia Teixeira Guimarães<sup>8</sup> e Vera Maria Carvalho Alves<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Jaboticabal, São Paulo, [amandaneves1981@yahoo.com.br](mailto:amandaneves1981@yahoo.com.br); <sup>2</sup>Acadêmica do Centro Universitário de Sete Lagoas – Unifemm, Sete Lagoas, Minas Gerais, [dayanecristina71@yahoo.com.br](mailto:dayanecristina71@yahoo.com.br); <sup>3</sup>Doutoranda da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, [patriciabiolo@yahoo.com.br](mailto:patriciabiolo@yahoo.com.br); <sup>4,5,6,7,8,9</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, [bianca@cnpms.embrapa.br](mailto:bianca@cnpms.embrapa.br), [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br); [christiane.paiva@cnpms.embrapa.br](mailto:christiane.paiva@cnpms.embrapa.br); [schaffert@cnpms.embrapa.br](mailto:schaffert@cnpms.embrapa.br); [claudia@cnpms.embrapa.br](mailto:claudia@cnpms.embrapa.br); [vera@cnpms.embrapa.br](mailto:vera@cnpms.embrapa.br).

**Resumo** - Microrganismos do solo são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética bacteriana na rizosfera de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) de sorgo plantadas em solos com baixa e alta disponibilidade de fósforo (P) por meio da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Foram coletadas amostras de solo da rizosfera de sete RILs cultivadas em Latossolo Vermelho Distroférico, fase cerrado, com baixo e alto teor de P. A diversidade de bactérias foi avaliada em gel de DGGE. O perfil eletroforético de amplicons no DGGE obtidos através da amplificação do DNA total extraído da rizosfera de RILs, em dois níveis de P, evidenciou pequenas diferenças na comunidade de bactérias em função do suprimento de P. Houve a formação de seis grupos de acessos, sendo que, o maior deles com quatro acessos. A estrutura populacional genética de bactérias da rizosfera das RILs não foi influenciada pelo suprimento de P no solo.

**Palavras-chave:** PCR DGGE, microrganismos, solo, sustentabilidade, material genético, cerrado.

### Introdução

Um dos fatores limitantes da expansão agrícola em solos ácidos são a baixa fertilidade, toxidez de alumínio, baixa biodiversidade e principalmente baixa disponibilidade de fósforo (P). Práticas de manejo dos componentes biológicos do solo, associadas ao uso de cultivares eficientes, constituem práticas importantes para uma agricultura sustentável. A tolerância de alguns cultivares aos estresses nutricionais, principalmente de fósforo, pode estar relacionada à ocorrência de determinados microrganismos na rizosfera de plantas (HINSINGER, 2001; FERNANDES, 2005; MARSCHNER et al., 2006; PICARD et al., 2008; GILLER et al., 2009).

A aquisição de P é primordial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas uma vez que este nutriente desempenha um papel fundamental nas funções fisiológicas básicas. Entretanto, o P é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas. A disponibilidade de P depende da atividade de microrganismos presentes na rizosfera e de outras estratégias desenvolvidas pelas plantas para adquirir o P. Os microrganismos do solo desempenham papel fundamental no ciclo biogeoquímico do P e na sua disponibilidade para as plantas, mediante o fluxo de P pela biomassa microbiana, a solubilização do P inorgânico, a mineralização do P orgânico e a associação entre plantas e microrganismos solubilizadores de P (Paul & Clark, 1996).

O uso de cultivares que reúnem características desejadas de resposta e eficiência ao uso de P à nutrição de plantas representa uma economia de recursos financeiros e implicam na diminuição de impactos ambientais aos sistemas agrícolas. A extração de DNA de amostras de solo, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos (COUTINHO et al., 1999; ZILLI et al., 2003). Metodologias baseadas no perfil genético de populações de microrganismos do solo, como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), são utilizadas para avaliar a diversidade estrutural das comunidades microbianas, com grande utilidade na análise simultânea de várias amostras, e permitem avaliar o efeito de perturbações ambientais e monitorar a dinâmica espaço-temporal dessas comunidades (Muyzer, 1999).

Desta maneira as técnicas moleculares PCR DGGE caracterizam uma forma eficiente e confiável para estudos da microbiologia ambiental e ecologia do solo. Objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética bacteriana da rizosfera de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) de sorgo em solos com baixa e alta disponibilidade de P por meio da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

### **Material e Métodos**

Amostras de solo rizosférico foram coletadas de linhagens RILs de sorgo cultivadas em latossolo vermelho distroférico. As RILs foram provenientes do cruzamento dos parentais BR 007B (responsivo ao P) e SC 283 (eficiente ao P) do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento experimental utilizado foi DBI (delineamento de blocos incompletos) com três repetições. Foram avaliadas sete RILs: RILs 80, RILs 305, RILs 310, RILs 377, RILs 422, RILs 442 e RILs 461. As Rils foram plantadas em solos com baixo nível P (baixo 5 ppm) e alto nível de P (20 ppm).

O DNA total de 500 mg de solo rizosférico de cada RIL foi extraído utilizando o kit “Fast DNA for soil” Bio 10, de acordo com as orientações do fabricante. Os fragmentos foram amplificados utilizando-se os primers universais para bactéria (região 16S), U968F acrescido de uma seqüência de CG denominada “clamp” juntamente com o 1401R (5,0 pmol •L<sup>-1</sup>) (Heuer et al., 1997).

A eletroforese foi realizada em uma unidade de DGGE da Biorad (Richmond, USA), sendo que os produtos de PCR foram aplicados em gel contendo 6% de poliacrilamida. O gradiente desnaturante (uréia e formamida deionizada) foi de 45% a 65%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições da eletroforese foram de 16 h a 60 °C e 70 V. Após a eletroforese os géis foram corados com prata e fotografados em máquina digital Sony Cyber Shot 7.2. Para avaliar a divergência genética entre as RILs (acessos) foram utilizadas análises de agrupamento. Na análise de agrupamento utilizou-se para a delimitação dos grupos os métodos de otimização de Tocher e o método hierárquico de agrupamento de ligação entre grupos utilizando-se UPGMA (“unweighted pair-group average”) e o coeficiente de Jaccard.

### **Resultados e Discussão**

O perfil eletroforético de amplicons no DGGE obtidos através da amplificação do DNA total extraído da rizosfera de RILs, em dois níveis de P, com os primers universais para bactérias 968F CG e 1401R (região 16S), mostram que o P não teve influência sobre a diversidade das comunidades de bactérias em função do suprimento de P (Figura 1). O perfil eletroforético de amplicons apresentados pelas RILs 80 AP, RILs 305 BP, RILs 310 BP, RILs 442 BP e RILs 461 BP, foi diferente das demais RILs. Com base no perfil de amplicons das RILs foi realizado um agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA) que mostrou a formação de seis grupos distintos, ressaltando o grupo VI foi formado por apenas um indivíduo (RILs 461 AP). No agrupamento obtido pelo Método de Tocher, (método de otimização) utilizando como medida de dissimilaridade genética a Distância Generalizada de Mahalanobis (Tabela 1), foram formados 6 grupos de acessos, sendo que o grupo III, o maior deles, teve 4 acessos, o grupo I, 3 acessos, os grupos II, IV e V tiveram 3 acessos e o grupo VI apenas 1 acesso. Verificou-se que o acesso 9 (RILs 305 BP, tolerante ao alumínio) mostrou-se como um dos mais divergentes, constituindo o grupo VI.

Em estudos de diversidade bacteriana na rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de P, Oliveira et al., (2009) não encontraram diferença na diversidade bacteriana analisada pelo DGGE, entre bactérias associadas a genótipos de milho eficientes e ineficientes no uso de P. Esta observação também foi relatada por Gomes et al., (2001) e Silva et al., (2003). Estes resultados corroboram aos descritos neste trabalho.

Pelo método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA), apresentado na figura 1, tomaram-se por base mudanças discrepantes de níveis no dendrograma em relação ao método de otimização de Tocher apresentado na tabela 2. Resultados discrepantes entre esses métodos também foram verificados por Martinello, (2003). Com a análise de agrupamento foi possível sintetizar as informações e formar grupos baseados no grau de semelhança, dando melhor idéia da relação estrutural existente entre os perfis das RILs (Peeters e Martinelli, 1989 , Mohammadi e Prasanna, 2003). Como os métodos se basearem em princípios distintos, tais diferenças são perfeitamente aceitáveis. Através do método de otimização, de Tocher, foi possível a formação de grupos mutuamente exclusivos, ou seja, independentes, uma vez que eles não são relacionados. Por este motivo os métodos de otimização são mais confiáveis do que os hierárquicos.

A informação da distância genética relativa entre indivíduos ou populações é útil, pois permite organização e fornece informação pura para uma amostragem mais eficiente dos genótipos.

### **Conclusão**

Genótipo de sorgo não influenciou a estrutura genética das comunidades bacterianas, independente do suprimento de P.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

### **Literatura Citada**

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P., ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 3 (71): 491-503,1999.

FERNANDES, S. A. P.; BETTIOL, W.; CERRI, C. C. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Applied Soil Ecology* 30: 65–77, 2005.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2031–2037, 2009.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237: 173-195, 2001.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA 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* 232: 167-180, 2001.

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

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283: 11-24, 2006.

MARTINELLO, G.E.; LEAL, N.R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, M.G.; DAHER, R.F. Diversidade genética em quiabeiro baseada em marcadores RAPD. *Horticultura Brasileira* 21: 20-25, 2003.

MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.*, V.43, p. 1235-1248, 2003.

OLIVEIRA, C.A.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E. A.; LANA, U.G.P.; SCOTTI, M.R.; ALVES, V.M.C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 1473-1482, 2009.

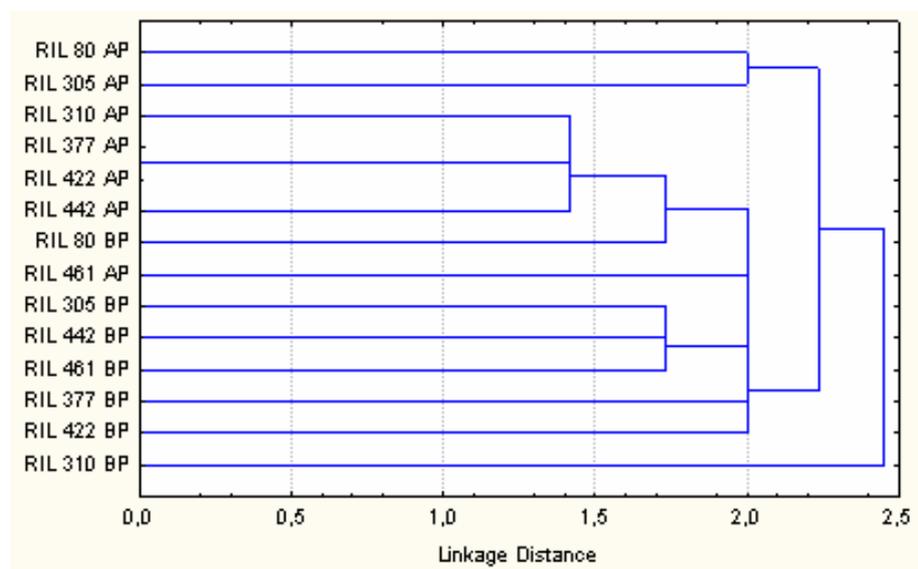
PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic, 1996. 340p.

PEETERS, J.P.; MARTINELLI, J.A. Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germoplasm collections. *Theor. Appl Genet.*, v.78, p. 42-48, 1989.

PICARD, C.; BARUFFA, E.; BOSCO, M. Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 106-115, 2008.

SILVA, K.R.A. da; SALLES, J.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. 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* 54: 213-231, 2003.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M.C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* 20: 391-411, 2003.



**Figura 1.** Dendrograma construído com base nas medidas de dissimilaridade genética obtidas pela análise molecular usando o método hierárquico de agrupamento de ligação entre grupos UPGMA (“unweighted pair-group average”) e o coeficiente de Jaccar, representando a distância genética da árvore com os primers gerais U968F CG e 1401R em amostras de solo rizosférico de RILs com baixo nível de P (AP) e alto nível de P (BP).

**Tabela 1.** Agrupamento de acordo com Método de Tocher, de 14 acessos de RILs em solo com baixo nível de P (AP) e alto nível de P (BP), com base na dissimilaridade expressa pela Distância Generalizada de Mahalanobis.

<b>Grupo</b>	<b>Acesso</b>
I	RIL 80 AP, RIL 305 AP, RIL 377 AP
II	RIL 310 AP, RIL 422 AP
III	RIL 442 AP, RIL 80 BP, RIL 310 BP, RIL 422 BP
IV	RIL 461 AP, RIL 461 BP
V	RIL 377 BP, RIL 442 BP
VI	RIL 305 BP