

Aplicação da Técnica Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) na Caracterização de Microrganismos Dominantes na Rizosfera de Plantas Cultivadas em Solo Ácido

Solo ácido pode ser definido como um solo com valor de pH < 7,0. Essa classe de solo inclui solos fortemente ácidos, com valores de pH < 5,0, e moderadamente ácidos, com valores de pH entre 5,0 e 6,5. No Brasil, a importância de solos ácidos – região do cerrado – é bem conhecida, considerando-se que essa região responde por aproximadamente 42% do PIB do agronegócio nacional.

Entretanto, esses solos apresentam limitações à produtividade agrícola, pois são caracteristicamente pobres, com baixa disponibilidade de alguns nutrientes e excesso de outros, além de sua vulnerabilidade a estresses de umidade, temperatura, etc.

De modo geral, a sobrevivência e a capacidade produtiva das plantas dependem basicamente de sua adaptação a ecossistemas adversos, em função de suas características intrínsecas ou por alterações antropogênicas. Por sua vez, essa adaptação depende da relação raiz - parte aérea. A parte aérea atua como fonte de carboidratos derivados da fotossíntese para o crescimento e o desenvolvimento das raízes, enquanto o sistema radicular desempenha várias funções, como sustentar a planta, absorver água e minerais do solo e distribuir certos reguladores de crescimento. Além disso, as raízes têm marcável habilidade de secretar uma vasta gama de moléculas de alto e baixo peso molecular na rizosfera, especialmente em resposta a estresses bióticos e abióticos, em um processo chamado rizodeposição.

A rizodeposição, liberação de compostos de carbono, a partir de células do córtex e da epiderme, resulta na proliferação de microrganismos dentro da raiz (endORIZOSFERA), sobre a raiz (RIZOPLANO) e ao redor da raiz (Ectorizosfera), conferido à rizosfera, zona de influência das raízes, características químicas, físicas e biológicas diferentes das do solo livre de raízes (não rizosférico).

Uma compreensão mecanística da adaptação de plantas a estresses minerais, que ainda é fragmentada, pode ser considerada como um pré-requisito para o avanço de várias áreas científicas, incluindo o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Os processos radiculares influenciam a química da rizosfera, a aquisição de nutrientes e as interações com organismos benéficos e patogênicos. A magnitude dessas alterações nas propriedades do solo é largamente determinada pela quantidade e tipo de C liberado da raiz, bem como de características intrínsecas do solo. As raízes metabolicamente ativas secretam várias formas de materiais orgânicos. Entre 40 e 95% do carbono transferido para as raízes é perdido como rizodeposição no solo, constituindo-se em considerável fluxo de carbono que influencia a modulação da

72 Circular Técnica

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2005

Autores

Ivanildo Evódio Marriel

Eng. Agr., Doutor. Embrapa
Milho e Sorgo. Caixa Postal
151 CEP 35701-970 Sete
Lagoas, MG.
imarriel@cnpmis.embrapa.br

Christiane Abreu de Oliveira

Eng. Agr., Estudante de
Doutorado da UFMG

Ruy Raposeiras

Biólogo. Bolsista da Fundação
McKnight

Eliane Aparecida Gomes

Bióloga. Técnico de Nível
Superior da Embrapa Milho e
Sorgo

Ubiraci Gomes de Paula Lanna

Químico. Assistente de
Pesquisa da Embrapa Milho e
Sorgo

Andréa Almeida Carneiro

Newton Portilho Carneiro

Biólogos, Ph.D., Pesquisadores
da Embrapa Milho e Sorgo.

estrutura de comunidades microbianas presentes nesses habitats.

As interações plantas-microrganismos são controladas geneticamente pelos macro e microssimbiontes, numa relação bastante complexa e ainda pouco conhecida. Em parte, esse fato é atribuído às limitações das metodologias convencionais utilizadas até recentemente. Considera-se que os meios de culturas definidos, simples ou complexos, não provêm fontes energéticas ou nutricionais adequadas ao crescimento dos membros representativos de todas as comunidades microbianas presentes e, conseqüentemente, produzem resultados quantitativos subestimados.

Atualmente, existem diversos métodos para a caracterização de comunidades microbianas e detecção de grupos específicos de microrganismos do solo, sem cultivo, mas cada um deles deve ser avaliado, para se testar uma hipótese particular, levando-se em conta seus custos e benefícios. Métodos moleculares baseados na amplificação do DNA de amostras de solo pela PCR - reação da polimerase em cadeia- combinada com DGGE, utilizando seqüências iniciadoras específicas para famílias, gêneros e espécies de interesse, têm sido utilizados para a análise da diversidade e da dinâmica de comunidades microbianas do solo, em função de variações ambientais ou antrópicas, para afiliação filogenética de membros de comunidades microbianas, em testes de pureza de linhagens microbianas. Essa técnica oferece alta sensibilidade e é menos laboriosa que outras estratégias envolvendo clonagem e enzimas de restrição. A utilidade de DGGE na análise de comunidade microbianas em amostras complexas apoia-se no pressuposto de que seqüências genômicas diferentes, em pelo menos um par de bases, migrarão para posições diferentes no gel, sendo a separação de seqüências de DNA baseada no seu comportamento de dissociação.

O interesse da pesquisa em eficiência nutricional em plantas não é recente; entretanto, nos últimos anos, há renovado interesse de instituições públicas e privadas na adaptação de plantas a estresses, com foco na pesquisa da base bioquímica, fisiológica e molecular

dos mecanismos envolvidos e no desenvolvimento de genótipos com características superiores.

Objetivos

Ampliar o conhecimento técnico científico das interações planta-microrganismos e de mecanismos envolvidos na adaptação de plantas a solo ácido.

Caracterizar a estrutura de comunidades microbianas na rizosfera de plantas de milho e sorgo desenvolvidos para eficiência nutricional em N e P, com ênfase na identificação de membros predominantes.

Identificar membros de grupos específicos da comunidades microbianas autóctenes desses habitats potencialmente úteis como fonte de insumos através de seu uso direto, de produto e/ou genes apropriáveis para o agronegócio

Metodologia

Exceto quando especificado, utilizaram-se linhagens de milho ou de sorgo contrastantes para eficiência no uso de N ou de P, desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Milho e Sorgo.

Foram analisadas amostras de solo rizosférico e não rizosférico de plantas cultivadas na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em um Latossolo Vermelho Distrófico, fase cerrado., em diferentes estádios de crescimento das plantas.

Coleta de amostras

As amostras analisadas foram obtidas a partir de coletas de plantas com o sistema radicular inteiro, dos seguintes genótipos contrastantes: a) de milho previamente caracterizados como eficientes (E) e ineficientes (I) para utilização de fósforo; b) de sorgo previamente caracterizados como tolerantes e sensíveis à toxidez de alumínio; c) genótipos contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio.

No laboratório, as raízes foram separadas dos colmos das plantas e do excesso de solo e deixadas em repouso, à sombra, durante 24 horas. Cada amostra foi constituída dos sistemas radiculares de cinco plantas por repetição. No dia seguinte, amostras de raízes, padronizadas quanto a morfologia, tipo e idade,

foram utilizadas para a retirada do solo aderido, que constituiu as amostras de solo rizosférico. O solo aderido às raízes foi retirado com batidas suaves e passado em peneiras 1 mm. Coletaram-se também amostras de solo não rizosférico nos diferentes ambientes de cultivo das plantas.

Extração de DNA e PCR

Os DNAs foram obtidos pela extração direta de amostras de 500 mg de solo, utilizando-se o "Fast Kit DNA for soil", BIO101, de acordo com a recomendação do fabricante.

No caso de análises da estrutura de comunidade de fungos micorrízicos em ectorrizosfera de milho e de sorgo, os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores universais para fungos, NS5 e ITS4, e um segundo PCR (nested PCR) quando necessário; utilizou-se o oligonucleotídeo iniciador da região ITS específico da família Acaulosporaceae, ACAU1660, ou específico da família Glomaceae, respectivamente, acrescidos de uma seqüência de CG denominada seqüência "clamp", juntamente com o oligonucleotídeo iniciador universal. Para fungos micorrízicos em endorrizosfera de milho, utilizaram-se oligonucleotídeos universais para fungos região ITS, seguidos de um segundo PCR (nested) com oligonucleotídeo iniciador específico VANS1CG, junto com o oligonucleotídeo iniciador NS21. Nas amostras de ectorrizosfera de sorgo, para a comunidade bacteriana, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores universais R1401 e F968CG.

As condições de temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão estão na Tabela 1.

Análise DGGE de produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados em géis de DGGE, utilizando-se um equipamento da BioRad "The DCode Universal mutation detection system" (Richmond, USA). O ambiente desnaturante é formado pela combinação de temperatura uniforme, tipicamente entre 50 e 60 graus, e um gradiente desnaturante formado com uréia e formamida, variando de 45% a 70%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de

poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições de eletroforese foram de 16h a 60°C e 100V. Após a eletroforese, os géis foram corados por 30min com SYBER GREEN I (Molecular Probes) ou prata e documentados para análises do perfil molecular das amostras.

Resultados

As interações entre plantas e microrganismos são complexas e controladas geneticamente pelo macro e microssimbionte. Características genotípicas da planta influenciam a morfologia do sistema radicular e a rizodeposição de fotoassimilados e, conseqüentemente, interferem na composição microbiana no ambiente da raiz.

De modo geral, o perfil genético das amostras de solo não rizosférico analisadas foi consistentemente mais simples que o de amostras da rizosfera, isto é, com menor número de amplicons, bandas, o que indica menor diversidade de microrganismos, independentemente dos genótipos, das épocas de colheitas e dos ambientes avaliados (Figuras 1, 3, 4 e 5)

O perfil eletroforético das bandas no DGGE (Figura 1) evidencia diferenças na comunidade micorrízica da família Acaulosporaceae da ectorrizosfera de milho, em função da característica do genótipo para eficiência no uso de P. Algumas bandas foram detectadas somente em genótipos eficientes. De modo similar, algumas bandas ocorreram em alto P e não ocorreram nos mesmos genótipos na presença de baixo suprimento de P. Evidência conclusiva de infecção e colonização seletiva de fungos micorrízicos em milho, em função da características de eficiência no uso de P, foi observada em amostras de endorrizosfera das plantas (Figura 2). Nota-se a presença de determinados membros da comunidade micorrízica em alta densidade e somente no genótipo caracterizado como eficiente no uso de P, o que sugere o papel desses fungos em mecanismos de adaptação de plantas de milho aos estresse de P no campo.

Resultados semelhantes foram encontrados em amostras coletadas na ectorrizosfera de plantas de

Tabela 1. Seqüências iniciadoras e condições de temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão utilizadas nos diferentes bioensaios.

Oligonucleotídios iniciadores	Seqüências (5' → 3')	Temperatura desnaturação	Temperatura anelamento	Temperatura extensão	Ciclos
R1401	GCGTGTGTACAAGACCC	94°C/1min.	55°C/1min.	72°C/2min.	30
F968CG	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG GGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTT AC	94°C/1min.	55°C/1min.	72°C/2min.	30
GLOM	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGC CGCCCCCGCCCAGCTAGGCTTAACATT GTTA	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25
ACAU	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGC CGCCCCCGCCCCTGAGACTCTCGGATCG GG	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	94°C/30seg.	50°C/30seg.	72°C/30seg.	35
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25
NS21	AATATACGCTATTGGAGCTGG	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25
VANS1CG	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG GGGCACGGGGGGGTCTAGTATAATCG TTATAC	94°C/20seg.	55°C/35seg.	72°C/1min.	25

sorgo cultivadas sob três níveis de saturação de alumínio. A análise dessas amostras, com oligonucleotídeos iniciadores universais para bactérias e para fungos micorrízicos da família Glomaceae, mostrou, nos dois casos, maior diversidade e presença de alguns membros das comunidades microbianas unicamente na presença dos genótipos tolerantes ao alumínio (Figuras 3 e 4). Na Figura 5, observa-se também variação no perfil de DGGE de comunidade bacteriana entre amostras de ectorrizosfera de genótipos de sorgo contrastantes para eficiência no uso de N cultivados em solo pobre em N, com menor diversidade desses microrganismos em solo não rizosférico.

Além de seu papel principal, que é a contribuição de P para planta em troca de fotoassimilados, especula-se que a presença de fungos micorrízicos nas raízes pode reduzir significativamente a quantidade ou a taxa de difusão de exsudatos para o solo durante a fase de desenvolvimento da planta e que, conseqüentemente, favorece a sua produção sob estresse do nutriente.

Os resultados apresentados confirmam que alguns grupos de microrganismos são estimulados preferencialmente pelas plantas em função do genótipo. Esse fato pode ser explicado pelo controle genético das plantas sobre a liberação de determinados exsudatos, particularmente, sob estresses. A análise bioquímica desses compostos poderia contribuir para o entendimento de mecanismos envolvidos nesse processo de adaptação.

A possibilidade da identificação filogenética de grupos predominantes no gel de DGGE é particularmente importante para grupos de microrganismos de difícil cultivo *in vitro*, como ocorre com algumas bactérias envolvidas na ciclagem de nitrogênio e com fungos micorrízicos que são dependentes obrigatórios da planta hospedeira, o que torna difícil sua identificação através dos métodos convencionais.

O método DGGE é relativamente rápido e permite análise de várias amostras simultaneamente. Entretanto, a interpretação dos resultados obtidos

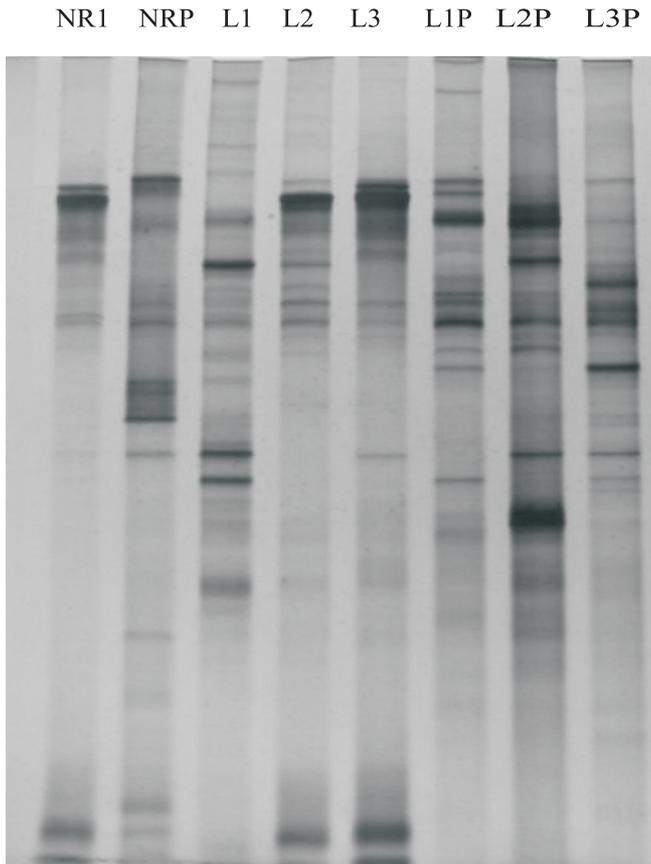


Figura. 1 Perfil de PCR-DGGE de micorrizas da família Acaulosporaceae em amostras de ectorrizosfera de genótipos de milho contrastantes para P, em ambientes de baixo e alto P. L1-linhagem eficiente; L2 e L3, linhagens ineficientes em baixo P. L1P, L2P e L3P, em alto P.

deve ser efetuada com alguns cuidados, em razão de limitações dessa metodologia. Além da eficiência das seqüências iniciadores utilizadas na etapa de amplificação e população dos microrganismos presentes na amostras, tem sido demonstrado experimentalmente que seqüências 16S rDNA diferindo em mais de um par de bases podem migrar para posição idêntica no gel DGGE. Isto mostra que a presença de bandas em posição similar não implica, necessariamente, uma mesma seqüência ou espécie de microrganismos. Provavelmente, esse fato explica um menor número de bandas observado no gel DGGE para algumas das amostras analisadas, quando comparado com o número de fenótipos de colônias observado em meio de cultura para bactérias, nas mesmas amostras (dados não mostrados).

Outra limitação mencionada na literatura é a presença de múltiplas cópias presentes em algumas bactérias e

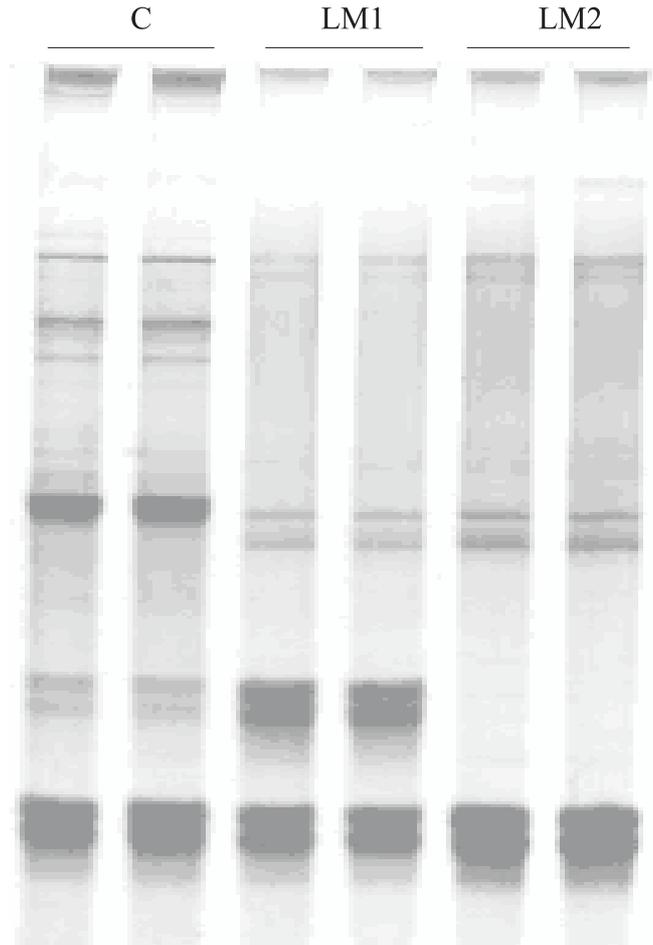


Figura 2. Perfil de DGGE de micorrizas em amostras de endorrizosfera de genótipos de milho contrastantes para P, em ambientes de baixo P. LM1-linhagem eficiente; L2, linhagem ineficientes.

detectadas no gel e que mascara, em parte, o grau de diversidade microbiana observado nas amostras.

Entretanto, os resultados apresentados demonstram a validade da técnica de DGGE para fins de comparar e discriminar comunidades microbianas em amostras de solo de rizosfera de plantas. Porém, o mérito maior dessa metodologia é permitir a caracterização e a identificação de membros predominantes de grupos específicos de microrganismos, através da excisão, eluição, seqüenciamento dos fragmentos e afiliação filogenéticas de seqüências de interesse.

Conclusão

Os resultados demonstram a viabilidade da técnica DGGE como ferramenta adequada para identificação de membros predominantes na rizosfera das plantas cultivadas em solo ácido e, conseqüentemente, pode permitir: a) ampliar o entendimento de mecanismos

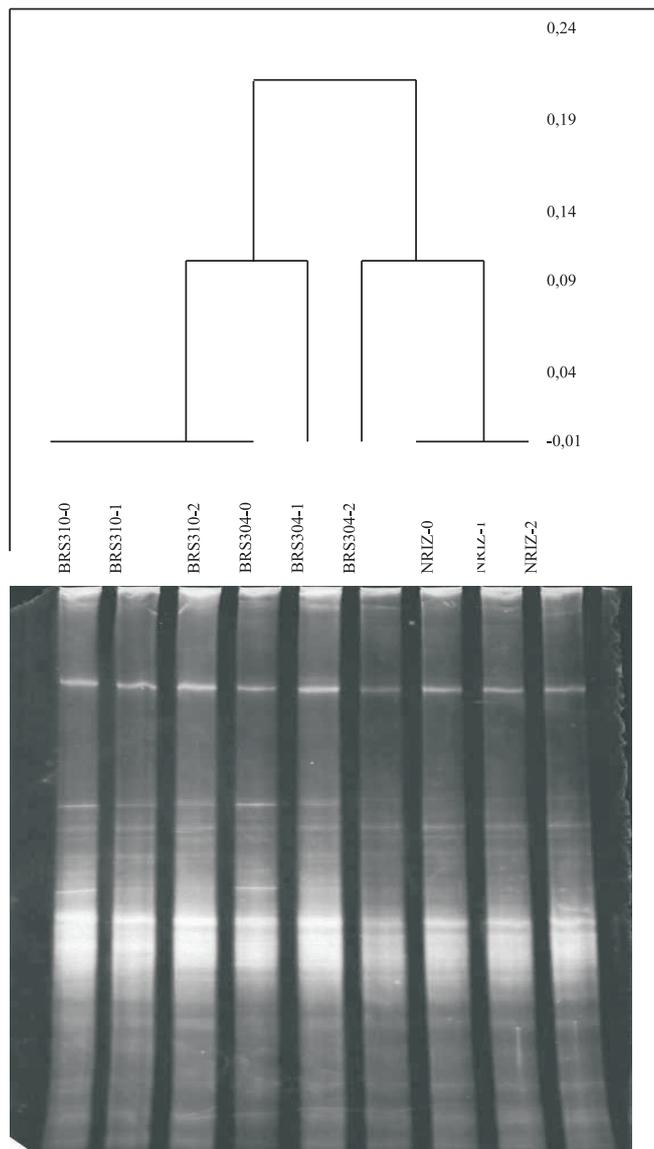


Figura 3. Perfil de DGGE da comunidade bacteriana em amostras de ectorrizosfera de genótipos de sorgo contrastantes para tolerância a Al, cultivados em solo com três níveis de saturação de Al (0, 0%; 1, 20% e 2, 40%). LS1, linhagem tolerante, LS2, linhagem sensível.

envolvidos nas inter-relações microrganismos- planta- adaptação a estresses nutricionais em solo ácido; b) selecionar microrganismos com alta compatibilidade com plantas de milho e sorgo, constituindo-se em estirpes-candidata para formulação e produção de inoculantes de interesse agrícola.

C LS1-0 LS1-1 LS1-2 LS2-0 LS2-1 LS2-2 NR-0 NR-1 NR-2

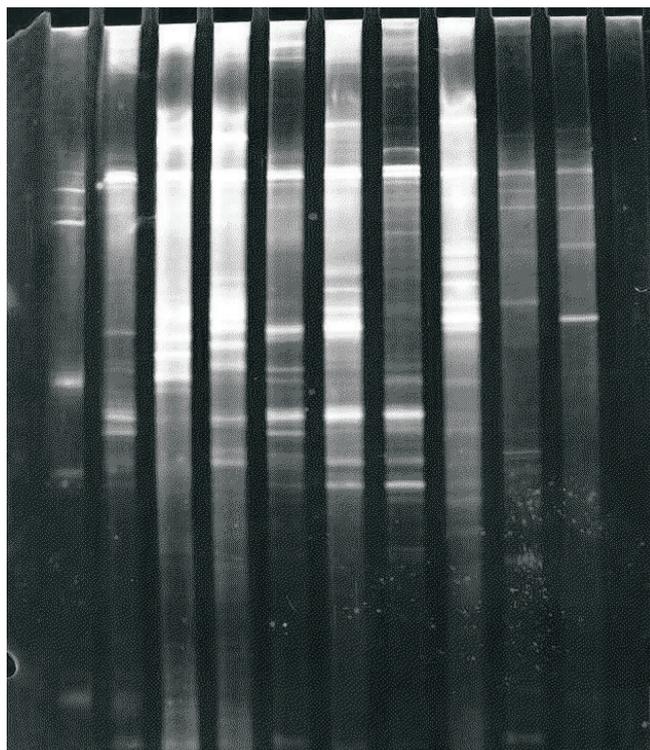


Figura 4. Perfil de DGGE de fungos micorrízicos em amostras de ectorrizosfera de genótipos de sorgo contrastantes para tolerância a Al, cultivados em solo com três níveis de saturação de Al (0, 0%; 1, 20% e 2, 40%). LS1, linhagem tolerante, LS2, linhagem sensível.

Bibliografia Consultada

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- GOODMAN, R. M.; BINTRIM, J. H.; QUIRINO, B. F.; ROSAS, J. C.; SIMON, H. M.; SMITH, K. A dirty look: Soil Microflora and Rhizosphere Microbiology. In: FLORES, H. E.; LYNCH, J. PI
- JACKSON, C. R.; RODEN, E. E.; CHURCHIL, P. F. Denaturing gradient gel electrophoresis fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. **Molecular Biology Today**, Wymondham, v. 1, p. 49-51, 2000.

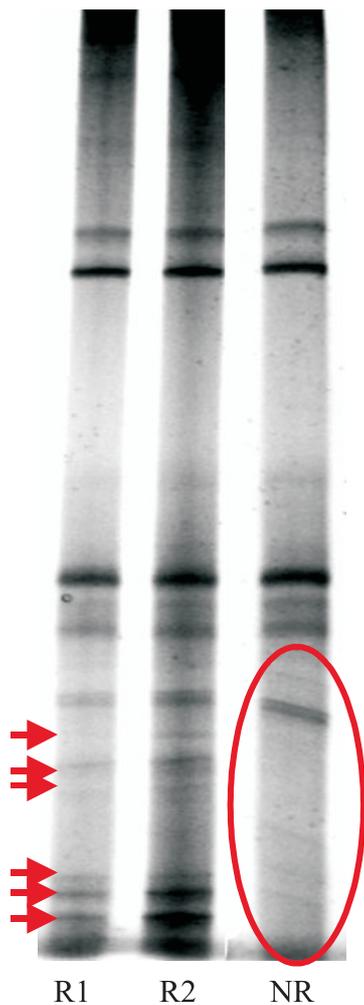


Figura. 5. Perfil de DGGE da comunidade bacteriana em amostras de solo de ectorrizosfera de genótipos de sorgo contrastantes para eficiência no uso de N, cultivados em solo pobre em N. R1, linhagem ineficiente; R2, linhagem eficiente; NR, solo não rizosférico.

MUYERS, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, Delft, v. 73, p.127-141.1998.

REDECKER, D. Specific PCR oligonucleotídios iniciadores to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, Berlin, v. 10, p. 73-80, 2000.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; VALOIS, A. C. C. (Ed.).

Recursos genéticos e melhoramento-microrganismos.

Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 97-128.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS T. D. Specific Amplification of 18S fungal ribossomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v. 54, p. 2908-2915, 1992.

SMITH, S. E.; ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. The involvement of mycorrhizas in assesment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. In: RANDALL, P. J.; DELHAIZE, E.; RICHARDS, R. A.; MUNNS, R. (Ed.). *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 221-231.

**Circular
Técnica, 72**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: MG 424 Km 45 Caixa Postal 151 CEP
35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3779 1000

Fax: (31) 3779 1088

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2005): 200 exemplares

**Comitê de
publicações**

Presidente: *Antônio Carlos de Oliveira*

Secretário-Executivo: *Paulo César Magalhães*

Membros: *Camilo de Lélis Teixeira de Andrade,
Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela,
José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro*

Expediente

Supervisor editorial: *Clenio Araujo*

Revisão de texto: *Dilermando Lúcio de Oliveira*

Editoração eletrônica: *Dilermando Lúcio de Oliveira*