

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA BIOLOG™ PARA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE INTRAESPÉCIFICA DE ISOLADOS DE *Azospirillum amazonense* ORIUNDOS DA ASSOCIAÇÃO COM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior¹, Marinete Flores da Silva², Kátia Regina dos Santos Teixeira², Segundo Urquiaga² & Veronica Massena Reis²

¹Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, 73301-970, Planaltina - DF, fabio@cpac.embrapa.br;

²Embrapa Agrobiologia, 23851-970, Seropédica - RJ

Introdução

A limitação de nitrogênio é um dos mais importantes fatores que levam a degradação das pastagens (Oliveira et al., 1997). Entretanto, existe a possibilidade de que parte deste nutriente possa ser disponibilizado pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), que pelos poucos estudos disponíveis, em alguns genótipos de *Brachiaria*, poderia ser responsável pela introdução de 30 a 40 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ no sistema solo-planta (Boddey & Victoria, 1986; Loureiro & Boddey, 1988). Dentre as espécies de bactérias diazotróficas associadas a estas plantas, *Azospirillum amazonense* merece destaque, apresentando alta incidência e altos números em associação com *Brachiaria* (Souto, 1982; Baldani, 1984) e adaptabilidade a pH ácido (Magalhães et al., 1983), característica comum à maioria dos solos brasileiros.

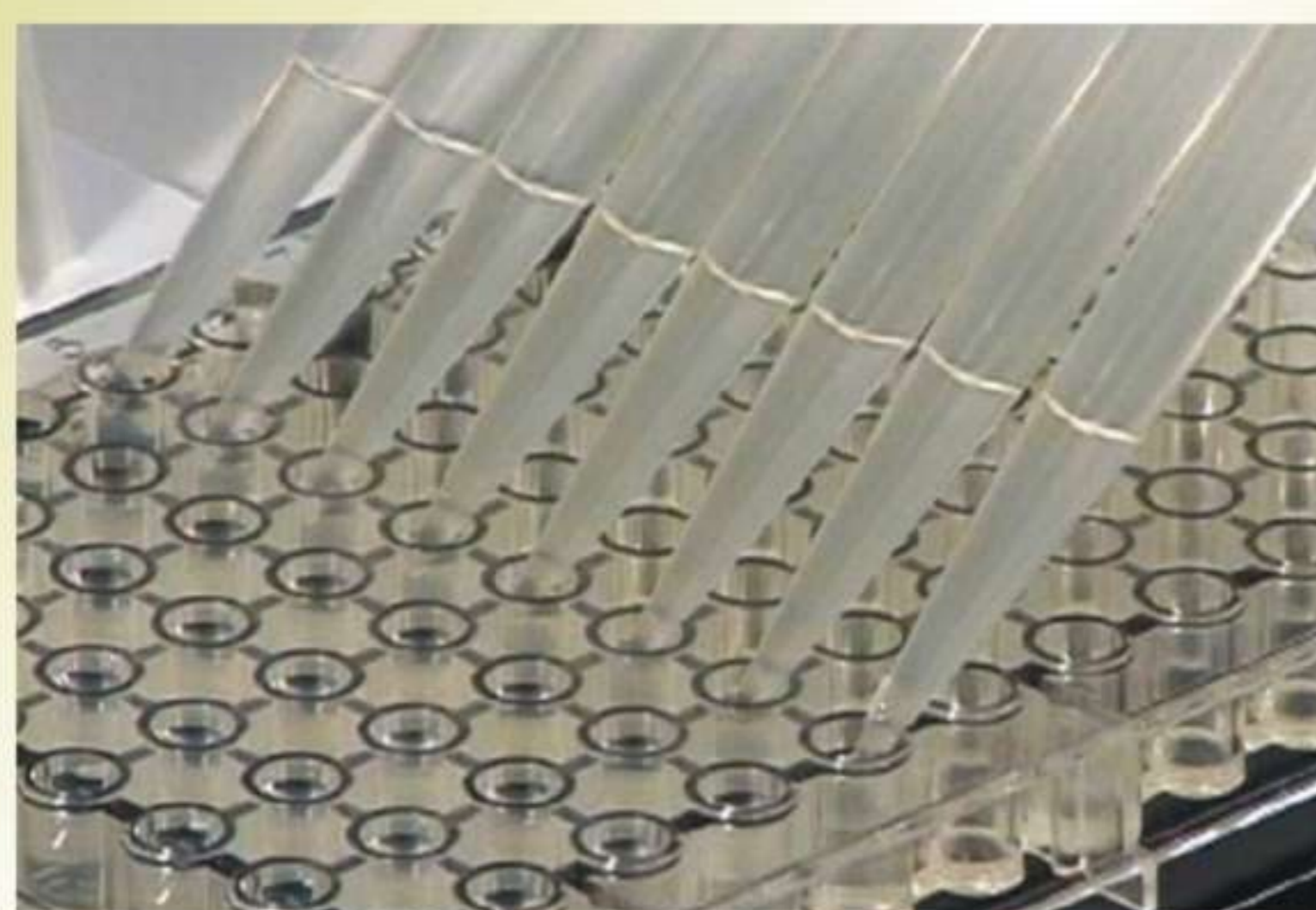
Como a diversidade de microrganismos do solo e daqueles encontrados no interior das plantas está condicionada a própria vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Brachiaria* possam exercer um efeito seletivo sobre as populações destes, o que poderia resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida por cada um destes genótipos.

Objetivo

Verificar o efeito do genótipo da planta sobre a diversidade intra-específica de isolados de *Azospirillum amazonense* oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*.

Material e métodos

Isolados de *A. amazonense* oriundos da associação com *B. humidicola*, *B. decumbens* e *B. brizantha* foram agrupados de acordo com a utilização de 95 fontes de carbono diferentes. Esta avaliação foi realizada através do uso do sistema BIOLOG (microplacas BIOLOG GN2; BIOLOG Inc., USA). Os padrões de utilização destas fontes de carbono foram comparados e as semelhanças entre os isolados estimadas pelo coeficiente "Simple Matching". Os



isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1, Exeter Software, USA).

As tabelas 1(a) e 1(b) apresentam as estirpes referência e os isolados de *Brachiaria* spp. utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Estirpes referência (a) e isolados de *A. amazonense* oriundos de *Brachiaria* spp. (b) utilizados neste trabalho.

(a)		(b)		
Espécie/Estirpe	Planta	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. brizantha</i>
<i>A. lipoferum</i> Sp59 ^T BR11008/ATCC 29707	Trigo	37	64	27
		53	81	48
		73	82	87
<i>A. Brasilense</i> Sp7 ^T BR11002/ATCC 29145 Cd ^T BR11001/ATCC 29729	<i>Digitaria decumbens</i>	76	83	104
	<i>Cynodon dactylon</i>	118	84	124
		134	86	125
<i>A. amazonense</i> CBAMC BR11145 Y2 ^T BR11140 /ATCC 35120	Cana-de-açúcar	140	107	131
	<i>Hypparrhenia rufa</i>		119	138
			123	139
<i>H. seropedicae</i> Z67 ^T BR11175/ATCC 35892	Arroz		127	
			132	
			135	
		136		

Resultados e discussão

A similaridade encontrada entre os isolados de *Brachiaria* e as estirpes referência de *A. amazonense* (CBAMC, Y2^T) foi de no mínimo 85%. As outras estirpes usadas como referência formaram grupos distintos, mostrando que o sistema BIOLOG foi eficaz no trabalho de confirmação das avaliações morfológicas (Figura 1).

Mesmo com a alta similaridade apresentada entre os isolados de *A. amazonense*, nota-se uma influência das espécies das plantas (Figuras 1 e 2). Observa-se que a maioria dos isolados de *B. decumbens* e *B. brizantha* estão distribuídos entre os grupos II, IV e VII, e que os isolados de *B. humidicola* concentram-se nos grupos I, III, V e VI.

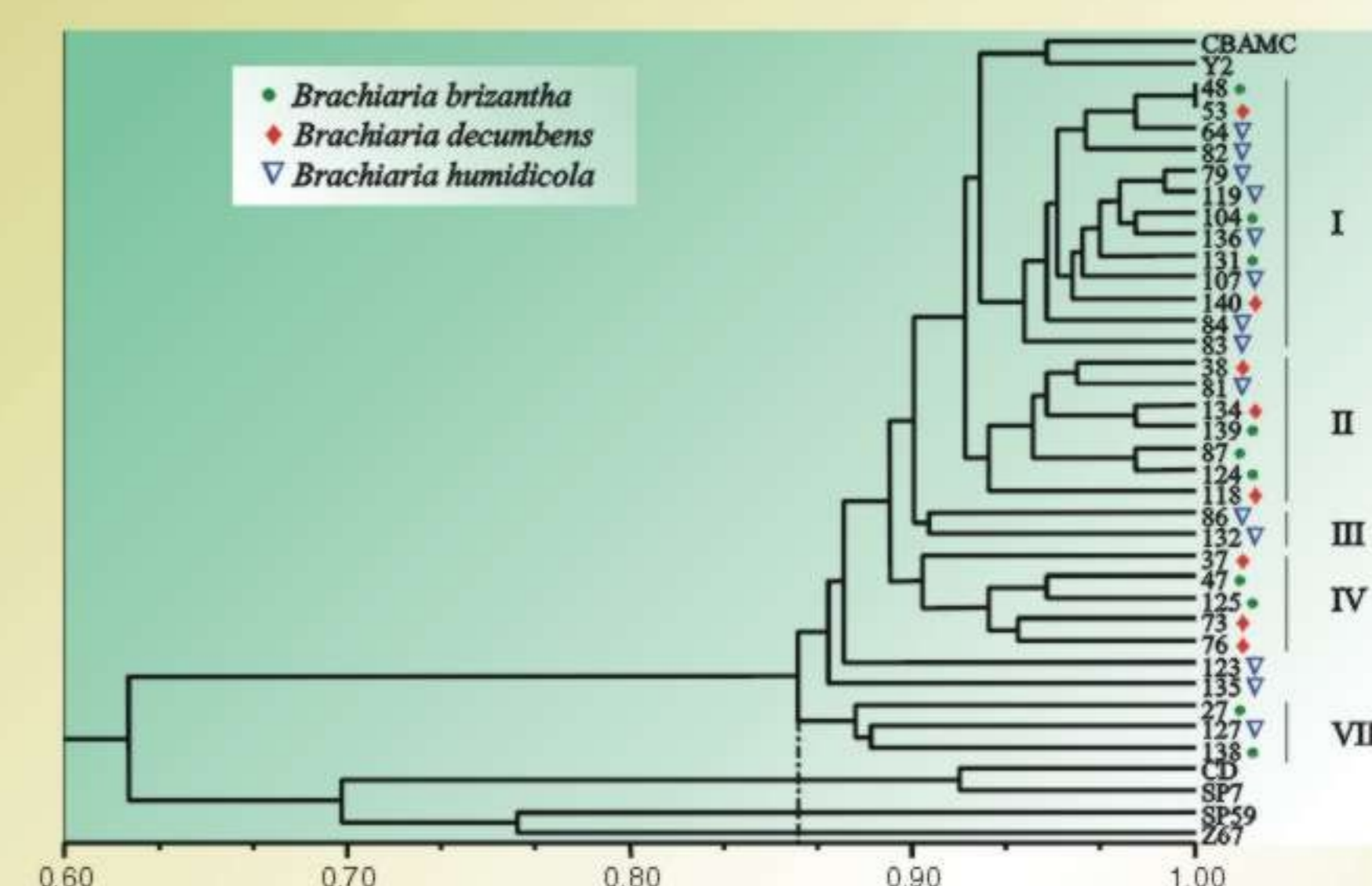


Figura 1. Dendrograma de similaridade de 32 isolados de raízes provenientes das três espécies de *Brachiaria* estudadas e das estirpes referência de *Azospirillum amazonense* (Y2 e CBAMC), *A. brasilense* (Sp7 e CD), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).

Um fato interessante é que *B. decumbens* cv Basilisk (cultivar de onde foram feitos os isolamentos) é na verdade um ecotipo intermediário entre as espécies de *B. brizantha* e *B. decumbens* (Valle et al., 2000).

Dentre os 95 compostos de carbono que fazem parte do sistema BIOLOG, quatro deles (D-frutose, D-psicose, ácido acético e ácido fórmico) destacaram-se por ser mais utilizados por isolados de *B. humidicola* do que por isolados das outras duas espécies (Tabela 2).

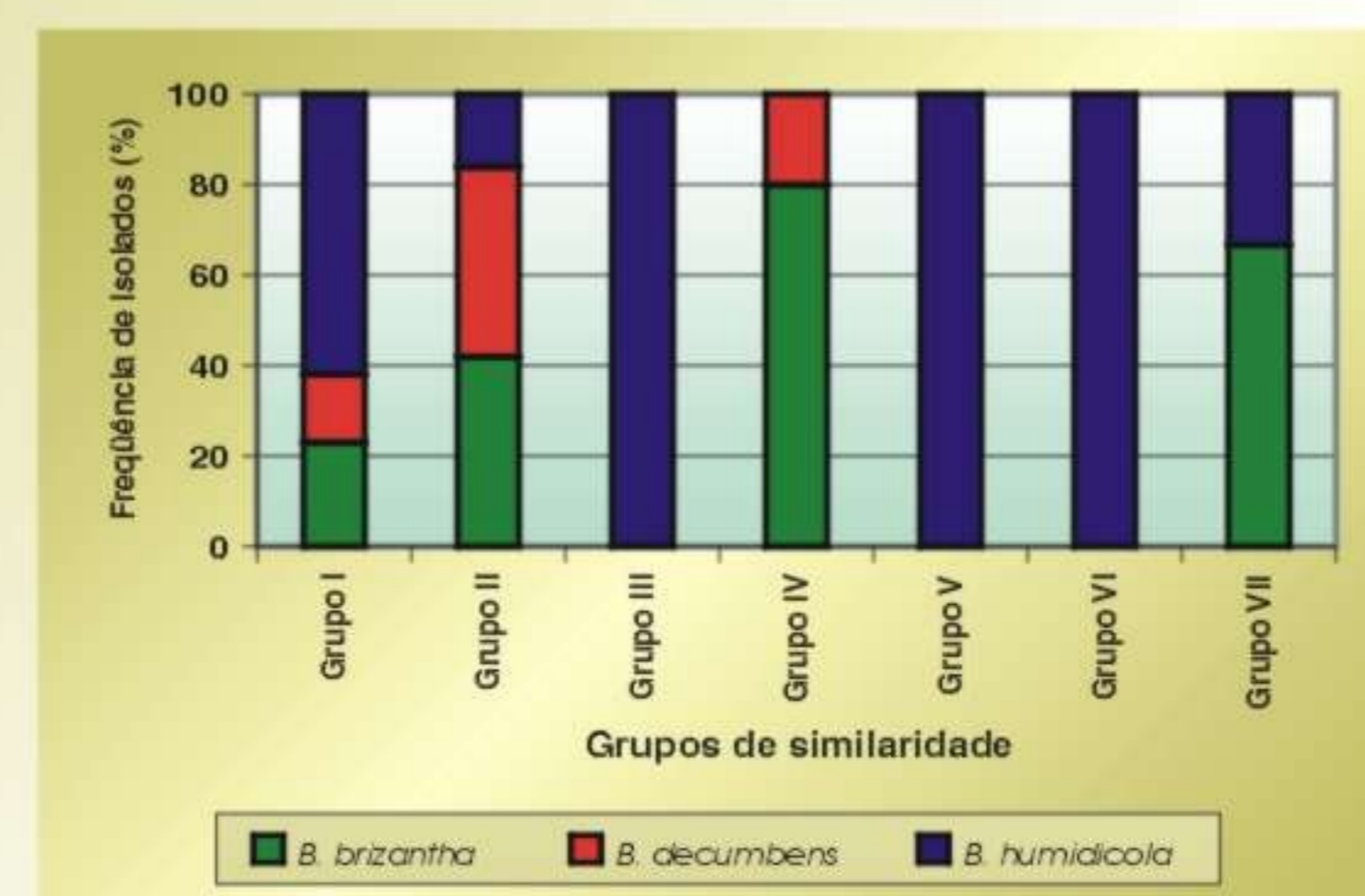


Figura 2. Frequência dos isolados de *A. amazonense* contidos em cada grupo de similaridade, formados pelo agrupamento dos resultados obtidos com o sistema BIOLOG, apresentado na Figura 1, levando-se em consideração a espécie de *Brachiaria* associada a estes isolados.

Sabe-se que diferentes exsudados radiculares oriundos de plantas diferentes, exercem uma pressão seletiva sobre os organismos da rizosfera, favorecendo isolados com vias específicas para utilização de fontes de carbono que são capazes de explorar. Ross et al. (2000), também discutem como um provável fator evolucionário, que estirpes de uma mesma espécie isoladas de plantas diferentes tenham adquirido a capacidade de metabolizar diferentes compostos de carbono.

Possivelmente os resultados deste estudo de diversidade de *A. amazonense*, possa ser indicado como fator de influência sobre as diferentes taxas de FBN associadas a estas plantas, assim como na sua adaptabilidade a solos de baixa fertilidade.

Tabela 2. Frequência dos isolados de cada uma das espécies de *Brachiaria*, na utilização de quatro diferentes compostos de carbono.

Origem dos isolados	Compostos de carbono			
	D-frutose	D-psicose	ácido acético	ácido fórmico
<i>B. Brizantha</i> (10 isolados)	30%	50%	20%	40%
<i>B. decumbens</i> (8 isolados)	37%	25%	12%	25%
<i>B. humidicola</i> (14 isolados)	71%	64%	64%	80%

Agradecimentos

Ao programa PADCT III/CIAMB pelo financiamento parcial do projeto, ao CNPq e ao curso de Pós-graduação em Ciência do Solo da UFRJ.

Referências bibliográficas

BALDANI, J.I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Tese de Mestrado UFRJ, 110 p., 1984.
 BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. Plant & Soil, 90:258-292, 1986.
 LOUREIRO, M.F. & BODDEY, R.M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero *Brachiaria*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 23: 1343-1353, 1988.
 MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, 55:417-430, 1983.
 OLIVEIRA, O.C.; OLIVEIRA, I.P.; FERREIRA, E.; ALVES, B.J.R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C.H.B.; VILELA, L. BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro. In: Anais III Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, 110-117, 1997.
 ROSS, I.L.; YOUNES, A.; HARVEY, P.R.; ACHOUAK, W. & RYDER, M.H. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related *Pseudomonas* isolated from wheat field soils in South Australia. Applied and Environmental Microbiology, 66: 1609-1616, 2000.
 SOUTO, S.M. Variação estacional da fixação de N, e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Tese de Doutorado UFRJ, 268p., 1982.
 VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B. & MACEDO, M.C.M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: Anais do 17º Simpósio sobre manejo da pastagem: a planta forrageira no sistema de produção. p.65-108, 2000.