

## **Análise da Diversidade de Comunidades Microbianas na Rizosfera de Genótipos de Sorgo Contrastantes quanto à Tolerância ao Alumínio**



ISSN 1679-0154

Agosto, 2014

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 94**

## **Análise da Diversidade de Comunidades Microbianas na Rizosfera de Genótipos de Sorgo Contrastantes quanto à Tolerância ao Alumínio**

Eliane Aparecida Gomes  
Christiane Abreu de Oliveira  
Cláudia Teixeira Guimarães  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Ubiana de Cássia Silva  
Lucas Fernandes Silva  
Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)

E-mail: [cnpms.sac@embrapa.br](mailto:cnpms.sac@embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da

Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo

Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Eliane A. Gomes e Google imagens

**1ª edição**

1ª impressão (2014): on line

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Milho e Sorgo**

---

Análise da diversidade de comunidades microbianas na rizosfera de genótipos de sorgo contrastantes quanto à tolerância ao alumínio / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

29 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 94).

1. População microbiana. 2. Ácido orgânico. 4. Solo ácido. 4. *Sorghum bicolor*. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

---

© Embrapa 2014

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados e Discussão</b> .....	14
<b>Conclusões</b> .....	22
<b>Agradecimentos</b> .....	23
<b>Referências</b> .....	23

# **Análise da Diversidade de Comunidades Microbianas na Rizosfera de Genótipos de Sorgo Contrastantes quanto à Tolerância ao Alumínio**

***Eliane Aparecida Gomes<sup>1</sup>***

***Christiane Abreu de Oliveira<sup>2</sup>***

***Cláudia Teixeira Guimarães<sup>3</sup>***

***Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>4</sup>***

***Ubiana de Cássia Silva<sup>5</sup>***

***Lucas Fernandes Silva<sup>6</sup>***

***Ivanildo Evódio Marriel<sup>7</sup>***

## **Resumo**

A exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes é um dos principais mecanismos de tolerância das plantas ao alumínio (Al) no solo. Como os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas podem atuar diretamente na comunidade microbiana do solo, estimulando seu crescimento e modificando sua densidade, composição e atividade, esse efeito deve ser avaliado em detalhes, em genótipos que apresentem exsudação diferencial desses componentes cultivado em solos com altos níveis de Al.

<sup>1</sup>Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.aparecida@embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

<sup>4</sup>Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

<sup>5</sup>Estudante de doutorado Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, ubiana@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Estudante de mestrado Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG, lucasfernandes\_silva@hotmail.com

<sup>7</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

\*E.A. Gomes (autor correspondente): eliane.a.gomes@embrapa.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da alta saturação de Al no solo na diversidade da população microbiana na rizosfera de genótipos de sorgo contrastantes quanto à exsudação de ácidos orgânicos e à tolerância ao Al. A análise metabólica realizada a partir da técnica das placas de Biolog mostrou que a atividade microbiana varia de acordo com o genótipo e com a saturação de Al no solo. Na alta saturação de Al, o genótipo SC566 apresentou menor atividade metabólica em comparação com os demais genótipos. Já na média saturação, o genótipo ATF13 apresentou menor atividade a partir de 48 h, enquanto, na baixa saturação, os genótipos BR007 e ATF14 apresentaram menor atividade de utilização dos substratos que os demais durante o período de incubação das amostras. O genótipo SC566 é tolerante ao Al e apresenta altas taxas de exsudação de ácidos orgânicos em solos ácidos. No entanto, esta maior exsudação não acarretou aumento na diversidade das bactérias presentes na rizosfera nas condições de estudo. Portanto, não foi observada correlação entre os resultados de análise por Biolog e os genótipos avaliados ou o teor de Al no solo. Por outro lado, a análise do DGGE indicou que o índice de saturação de Al no solo foi o fator determinante da diferença na estrutura da população bacteriana total da rizosfera, e que a combinação das técnicas de Biolog e DGGE é importante na análise da diversidade microbiana, pois permite a avaliação de grupos bacterianos cultiváveis e não cultiváveis em meio de cultura.

**Termos para indexação:** Ácidos orgânicos, solo ácido, comunidade microbiana, Biolog, DGGE.

# Assessment of the Microbial Community in the Rhizosphere of Sorghum Genotypes Contrasting to Aluminum Tolerance

---

*Eliane Aparecida Gomes<sup>1</sup>*

*Christiane Abreu de Oliveira<sup>2</sup>*

*Cláudia Teixeira Guimarães<sup>3</sup>*

*Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>4</sup>*

*Ubiana de Cássia Silva<sup>5</sup>*

*Lucas Fernandes Silva<sup>6</sup>*

*Ivanildo Evódio Marrie<sup>7</sup>*

## Abstract

The exudation of organic acids by the roots is the major mechanism of aluminum (Al) tolerance in plants. Organic acids exuded act stimulating growth and changing density, composition and activity of the soil microbial community. This effect should be evaluated in detail in genotypes with differential exudation of these components cultivated in soils of high levels of Al. The objective of this study was to evaluate the impact of high Al saturation on the diversity of microbial populations in the rhizosphere of sorghum genotypes contrasting to exudation of organic acids and tolerance to Al. Metabolic analysis using Biolog plates showed that the microbial activity changed according to the genotype and Al saturation. Genotype SC566 showed lower metabolic activity at high Al saturation comparing to the other genotypes. Genotypes ATF13 and BR007/ATF14 showed low activity at Al intermediate and Al low saturation, respectively. The genotype SC566 is tolerant to Al and it presents high rates of exudation of organic acids in the acid soils. However, this increased exudation

did not increase the diversity of bacteria in the rhizosphere under the conditions of study. Therefore, no correlation was observed between the results of Biolog and genotypes or the Al saturation. On the other hand, the DGGE analysis showed that the Al saturation changed the bacterial population diversity and that the combination of Biolog and DGGE techniques is important to the analysis of microbial diversity as it allows the evaluation of cultivable and non-cultivable bacterial groups.

**Index terms:** Organic acids, acid soil, microbial community, Biolog, DGGE.

## Introdução

Os solos do Cerrado brasileiro geralmente são altamente intemperizados, ácidos e com baixa fertilidade, fazendo com que as plantas cultivadas nestes ambientes sejam expostas a várias formas de estresses durante seu ciclo de crescimento (BALIGAR et al., 2001). A toxidez de alumínio (Al) é um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade agrícola nos solos ácidos, que ocupam aproximadamente 30% das terras potencialmente agrícolas do mundo (UEXKÜLL; MUTERT, 1995) e 68% do território brasileiro (BAHIA FILHO et al., 1997). O Al inibe o crescimento do sistema radicular (RYAN et al., 1992; KOCHIAN et al., 2004), reduzindo o volume de solo explorado pelas plantas, o que resulta em limitações na absorção de água e nutrientes, com conseqüente decréscimo na produtividade das culturas (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

As plantas possuem diferentes mecanismos de tolerância à presença de níveis tóxicos de Al no solo e vários estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de compreender as

bases genéticas e fisiológicas desta tolerância em diferentes espécies (KOCHIAN et al., 2004; CANIATO et al., 2014; MARON et al., 2013; ZHOU et al., 2014). Dentre estes, a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes tem sido descrito como o principal mecanismo de tolerância (LIAO et al., 2006). Os ácidos orgânicos, como citrato e malato, com massa molecular reduzida, são capazes de formar complexos estáveis com o  $Al^{3+}$  presente na rizosfera, reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (PIÑEROS et al., 2002; KOCHIAN et al., 2004).

Em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), a tolerância ao Al é controlada por um gene de efeito maior localizado na porção terminal do cromossomo 3, *Alt<sub>SB</sub>* (MAGALHÃES et al., 2007). O gene *Alt<sub>SB</sub>* é um transportador de citrato ativado por Al, membro de uma família de *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (família MATE), responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo (MAGALHÃES et al., 2007). Linhagens de sorgo já foram caracterizadas quanto à expressão deste gene, tolerância ao Al e exsudação de ácidos orgânicos, indicando substancial diversidade para estas características, dependendo das raças e origem geográfica das populações (CANIATO et al., 2007; 2011).

Como os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas podem atuar diretamente na comunidade microbiana do solo, estimulando seu crescimento e modificando sua densidade, composição e atividade, esse efeito deve ser avaliado em detalhes, em genótipos que apresentem exsudação diferencial desses componentes (YANG et al., 2012). Isso ocorre porque os exsudatos podem agir como mensageiros que estimulam as interações entre as plantas e os microrganismos, além de servir

como nutrientes para o metabolismo microbiano (MARSCHNER et al., 2006, 2011). Assim sendo, a composição e a atividade da microflora da rizosfera podem se alterar em função de mudanças nos padrões de exsudatos das raízes, conforme a idade e o genótipo das plantas.

Neste trabalho, genótipos de sorgo, previamente caracterizados como tolerantes e susceptíveis ao Al (CANIATO et al., 2007, 2011; MAGALHÃES et al., 2007), foram cultivados em solos com alta e baixa saturação de Al. O objetivo foi verificar o impacto da saturação de Al no solo na diversidade da população microbiana na rizosfera de genótipos de sorgo contrastantes quanto à exsudação de ácidos orgânicos e à tolerância ao Al.

## **Material e Métodos**

### **Experimento em Casa de Vegetação**

O experimento foi realizado sob condições controladas em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Escuro distrófico, coletado sob vegetação de Cerrado na profundidade de 0-20 cm. O solo foi peneirado, homogeneizado e a fertilidade foi corrigida quanto aos níveis recomendados de N, P, K, S e micronutrientes de acordo com a análise química inicial. O solo original coletado, cuja saturação de Al era 26,7% e não tinha sido corrigida, foi considerado como alta saturação. Este solo foi corrigido com  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgO}$ , resultando em um solo com moderada saturação (18,9%), e com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ , resultando em baixa saturação de Al (7,1%). As características químicas dos solos estão descritas na Tabela 1.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 12 tratamentos e três repetições, resultando em 36 parcelas. Foram utilizados três tipos de solo: alta (AS),

**Tabela 1.** Propriedades químicas de um Latossolo Vermelho Escuro com alta, média e baixa saturação de Al

SOLO	pH H <sub>2</sub> O	P -mg dm <sup>-3</sup>	K dm <sup>-3</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al -cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	SB	(t)	(T)	V %	m	MO dag kg <sup>-1</sup>	P-rem mg L <sup>-1</sup>
Alta saturação	4,89	7,6	67	1,8	0,17	0,78	8	2,14	2,92	10,14	21,1	26,7	4,21	19
Média saturação	5,37	113	203	1,82	0,19	0,59	8,7	2,53	3,12	11,23	22,5	18,9	4,35	23,6
Baixa saturação	4,22	23,1	143	4,06	0,69	0,39	8,2	5,12	5,51	13,32	38,4	7,1	4,48	18,6

pH em água - Relação 1:2,5

P - K - Extrator Mehlich 1  
7,0

Ca -Mg -Al - Extrator: KCl - 1mol/L

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5mol/L - pH 7,0

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH

V = Índice de Saturação de Bases

m = Índice de Saturação de Alumínio

Mat. Org. (MO) = C.Org x 1,724 -Walkley-Black

P-rem = Fósforo Remanescente

moderada (MS) e baixa saturação de Al (BS), e quatro genótipos de sorgo: SC566 e ATF14 tolerantes ao Al e BR007 e ATF13 susceptíveis ao Al (CANIATO et al., 2011), cultivados em vasos de 5 kg. A semeadura foi realizada com cinco sementes de sorgo e o desbaste, efetuado aos 15 dias após a semeadura, deixando-se uma planta por vaso.

Durante o florescimento, as plantas foram coletadas com o sistema radicular inteiro e as raízes foram lavadas para retirar o excesso de solo. Após a lavagem, 5 g das raízes mais finas e centrais de cada amostra, com solo rizosférico aderido, foram retiradas, adicionadas a 50 mL de pirofosfato de sódio 0,1% e mantidas sob agitação durante 30 minutos em homogeneizador horizontal. Após a centrifugação de 5 mL desta solução a 4.000 rpm por 15 min, procedeu-se à etapa de análise da diversidade metabólica e à extração de DNA.

## **Diversidade Metabólica - Biolog**

Para determinação da diversidade funcional microbiana foram utilizadas placas denominadas Ecoplates® (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), que apresentam três grupos iguais de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), cavidades controle sem substrato e violeta tetrazol como corante indicador do potencial redox. Em cada poço das placas de Biolog, foram inoculados 120 µL da solução do solo rizosférico em pirofosfato de sódio obtida na etapa anterior e as placas foram incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. A leitura das placas, ou seja, o desenvolvimento de cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos, foi realizada por um espectrofotômetro leitor de placas (Labstems, MultSkan, MS,

USA) em 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A leitura de 72 horas foi utilizada para cálculo dos componentes da diversidade funcional por representar o tempo médio entre as leituras realizadas. Esses dados foram utilizados para se estimar a riqueza de substratos (S-atividade), o índice de diversidade de Shannon (H) e a distribuição dos indivíduos entre as espécies (E-equitabilidade) de acordo com Zak et al. (1994). O valor S refere-se ao número de diferentes substratos que podem ser utilizados pela comunidade microbiana, enquanto H compreende tanto a riqueza de substratos como a intensidade com que as fontes de C são utilizadas pela microbiota do solo.

Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se a média das leituras dos 31 substratos de cada amostra e repetição por AWCD (*Average Well Colour Development*), por meio da divisão da atividade de utilização dos substratos – leitura em absorbância (nm) da cor desenvolvida – em cada cavidade pelo valor médio da leitura da placa inteira (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores acima de zero foram considerados como reação positiva e evidenciam a utilização de substratos, e os valores negativos, a ausência de uso do substrato. Os resultados de S, H e E foram submetidos ao teste Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

## **Extração de DNA do Solo**

Para a extração de DNA, a solução de solo rizosférico em pirofosfato de sódio obtida anteriormente foi centrifugada por 30 min a 10000 rpm. O sedimento de solo foi ressuspensionado em 1,8 mL de água ultrapura autoclavada e transferido para tubos de Fast prep do FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, USA) e o DNA foi extraído do solo de acordo com as recomendações dos fabricantes.

### **Amplificação do DNA e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

Para a amplificação do DNA da população de bactérias foram utilizados os *primers* F968 e R1401 (NÜBEL et al., 1996), que amplificam uma região do gene 16SrRNA de procariotos.

Para o DGGE, uma sequência CG-grampo de 40 pares de bases foi adicionada ao *primer* F968. Amostras de PCR foram carregadas em gel de 6% de poliacrilamida em tampão TAE 0,5X (Tris-acetate 20 mM e EDTA 0,5 mM), contendo um gradiente de 45 a 70% de agentes desnaturantes (ureia e formamida deionizada). A separação dos fragmentos amplificados por PCR foi feita utilizando o equipamento DCode™ Detection Mutation System (Bio-Rad, California, USA) de acordo com o protocolo estabelecido por Muyzer et al. (1998). O gel foi submetido à eletroforese durante 16 horas a 60 °C e 75V e corado em solução de Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) diluída 3.300 x em 0,1 M NaCl por 30 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

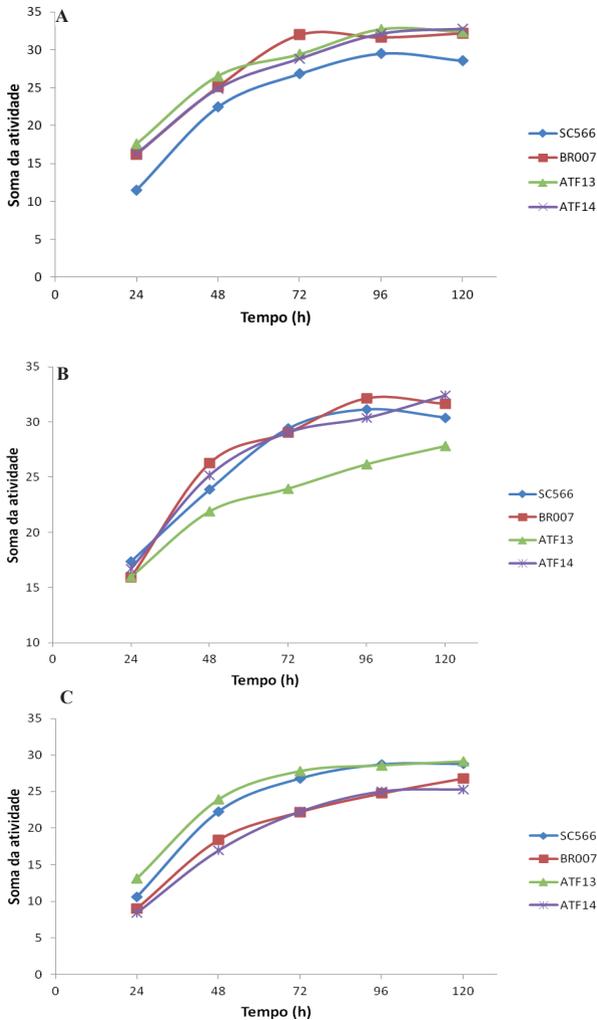
## **Análise de Géis de DGGE**

Os perfis de bandas gerados pelo DGGE foram analisados pelo programa BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Belgium). As imagens digitalizadas foram convertidas e normalizadas usando 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA). Os padrões foram integrados, a similaridade foi calculada utilizando correlação de Pearson (HÄNE et al., 1993) e a para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

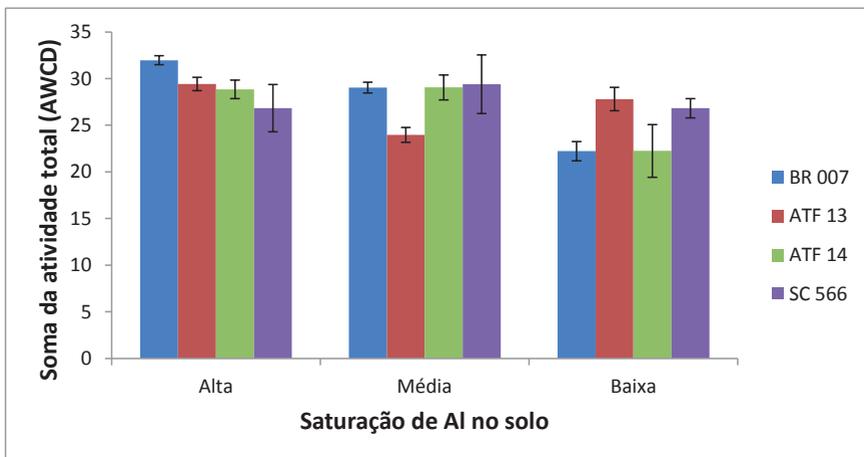
## **Resultados e Discussão**

### **Atividade Metabólica e Índice de Diversidade**

A análise das placas de Biolog mostrou que a utilização dos substratos medida pelo desenvolvimento de cor (expressa em AWCD) variou ao longo do tempo de incubação para cada genótipo nos diferentes níveis de saturação de Al no solo (Figuras 1 e 2). Na alta saturação de Al, o genótipo SC566 apresentou menor atividade metabólica em comparação com os demais genótipos, a partir de 24 h de incubação. Na média saturação, ATF13 apresentou menor atividade a partir de 48 h, enquanto na baixa saturação, BR007 e ATF14 apresentaram menor atividade de utilização dos substratos que os demais durante o período de incubação das amostras (Figuras 1 e 2). Esta mesma tendência foi observada quando a atividade microbiana foi avaliada após 72 h de incubação, que corresponde ao pico máximo de atividade dos microrganismos neste experimento (Tabela 2).



**Figura 1.** Soma da atividade total/AWCD (leitura em 590 nm) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico de genótipos de sorgo cultivados em solos com alta (A), média (B) e baixa saturação de Al (C) nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.



**Figura 2.** Comportamento dos genótipos de sorgo nas diferentes saturações de Al no solo avaliada pela soma da atividade total/AWCD (leitura em 590 nm) de utilização de fontes de carbono pelo extrato microbiano obtido da amostra de solo rizosférico de cada genótipo, incubado por 72 horas. Barras de erros indicam o erro padrão da média de três repetições.

**Tabela 2.** Atividade de utilização de substratos (S), diversidade metabólica (índice de Shannon, H) e equitabilidade (E) com base na utilização de fontes de C presentes nas microplacas Biolog EcoPlate™, após 72 horas de incubação a 28 °C, pelas comunidades bacterianas em um Latossolo Vermelho Escuro com alta (AS), média (MS) e baixa saturação de Al (BS).

Sorgo / tipo de solo	S-Atividade	H-Shannon	E-Equitabilidade
BR007 - BS	22,2a*	3,35a	0,976a
ATF14 - BS	22,2a	3,36a	0,981a
ATF13 - MS	23,9a	3,39b	0,988b
SC566 - AS	26,8b	3,37a	0,982a
SC566 - BS	26,8b	3,39b	0,988b
ATF13 - BS	27,8b	3,41b	0,993b
ATF14 - AS	28,8b	3,41b	0,994b
BR007 - MS	29,0b	3,41b	0,994b
ATF14 - MS	29,0b	3,41b	0,994b
SC566 - MS	29,3b	3,40b	0,992b
ATF13 - AS	29,4b	3,41b	0,993b
BR007 - AS	31,9b	3,40b	0,993b

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

O genótipo SC566 é tolerante ao Al e apresenta altas taxas de exsudação de ácidos orgânicos em solos ácidos (CANIATO et al., 2007). No entanto, esta maior exsudação não acarretou aumento na distribuição e diversidade das bactérias presentes na rizosfera deste genótipo, uma vez que este apresentou os menores valores de atividade de utilização de substratos (S) para as condições de cultivo. Além disso, entre os genótipos que apresentaram os menores índices para todas as variáveis avaliadas (atividade, equitabilidade e índice de Shannon – Tabela 2) existem tolerantes e susceptíveis ao Al cultivados

em solos com alta, média ou baixa saturação de Al. Portanto, não foi observada correlação entre o genótipo, a capacidade de exsudação de ácidos orgânicos e o teor de saturação de Al no solo e os índices avaliados. Segundo Marschner et al. (2006), a alta taxa de liberação de carbono orgânico pelas raízes favorece o aumento da diversidade de microrganismos na rizosfera, especialmente de bactérias, em relação ao restante do solo. No entanto, nos nossos resultados esse efeito não foi observado, uma vez que o genótipo SC566 sendo tolerante ao Al e conseqüentemente com maior taxa de exsudação deveria ter favorecido uma maior diversidade de bactérias em situação de estresse de Al. O índice de diversidade de Shannon (H) indica maior diversidade em amostras com maior variedade de utilização de diferentes fontes de carbono. A escala de H para as placas EcoPlate varia de 0 a 4 (ZAK et al., 1994). Na rizosfera dos genótipos estudados, as amostras coletadas apresentaram valores de H próximos de três, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos (Tabela 2).

A avaliação da diversidade de bactérias (H) em condições de alta saturação de Al no solo também apresentou a mesma tendência que a avaliação do índice de atividade dos microrganismos, ou seja, o genótipo SC566 apresentou a menor diversidade de bactérias em comparação com os demais genótipos (Tabela 2). Isto significa que as bactérias da rizosfera deste genótipo utilizaram menos substratos, demonstrado no índice de diversidade (H) e com menor intensidade de utilização, demonstrada pela avaliação da atividade relacionada ao desenvolvimento de cor. Portanto, não foi observada associação entre os valores de diversidade de Shannon entre genótipos e níveis de saturação de Al no solo. Resultados

semelhantes foram observados para a equitabilidade que avalia a distribuição dos indivíduos entre as espécies (Tabela 2).

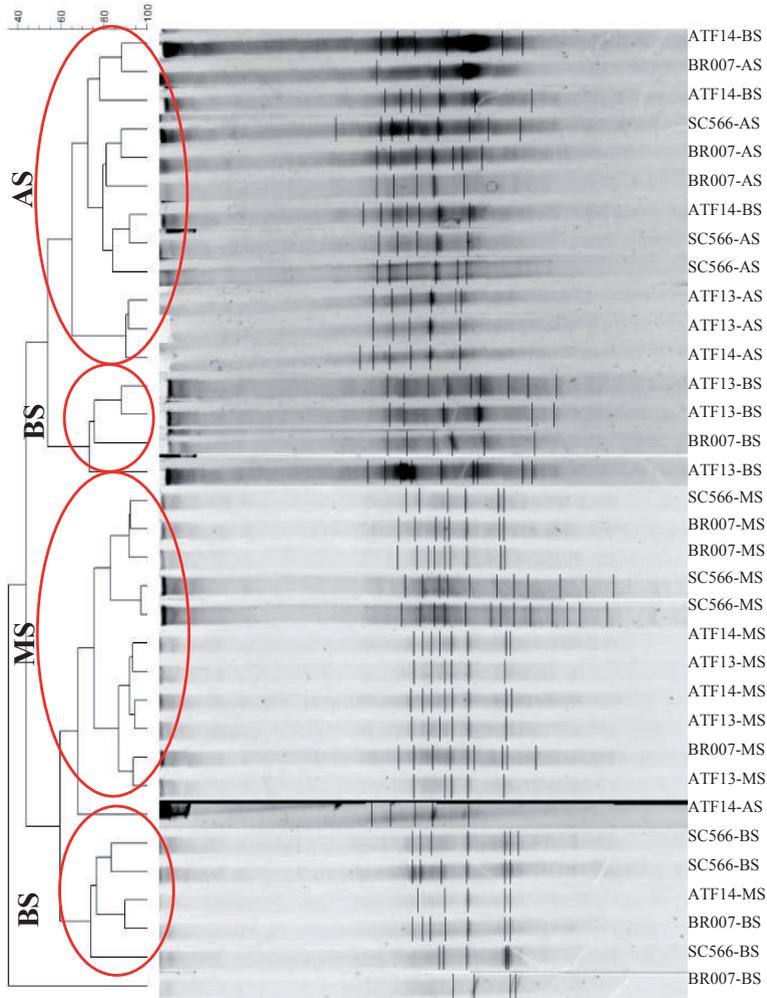
Dentro deste contexto, alguns trabalhos mostraram que a interação entre microrganismos e plantas varia ao longo do eixo da raiz, pois existe um gradiente de carbono que é exsudado nas diferentes zonas de crescimento da raiz (NGUYEN; GUCKERT, 2001; MARSCHNER et al., 2011). Desse modo, os microrganismos colonizam preferencialmente a zona imediatamente acima da ponta da raiz e a zona de alongação distal, levando a uma maior diversidade da microbiota nesta região, pois a rápida taxa de crescimento da ponta da raiz é limitante para o crescimento dos microrganismos (MARSCHNER et al., 2011). Portanto, em trabalhos futuros, análises mais detalhadas de diferentes partes da raiz podem ser feitas levando em conta a distribuição espacial e temporal da comunidade microbiana na rizosfera dos genótipos de sorgo contrastantes para tolerância ao Al.

## **Análise do Perfil Genético por DGGE**

Não foram observadas diferenças na diversidade bacteriana da rizosfera de linhagens de sorgo tolerantes e sensíveis ao Al na análise do DGGE (Figura 3). No entanto, foi observado um agrupamento dos genótipos de acordo com o teor de saturação de Al no solo, indicando que o índice de saturação de Al no solo foi o fator determinante da diferença na estrutura da população bacteriana total da rizosfera. De uma maneira geral, foram obtidos quatro grupos no dendrograma: o grupo I com a maioria dos genótipos cultivados em solos com alta saturação de Al, além do genótipo ATF14 cultivado em solo com baixa saturação. Os genótipos cultivados em baixa saturação

de Al foram reunidos nos grupos II e IV e todos os genótipos cultivados em solos com teor médio de saturação de Al ficaram reunidos no grupo III. Isso indica que podem ter ocorrido mudanças nas densidades populacionais de grupos específicos metabolicamente ativos independentemente da exsudação diferencial dos genótipos, mas dependentemente do teor de Al no solo.

Essa ausência de diferença da comunidade bacteriana entre os genótipos observada na análise por DGGE também foi encontrada por Mota et al. (2008) ao estudar a diversidade e a dinâmica de comunidades bacterianas na rizosfera de cultivares de milho tolerantes e sensíveis ao Al cultivado em solo de Cerrado. Neste trabalho, a análise do perfil de DGGE mostrou que as bactérias foram mais afetadas pelo estresse de Al no solo que pela linhagem de milho (sensível ou tolerante ao Al). Além disso, foram observadas diferenças na composição da comunidade bacteriana em dois períodos de coleta, aos 30 e 60 dias após o plantio.



**Figura 3.** Perfis de DGGE das comunidades bacterianas do solo rizosférico das linhagens de sorgo contrastantes para tolerância ao Al em solos com alta (AS), média (MS) e baixa saturação de Al (BS). O dendrograma foi construído pelo coeficiente de similaridade, correlação de Pearson e pelo método de UPGMA.

Como o DGGE da região rDNA 16S avalia a comunidade bacteriana predominante existente na rizosfera, metabolicamente ativa ou não (PROSSER, 2002), mudanças no perfil metabólico de cada espécie podem ser responsáveis pelas diferenças constatadas entre genótipos tolerantes ou susceptíveis usando o EcoPlate. Entretanto, o uso de EcoPlate também tem sido questionado por gerar resultados apenas da fração da comunidade representada pelos microrganismos de crescimento mais rápido e cultiváveis, o que reflete o potencial metabólico e não a diversidade *in situ* (NANNIPIERI et al., 2003; KIRK et al., 2004). Portanto, os resultados encontrados ressaltam a importância da utilização conjunta das duas técnicas, o que também foi sugerido por outros autores (KIRK et al., 2004), uma vez que, por meio do DGGE, foi possível avaliar grupos bacterianos não cultiváveis em meio de cultura por Biolog EcoPlate, o que possibilita maior entendimento da interação microrganismo-planta. Estudos futuros com uso de iniciadores específicos de gêneros ou espécies de bactérias poderão ser realizados para o refinamento da análise de DGGE.

## Conclusões

Não foi observada correlação entre o genótipo, a capacidade de exsudação de ácidos orgânicos e o teor de saturação de Al no solo e os índices metabólicos avaliados por Biolog.

A análise do DGGE indicou que o índice de saturação de Al no solo foi o fator determinante da diferença na estrutura da população bacteriana total da rizosfera.

A combinação das técnicas de Biolog e DGGE é importante na análise da diversidade microbiana, pois permite a avaliação de

grupos bacterianos cultiváveis e não cultiváveis em meio de cultura.

## Agradecimentos

FAPEMIG, CNPq e Embrapa pelo apoio financeiro.

## Referências

BAHIA FILHO, A. F. C.; MAGNAVACA, R.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C. Identification, utilization and economic impact of maize tolerant to low levels of phosphorus and toxic levels of exchangeable aluminum in Brazilian soils. In: MONIZ, A. C.; FURLANI, A. M. C.; SCHAFFERT, R. E.; FAGERIA, N. K.; ROSOLEM, C. A.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Plant-soils interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production**. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 59-72.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K.; HE, Z. L. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; HAMBLIN, M.; BILLOT, C.; RAMI, J.-F.; HUFNAGEL, B.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J.; GARCIA, A. A. F.; HASH, C. T.; RAMU, P.; MITCHELL, S.; KRESOVICH, S.; OLIVEIRA, A. C.; AVELLAR, G.; BORÉM, A.; GLASZMANN, J.-C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e20830, 2011.

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHÃES,

J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, p. 863-876, 2007.

CANIATO, F. F.; HAMBLIN, M. T.; GUIMARAES, C. T.; ZHANG, Z.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. Association mapping provides insights into the origin and the fine structure of the sorghum aluminum tolerance locus, AltSB. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. e87438, 2014.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-solo-carbon-source-utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

HÄNE, B. G.; JÄGER, K.; DREXLER, H. G. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 14, p. 967-972, 1993.

HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 394, p. 431, 1998.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

LIAO, H.; WAN, H.; SHAFF, J.; WANG, X.; YAN, X.; KOCHIAN, L. V. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance: exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, p. 674-684, 2006.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. G.; GUIMARAES, C. T.; KIRST, M.; ALBERT, P. S.; BIRCHLER, J. A.; BRADBURY, P. J.; BUCKLER, E. S.; COLUCCIO, A. E.; DANILOVA, T. V.; KUDRNA, D.; MAGALHAES, J. V.; PINEROS, M. A.; SCHATZ, M. C.; WING, R. A.; KOCHIAN, L. V. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 5241-5246, 2013.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 883-894, 2011.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL Z. Rhizosphere properties of Poacea genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.

MARTIN, R. B. Aluminum speciation in biology. In: CHADWICK, D. J.; WHELAN, L. (Ed.). **Aluminum in biology and medicine**. New York: John Wiley and Sons, 1992. p. 5-25.

MOTA, F. F.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed cerrado soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 805-814, 2008.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: ALCHUCK, G. A.; BRUIJN, F. J. de; HEAD, I. M.; AKKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D. van (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NGUYEN, C.; GUCKERT, A. Short-term utilisation of  $^{14}\text{C}(\text{U})$  glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 53-60, 2001.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

PIÑEROS, M.; MAGALHÃES, J.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 29, p. 1194-1206, 2002.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 244, p. 9-17, 2002.

RYAN, P. R.; SHAFF, J. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminium toxicity in roots: correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminium-sensitive and aluminium-tolerant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, p. 1193-1200, 1992.

UEXKÜLL, H. R. von; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMET, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 5-19.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YANG, T.; LIU, G.; LI, Y.; ZHU, S.; ZOU, A.; QI, J.; YANG, Y. Rhizosphere microbial communities and organic acids secreted by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean in acid soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, p. 97-108, 2012.

ZAK, J. C.; WILLING, M. R.; MOOREHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

ZHOU, G.; PEREIRA, J. F.; DELHAIZE, E.; ZHOU, M.; MAGALHAES, J. V.; RYAN, P. R. Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes SbMATE and FRD3. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 65, n. 9, p. 2381-2390, 2014.

