

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Aline Aparecida Camargo das Neves;¹ Wellington Luiz Araujo²

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: aacn.bio@gmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes e-mail: wlaraujo@esalq.usp.br²

Área do conhecimento: Ecologia Microbiana

Palavras chaves: transgênico, cana-de-açúcar, comunidade microbiana.

INTRODUÇÃO

Plantas geneticamente modificadas (PGMs) foram desenvolvidas a fim de suprir a necessidade em aumentar a produtividade agrícola e os investimentos biotecnológicos no cultivo de espécies de interesse, devido ao desenvolvimento de técnicas de engenharia genética e o aumento populacional. Estas plantas são geneticamente modificadas pela introdução de genes bacterianos, que conferem maior resistência a patógenos, pragas, tolerância a fatores bióticos e abióticos e maior produção de moléculas de interesse, que possivelmente podem beneficiar a planta. Entretanto, este desenvolvimento vem aumentando a necessidade de estudos para a avaliação dos possíveis impactos que estas plantas podem ocasionar ao ambiente, incluindo sobre a comunidade microbiana associada.

A maior parte do funcionamento do ecossistema terrestre é determinada por microrganismos, os quais totalizam 80% do total da biomassa do solo, sendo eles responsáveis por importantes funções, como: decomposição e ciclo de nutrientes (BRUINSMA *et al.* 2003).

Bactérias associadas às plantas, entre elas as que colonizam a rizosfera, podem conferir vantagens ao hospedeiro, aumentando a disponibilidade de nutrientes (p.e. solubilizadoras de fosfato), controlando patógenos, produzindo agentes antimicrobianos, inibindo fungos patogênicos, ou melhorando seu desempenho em condições adversas (HALLMANN *et al.*, 1997) além de poder influenciar o crescimento vegetal de plantas cultivadas posteriormente na mesma área (BEVER *et al.*, 1997).

Segundo KENNEDY (1998) a rizosfera, zona de contato do solo com a raiz da planta, é a principal zona de interação entre a planta e a comunidade microbiana do solo, pois os exsudados liberados pelas raízes das plantas afetam a distribuição dos microrganismos colonizadores. Dessa forma, fatores que mudam a composição e quantidade dos exsudados radiculares podem ser impactantes sobre a comunidade bacteriana. Desta forma, estudar esta interação é de grande interesse, pois pouco se conhece sobre a relação diversidade/função de microrganismos e plantas geneticamente modificadas.

O conhecimento da comunidade microbiana do solo além de fundamental para o levantamento taxonômico pode levar ao conhecimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos sendo dessa forma, importantes para o entendimento das interações microbiológicas no ambiente, bem como com potencial aplicação biotecnológica (RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004).

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo e possui uma considerável influência sobre o mercado internacional. Este tipo de cultivo é relatado desde o período da colonização, sendo o principal produto agrícola do país. Tendo em vista a importância desta cultura agrícola para o país e o fato da planta permanecer no

campo por até 4 anos, se faz necessário avaliar a interação de cana-de-açúcar geneticamente modificada e a comunidade microbiana associada. Dessa forma, a diversidade de bactérias da rizosfera de cana-de-açúcar foi avaliada por meio da análise do gene *gyrB*, e capacidade de produzir enzimas, solubilizar fosfato e inibir fungos patogênicos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste foi estudar a diversidade genética e fisiológica da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar transgênica e convencional e avaliar os efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade bacteriana cultivável de cana-de-açúcar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias da rizosfera de cana-de-açúcar e condições de crescimento: Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram obtidos de cana-de-açúcar (cv. SP80-1842) plantadas em abril de 2004 em campo experimental localizado em Piracicaba, Brasil (22°41'_S 47°33'_W). Foram avaliados 3 épocas de coleta: A) fevereiro/2005; B) setembro/2005 e C) outubro/2006, e 3 tratamentos: planta convencional tratada com capina manual (CV), planta transgênica (gene de resistência ao herbicida imazapir) tratada com capina manual (TC) e planta transgênica tratada com herbicida (TH) As bactérias são mantidas a -80°C em glicerol 20% (vol/vol).

Analises Fisiológicas

Solubilização de fosfato mineral: Os isolados foram semeados em meio de cultura contendo (g l⁻¹) agar, 15; glicose, 10; NH₄Cl, 5; NaCl, 1; MgSO₄.7H₂O, 1; Ca₃(HPO₄)₂, 08; pH 7,2) e incubados a 28 °C por 48h. A solubilização do fosfato mineral foi caracterizada por um halo incolor em torno da colônia.

Produção de enzima endoglicanase: Os isolados foram semeados em meio de cultura contendo 0,2% carboximetilcelulose, 0,5% de triptona, e incubados a 28°C por 48 h. Após crescimento bacteriano, foram adicionados 5 mL de vermelho congo (1 mg ml⁻¹) por 30 min, seguido de uma lavagem superficial com de solução de NaCl (4M). A presença de um halo incolor indicou a capacidade da bactéria em produzir endoglicanase.

Produção de compostos antifúngicos: A inibição de *Fusarium oxysporum* (isolado de *Sacharum*. sp.) foi determinada pelo método de pareamento. Para isso, os isolados bacterianos foram semeados juntamente com o fungo em meio BDA (Merck KGaA, Germany). A zona de inibição foi mensurada apos 7 dias em incubação a 28°C. Como controle, o fungo foi inoculado sobre meio de cultura sem a bactéria da rizosfera.

Análise da diversidade genética: A diversidade bacteriana foi avaliada por meio da técnica de PCR-RFLP do gene *gyrB*. Para isso, este gene foi amplificado utilizando os primers Up-1 (5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA(T/C) GC(T/C/A/G) GG(T/C/A/G) GG(T/C/A/G) AA(A/G) TT(T/C) A-3') e Up-2r (5'-AGC AGG GTA CGG ATG TEC GAG CC(A/G) TC(T/C/A/G) AC(A/G) TC(T/C/A/G) GC(A/G) TC(T/C/A/G) GTC AT-3'). A reação foi realizada em um volume final de 50µl contendo 1µl de DNA da amostra, 200µM de dNTPs, 1 mM de cada primer, 50mM de MgCl₂ e 2.5 U de Taq DNA Polimerase. O programa teve o total de 30 ciclos de amplificação. A fita de DNA foi desnaturada a 94° durante 1 minuto, os primers foram anelados a 60° durante 1 minuto e a extensão dos primers ocorreu a 72° por 1 minuto. (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1996). O produto da PCR foi clivado com a enzimas de restrição *BsuRI* para a obtenção de haplotipos para então serem seqüenciados e identificados por meio da ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank. Para o

seqüenciamento, o produto do PCR foi purificado pelo método de PEG. Para isso, foram adicionados à reação de PCR 50 µl da solução PEG (10g PEG 8000, 7,3g NaCl, 45mL dH₂O), encubado por 15 minutos a 37°C e centrifugado a 14000 G por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, 125 µl de etanol 80% gelado foi adicionada e esta solução foi incubada por 1 min a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 15 min, o sobrenadante descartado e o DNA seco a 37°C por aproximadamente 15 minutos. Após a secagem do álcool, o produto de PCR foi ressuscitado em 20 µl de tampão TE ou água Mili-Q e deixado por 18 horas a 4°C.

As amostras purificadas foram seqüenciadas no Instituto do Genoma Humano (USP) e Laboratório de Genômica (NIB/UMC). Para a identificação, as seqüências foram analisadas comparativamente via BLASTn, utilizando o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. Dessa forma, foram consideradas as seqüências que apresentaram os maiores valores de similaridade. Para auxílio na identificação dos isolados foram construídos dendogramas obtidos com base na seqüência do gene *gyrB* das bactérias da rizosfera de cana-de-açúcar. Para o alinhamento, edição e construção dos dendogramas foi utilizado o programa MEGA versão 4.0. O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor.

RESULTADOS

Diversidade fisiológica: Um total de 309 bactérias da rizosfera de cana-de-açúcar foi analisado quanto à diversidade genética e fisiológica. Para isso, o potencial para promoção de crescimento vegetal foi avaliado por meio da análise da frequência de bactérias capazes de solubilizar fosfato inorgânico, produzir endoglicanases e antagonismo ao fungo patogênico *Fusarium oxysporum* (isolado de *Saccharum* sp.). Foi avaliado o efeito das variáveis tratamento (CV, TC e TH) e época de amostragem (A, B e C).

De forma geral, a diversidade fisiológica não foi afetada significativamente pelas variáveis avaliadas, ou seja, a frequência de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato, produção de enzima endoglicanase e agente antifúngico não foi alterada pelo tratamento (CV, TC, TH). Entretanto, a frequência destas variou de acordo com a época do ano. A frequência de bactérias capazes de solubilizar fosfato inorgânico e de inibir *F. oxysporum* decresceu de A (fevereiro/2005) < B (setembro / 2005) < C (outubro / 2006), mostrando que a época do ano é uma fonte de variação maior que o trato cultural (aplicação de herbicida) e o genótipo da planta (transgenia).

Diversidade genética: Por meio da análise de PCR-RFLP do gene *gyrB*, utilizando a enzima *BsuR1* foram observados 44 haplótipos distribuídos entre os três tratamentos (CV, TC, TH). Dentre estes haplótipos, após seqüenciamento, foi observado que *Burkholderia* spp. é o gênero mais freqüente associado à rizosfera de cana-de-açúcar e em todos os tratamentos avaliados. Foi observado que algumas espécies foram exclusivas de plantas transgênicas, como *Bacillus thuringiensis*, enquanto outras espécies como *Bacillus amyloliquefaciens* e *Enterobacter cloacae*, parecem terem sido inibidas pelo herbicida, pois não foi observada na população bacteriana de plantas TH, mostrando que embora a diversidade bacteriana pode ser alterada, a diversidade fisiológica se mantém estável, não sendo alterada pelos tratamentos avaliados. Este resultado sugere que quando uma espécie é eliminada, outro grupo com características similares ocupa o nicho.

CONCLUSÃO

A diversidade fisiológica da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar não foi alterada pelo cultivo de plantas transgênicas e pelo manejo (aplicação do herbicida imazapir). Já a diversidade genética foi alterada, podendo ser sugerido que, embora a comunidade bacteriana associada se altere devido o manejo e a transgenia da planta, a atividade ecológica da comunidade parece permanecer, não alterando, desta forma, o padrão de interação com a planta hospedeira.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi financiado pela FAPESP (Proc. 01/14143-3). Também agradecemos ao programa PIBIC/CNPq/UMC pela bolsa concedida à A.A.C. Neves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bruinsma M.; Kowalchuk G. A.; van Veen J. A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.37, p.329 – 337, 2003.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- Kennedy, A.C. The rizosphere and spermophere. p. 389-407. Citado por: In D.M.Sylvia, J.F.Fuhrmann, P.G.Hartel, and D. Zuberer (ed.) Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1998.
- Ruegger M.J.S.; Tauk-tornisielo A. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, 2004.
- Yamamoto, S.; Harayama, S. PCR Amplification and Direct Sequencing of gyrB Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Starins. **American Society for Microbiology**, v. 61, p. 1104-1109, 1995.