

DIVERSIDADE DE FILOTIPOS BACTERIANOS EM LAVOURAS DE ARROZ IRRIGADO DE VIAMÃO, RS

Catiusca Reali¹; Jean-Christophe Meile²; Sabine Schorr-Galindo³; Gaziela Gonçalves Scherr⁴; Lidia Mariana Fiuza⁵

Palavras-chave: bactérias, gene 16SrRNA, DGGE.

INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do Brasil, 8.440,5 mil toneladas na safra de 2014/15, correspondendo a 68% da produção nacional. A área plantada no país diminuiu 1,2% em relação à safra anterior, porém a produção aumentou em 3,5% (Conab, 2015). Apesar disso, dados referentes a fevereiro de 2015, mostram que o Brasil importou 44,5 mil toneladas desse grão, a maior parte oriunda de países que integram o Mercosul.

O uso ostensivo do solo de lavouras pode resultar em problemas na sua manutenção e sustentabilidade (Postma-Blaauw et al., 2010). Microrganismos têm sido utilizados como importantes indicadores da qualidade do solo, pois eles são responsáveis pela disponibilidade de nutrientes, podendo auxiliar as plantas na absorção e fixação de substâncias (Choudhary et al., 2011).

Técnicas de Biologia Molecular que utilizam o gene 16SrRNA são frequentemente utilizadas para a captação de dados sobre a diversidade e dinâmica de comunidades bacterianas em ecossistemas variados, incluindo os agrícolas (Wang & He, 2012). Através de técnicas clássicas de microbiologia é possível acessar apenas 1% da comunidade de microrganismos (Zhong et al., 2012), restringindo o acesso a algumas espécies, pois essa metodologia depende da temperatura de crescimento e meios de cultura. Por outro lado, através da biologia molecular, é possível obter resultados mais consistentes sobre a dinâmica de microrganismos, indispensável em estudos ecológicos (Kušar and Avguštin, 2012).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a modificação da comunidade bacteriana da lâmina de água de lavouras de arroz irrigado ao longo do ciclo de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de água foram coletadas em duas lavouras orizícolas, cultivadas sob o sistema pré-germinado, e dois açudes utilizados como fonte de irrigação, situados no município de Viamão, Brasil. Amostragens foram realizadas em três períodos: após o preparo do solo, na fase vegetativa e na fase reprodutiva da planta, durante os anos agrícolas 2011/12 e 2012/13. Em cada lavoura uma amostra composta da lâmina de água das parcelas orizícolas (até 10 cm) foi coletada. Nos açudes foram coletadas amostras em duas estratificações (até 10 cm e de 50-100 cm). As mostras foram acondicionadas em frascos esterilizados e conservados a 4°C até serem realizadas as análises.

As amostras de água de 600mL foram filtradas em membranas de nitrocelulose (0,22µm) e estocadas a -22°C. O DNA total bacteriano foi extraído das membranas utilizando o kit *Power Soil DNA Isolation* (MoBio). A quantificação de DNA das amostras foi realizada através de espectrofotometria. Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos

¹ Mestre em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), 950 - Cristo Rei, São Leopoldo - RS, 93022-000. catiuscar@gmail.com

² Doutor em Biologia, Cirad - Agricultural Research for development.

³ Doutora em Biologia, Université Montpellier 2 (UM2).

⁴ Mestranda em Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

⁵ Doutora em Agronomia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

968f, com acréscimo do grampo GC e, 1401r (Sánchez et al., 2007), que amplifica 450pb. Para o DGGE foi confeccionado um gel de 6% de poli-acrilamida em TAE 1X (20 mM Tris, 10 mM acetato, 0.5mM EDTA pH 7.4), com gradiente desnaturante de 30 a 60%. A migração em eletroforese foi de 16h a 60°C e 85V. Após o gel foi corado em GelRed (Biotium), com ausência de luz. O gel foi imediatamente fotografado em iluminação UV através do equipamento *Carestream Gel Logic 112* e *Software Carestream Gel Logic 112 Imaging System*.

As fotografias foram analisadas com o auxílio do *Software ImageQuant TL* (GE Healthcare Life Sciences). Foram realizadas análises utilizando os Índices de Diversidade de Shannon e Simpson através do *Software Past*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1(a) apresenta a distribuição das bandas em cada fase fenológica da planta, assim como sua localização. No período de pré-plantio a riqueza de filotipos foi a mesma em todos os locais. Na fase vegetativa foi maior na camada mais profunda dos açudes e na lavoura. Durante a fase reprodutiva as lavouras apresentaram a maior abundância.

Os diagramas de Venn mostram o número de filotipos para cada local e, também, quais os filotipos comuns entre os locais e sua modificação em cada fase da cultura. Na fase de pré-plantio Figura 1(b), na fase vegetativa Figura 1(c) e na fase reprodutiva Figura 1(d).

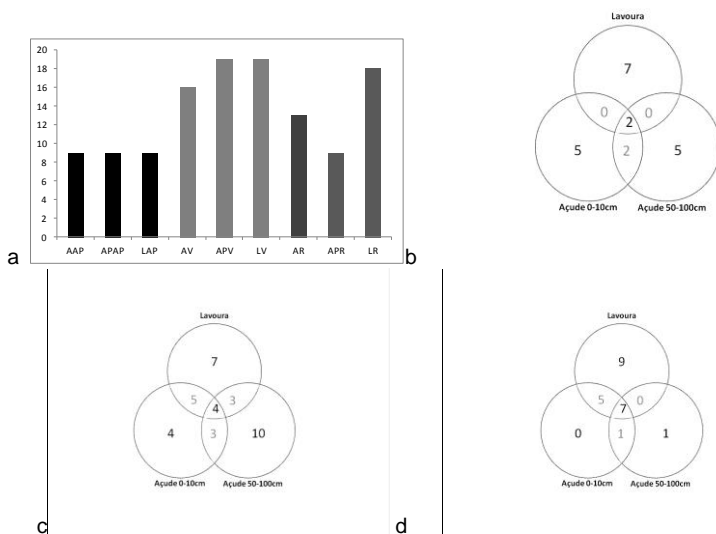


Figura 1. Riqueza de filotipos detectada por PCR-DGGE de fragmento do gene 16S rRNA durante os períodos de coleta (a). Diagrama de Venn baseado na distribuição de filotipos bacterianos nos pontos de coleta: lavoura (0-10cm), açude (0-10cm) e açude (50-100cm), no período anterior ao plantio (b), fase vegetativa (c) e fase reprodutiva (d). O código que representa os locais são: açude profundidade 10cm, no pré-plantio (AAP); açudes profundidade 50-100cm, pré-plantio (APAP), lavoura, pré-plantio (LAP); açudes profundidade 10cm, fase vegetativa (AV); açudes profundidade 50-100cm, fase vegetativa (APV), lavouras, fase vegetativa (LV); açudes profundidade 10cm, fase reprodutiva (AR); açudes profundidade 50-100cm, fase reprodutiva (APR), lavoura, fase reprodutiva (LR).

Quando comparadas as fases de cultivo, quanto ao número de filotipos, ou seja, a riqueza de espécies, a fase vegetativa apresentou a maior riqueza, 35 filotipos, a fase reprodutiva 26 filotipos e o período de pré-plantio 21 filotipos. O mesmo não foi encontrado para os índices de diversidade. Utilizando o índice de Shannon a fase reprodutiva foi a que apresentou a maior diversidade de espécies, seguida pela fase vegetativa (Figura 2a), ao contrário do que havia ocorrido para riqueza de espécies. O mesmo padrão foi encontrado com o índice de Simpson, onde a fase reprodutiva aparece com maior diversidade de espécies (Figura 2b). Os locais também apresentaram riqueza diferenciada, 25 filotipos na camada superficial dos açudes, 30 filotipos na camada mais profunda dos açudes (50-100cm) e 35 filotipos nas lavouras. Quanto a diversidade, apesar de as lavouras terem a maior riqueza de filotipos, a maior diversidade segundo o índice de Shannon foi encontrada na camada mais profunda dos açudes (Figura 5a) o mesmo ocorreu com a utilização do índice de Simpson (Figura 5b).

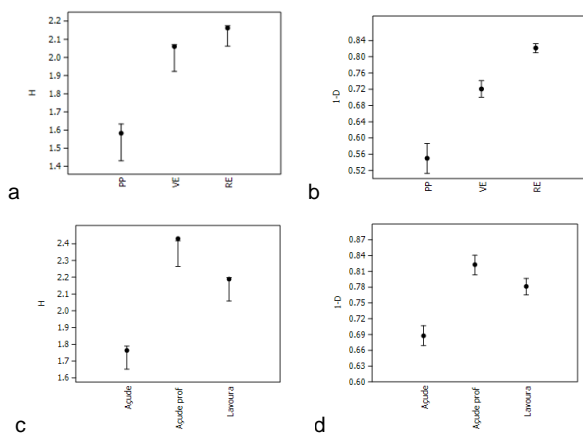


Figura 2. Índice de diversidade Shannon (H) e Simpson (1-D). Índice de Shannon encontrado em cada fase da cultura (a); Índice de Simpson encontrado em cada fase da cultura (b); Índice de Shannon encontrado em cada local (c); Índice de Simpson encontrado em cada local (d). Os códigos são representados por: PP – pré-plantio, VE – fase vegetativa e RE – fase reprodutiva.

De acordo com Bacilio-Jiménez et al. (2003) nas duas primeiras semanas de cultivo de arroz irrigado a quantidade de exsudados como aminoácidos e açúcares é muito mais alta. Na segunda semana a quantidade de aminoácidos chega a diminuir mais de 50%, mas ainda permanece alta, em relação a terceira e quarta semanas. Os exsudados das plantas, assim como a adição de nutrientes, podem ter gerado um fator positivo, pois em ambas as fases em que já haviam plantas nas lavouras a diversidade foi maior em comparação ao período de pré-plantio. Alguns autores citam os exsudados das raízes como fonte de nutrientes para micro-organismos presentes na rizosfera, assim como os que colonizam o solo (Gao et al., 2006).

A secreção de ácido málico pelas plantas aumenta a população de bactérias benéficas associadas às raízes. Essas bactérias podem auxiliar o crescimento das plantas, absorção de nutrientes ou até mesmo proteger as plantas através de antagonismo a patógenos (Bais et al., 2006). Porém a grande disponibilidade de nutrientes pode favorecer algumas espécies de rápida colonização, aumentado muito em número, em detrimento de outras.

Durante a fase subsequente, ou seja, a reprodutiva, o equilíbrio entre os grupos bacterianos se torna mais estável, permitindo com que uma maior gama de espécies coabite os locais em abundância semelhante, fazendo com que a maior riqueza tenha sido encontrada na fase reprodutiva.

Os açúdes, apesar de fontes artificiais de água, não recebem aporte artificial de nutrientes, mantendo um ciclo estável de decomposição de matéria orgânica, realizada principalmente por bactérias heterotróficas. A maior diversidade foi encontrada nesses locais, quando comparadas as lavouras, isso de justifica pela manutenção de uma comunidade bacteriana estável a mais tempo.

CONCLUSÃO

As plantas de *Oryza sativa* tem relação positiva com bactérias dispersas no ambiente, isso se deve a relação entre bactérias e os exudados das plantas, assim como a matéria orgânica dispersa do solo, elemento nutritivo para bactérias que promovem a decomposição. Através da decomposição da matéria orgânica do solo essas bactérias geram novos nutrientes as plantas, garantindo a sustentabilidade do ambiente. Durante o período de entressafra poderia ser interessante manter as plantas na lavoura, ou permitir a colonização de outras plantas, já que a matéria vegetal no local permitiria continuar a colonização bacterina no solo favorecendo a disponibilização de nutrientes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao UNISINOS, IRGA, Capes, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACILIO-JIMÉNEZ, M. et al. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant and Soil**, v. 249, p. 271-277, 2003.
- BAIS, H.P. et al. The role of root exudation in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233-256, 2006.
- CHOUDHARY, D.K.; SHARMA, K.P.; GAUR, R.K. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. **Biotechnology Letters**, v. 33, p.1905–10, 2011.
- CONAB. **Levantamentos de safra: 2º Levantamento grãos safra 2014/15**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=criterioSafra1>>. Acesso em: 16 abr. 2015.
- GAO, Y. et al. Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 1-11, 2006.
- KUŠAR, D.; AVGUŠTIN, G. Optimization of the DGGE band identification method. **Folia Microbiologica**, v. 57, p.301–6, 2012.
- POSTMA-BLAUW, M.B. et al. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. **Ecology**, v. 91, p. 460–473, 2010.
- SÁNCHEZ, O. et al. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5962–5967, 2007.
- WANG, S.; HE, J. Two-step denaturing gradient gel electrophoresis (2S-DGGE), a gel-based strategy to capture full-length 16S rRNA gene sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 1305–12, 2012.
- ZHONG, Y. et al. Microbial community and functional genes in the rhizosphere of alfalfa in crude oil-contaminated soil. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, China, n. 6, p. 797–805, 2012.