

Comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera de milho cultivado sob diferentes fontes de fosfato utilizando sequenciamento de nova geração

Ubiana Cássia Silva⁽¹⁾; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽²⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾; Sara Cuadros⁽⁴⁾; Julliane Dultra Medeiros⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁴⁾; Vera Lúcia dos Santos⁽⁵⁾

⁽¹⁾Estudante de Doutorado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG; ubiana.microb.ufmg@gmail.com; ⁽²⁾Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾Grupo de Genômica e Biologia Computacional /Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas Gerais, ⁽⁵⁾Professora, UFMG.

RESUMO: O Brasil se enquadra como o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), porém ainda é muito dependente da importação de insumos agrícolas, como os fertilizantes fosfatados. Para maior sustentabilidade da produção brasileira, tem-se estudado o emprego de fosfatos brasileiros juntamente com inoculantes microbianos capazes de disponibilizar o fósforo (P) dessas rochas no sistema solo-planta. Este trabalho objetivou investigar o perfil da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera do milho, cultivado com diferentes fontes de fosfato. O DNA extraído do solo rizosférico foi amplificado usando marcadores de bactéria (gene ribossomal 16S) e de fungo (região ITS). Os amplicons foram sequenciados na plataforma Miseq da Illumina e mapeados contra banco de dados para inferir a taxonomia. Os resultados demonstraram que o filo Proteobacteria foi dominante em todas as fontes de P avaliadas. Porém a família oxalobacteraceae foi enriquecida no tratamento com adição de fosfato de Araxá. O filo fúngico Ascomycota foi dominante em todas as fontes de P avaliadas, seguido de Glomeromicota que apresentou maior abundância nos tratamentos adicionados de fosfato de Araxá e supertríplo em comparação com o tratamento sem adição de P. Dado o exposto, pode-se concluir que as comunidades bacterianas e fúngicas do solo rizosférico de milho sofreram efeito da fonte de P, este estudo pode contribuir para maior compreensão do papel da comunidade microbiana na nutrição fosfatada do milho e direcionar a seleção de inoculantes microbianos para a melhoria do status nutricional dessa planta.

Termos de indexação: Comunidade microbiana, fosfato de rocha e rizosfera de milho.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas importantes para a agricultura, sendo o segundo cereal mais produzido em escala mundial.

Entretanto, para garantir a produtividade dessa cultura, os sistemas de produção são altamente dependentes de insumos químicos, especialmente fertilizantes. O fósforo (P) é o terceiro componente que limita o crescimento das plantas, estando abaixo apenas do nitrogênio e da água, atuando em inúmeros processos, incluindo fotossíntese, respiração, sinalização celular e síntese de ácidos nucleicos. Entretanto, o Brasil não possui reservas de rochas fosfáticas com teores de P adequados para o processamento convencional de síntese de adubos, o que o torna dependente do mercado externo de fertilizantes (Anda, 2016). Além disso, grande parte do fosfato solúvel adicionado ao solo na forma de fertilizantes fica retido aos óxidos de Ferro e Alumínio nos solos tropicais, como os do cerrado brasileiro (Novais & Smith, 1999).

Uma das alternativas para fertilização fosfatada no Brasil é o emprego de fosfatos de rocha extraídos a partir de minas brasileiras agregado ao uso de micro-organismos com capacidade de disponibilizar o P dessas rochas. Neste contexto, o estudo do perfil da comunidade microbiana com capacidade de crescer associada à planta nas condições estressantes, como a baixa disponibilidade de P, por métodos independentes de cultivo poderá auxiliar no entendimento do papel da microbiota na nutrição do milho, podendo direcionar a busca por micro-organismos eficientes na promoção do crescimento de plantas, propiciando o desenvolvimento de inoculantes microbianos eficazes no suprimento de nutrientes para a cultura do milho. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi de acessar a diversidade da comunidade microbiana associada ao milho cultivado em diferentes fontes de P por meio do sequenciamento de amplicons.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG (19°28'S 44°15'W), sendo composto por três tratamentos (T1:

Solo agrícola sem adição de P; T2: Solo agrícola com adição de P solúvel; T3: Solo agrícola com adição de fosfato de Araxá), sendo um total de nove parcelas, divididas em três blocos. O milho híbrido 30F35YH da Embrapa Milho e Sorgo foi plantado manualmente com matraca em linhas de 5 m de comprimento, espaçadas entre si em 70 cm. O tratamento com adubação fosfatada recebeu 100 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ a partir de trifosfato triplo e fosfato de Araxá aplicados a 5 cm de profundidade, através da abertura de sulcos com enxada abaixo e ao lado da linha de plantio. Após 60 dias do plantio, foram coletadas 5 plantas de cada repetição, totalizando 15 plantas por tratamento e 45 amostras totais. Estas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos de primeiro uso.

Coleta e processamento das amostras

Sub-amostras das raízes com o solo rizosférico aderido foram processadas para extração do DNA total. Inicialmente, as amostras recém colhidas no campo foram lavadas com água para retirar o excesso de solo. Em torno de 5g das raízes mais finas e com solo rizosférico aderido de cada amostra foram adicionadas a um tubo cônico contendo 30 mL de tampão fosfato (Para 1L: 6,33g de NaH₂PO₄.H₂O e 16,5g de Na₂HPO₄.7H₂O). Os tubos foram agitados por 15 s e as raízes transferidas para novo tubo de 50 mL contendo 30 mL do tampão fosfato. O solo obtido deste procedimento correspondeu a primeira fração. Em seguida, as raízes foram homogeneizadas e sonicadas em baixa frequência (50-60 Hz) por 5 min., sendo 5 vezes de sonicação de 30s, seguidos de 30s de descanso. As raízes foram transferidas para novo tubo contendo 30 mL do tampão fosfato e obteve-se a segunda fração de solo (Lundberg et al. 2012). As duas frações de solo rizosférico foram misturadas, centrifugadas e o pellet foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico do solo foi utilizado o kit Power Max soil DNA (MoBio Laboratories, Inc., CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% e a quantificação realizada em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Preparo da biblioteca de amplicons e sequenciamento de DNA

A partir do DNA metagenômico de solo rizosférico, foi feita a reação de PCR para amplificar as regiões V3 e V4 da subunidade 16S do rDNA de bactéria, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores

341F e 806R (Klindworth, et al., 2013), e para a região ITS2 de fungo utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS3_KYO1-F e ITS4_KYO1-R (Toju et al., 2012). A reação da PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 5 µL de cada primer (1 pmol/µL) e 2,5 µL do DNA (15 ng/µL). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 seg., anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg. A extensão final foi conduzida a 72°C por 5 min. Os amplicons foram purificados com AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os amplicons foram ligados a um par de index (N7 e S5) específico para cada amostra durante uma segunda PCR: para um volume final de 25 µL, adicionou-se 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 3 µL de cada Nextera XT index, 2,5 µL do produto purificado da primeira PCR e 4 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguida de 8 ciclos a 95°C por 30 seg., anelamento a 55°C por 30 seg., extensão a 72°C por 30 seg. e extensão final a 72°C por 5 min. O produto da segunda PCR foi purificado com AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter, Danvers, MA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação da segunda PCR, os amplicons foram avaliados quanto a qualidade e tamanho das bandas utilizando Bioanalyzer DNA 1000 chip. Em seguida, as amostras foram quantificadas por qPCR utilizando o kit KK4824 – Kapa Biosystems e normalizadas. Foi feito um pool das amostras para o sequenciamento na plataforma MiSeq da Illumina utilizando o kit V3, usando 2 × 300 bp paired-end.

Análise das sequências e estatística

As sequências obtidas foram demultiplexadas para agrupar as amostras de acordo com o conjunto de index utilizado. Após a triagem inicial das sequências utilizando o filtro de qualidade do sequenciador, as análises seguintes foram baseadas no pipeline desenvolvido pelo Brazilliam Microbiome Project (Pylro et al., 2013). Brevemente, as sequências no formato fastq foram trimadas quanto a qualidade, utilizando o parâmetro phred e truncadas pelo tamanho de 400 pb para bactéria e 300 pb para fungo. Em seguida, foi feita a retirada das sequências únicas (singletons) e filtragem de sequências químicas utilizando o USEARCH. A classificação taxonômica foi feita utilizando o pacote QIIME (Caporaso et al., 2010). Foi feita também a análise de variância da abundância relativa das famílias de bactérias

dominantes (maior ou igual a 3 %) e para todos os filões de fungo encontrados nas três fontes de P avaliadas, seguida do teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A classificação taxonômica das sequências obtidas demonstrou que a fonte de fosfato influenciou no padrão de táxons tanto para bactérias quanto para os fungos da rizosfera do milho. Diferenças na composição da comunidade microbiana no nível de filo foram detectadas entre os tratamentos com as diferentes fontes de P adicionadas ao solo (**Figuras 1 e 2**). Para o grupo de bactéria houve predominância do filo Proteobacteria em todos os tratamentos (**Figura 1**). Outros trabalhos têm detectado também a predominância do filo Proteobacteria na comunidade rizosférica de milho (Peiffer et al., 2013; Johnston-Monje et al., 2016). Mesmo em regiões distantes ao longo do globo terrestre, bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria tem sido dominantes na região de solo rizosférico de cultivo de milho, como demonstrado no estudo que avaliou solos do Canadá, Brasil, Flórida e Illinois (Roesch et al., 2007).

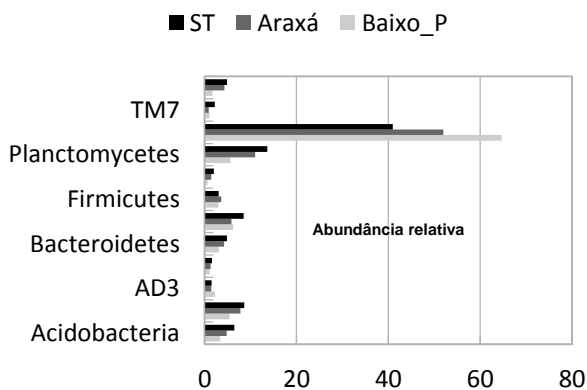


Figura 1: Abundância relativa dos filões de bactéria (maiores que 3%). Baixo P: sem adição de fosfato, Araxá: Adição de fosfato de Araxá e ST: adição de fosfato super triplo.

A família Oxalobacteraceae de Proteobacteria foi a mais abundante ($p < 0,05$) no tratamento adicionado de fosfato de Araxá (**Figura 2**), quando comparado aos demais. Gêneros dessa família são capazes de usar o oxalato e outros ácidos orgânicos como fonte de carbono e energia, o que sugere que este ácido esteja presente na rizosfera do milho cultivado com

fosfato de Araxá, podendo ser secretado por raízes de plantas, fungos filamentosos e bactérias presentes na rizosfera. O oxalato possui função importante já relatada na solubilização do fosfato de Araxá (Mendes et al. 2014; Silva et al. 2014).

A classificação taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) representativas do grupo de fungos mostrou que Ascomycota foi o filo dominante nos tratamentos para todas as fontes de P, seguido pelos filões Glomeromycota, Basidiomycota, Zigomicota e Chytridiomycota (**Figura 3**). De modo geral, e com exceção do filo Glomeromycota, todos os outros apresentaram abundância relativa com valores muito próximos entre as fontes.

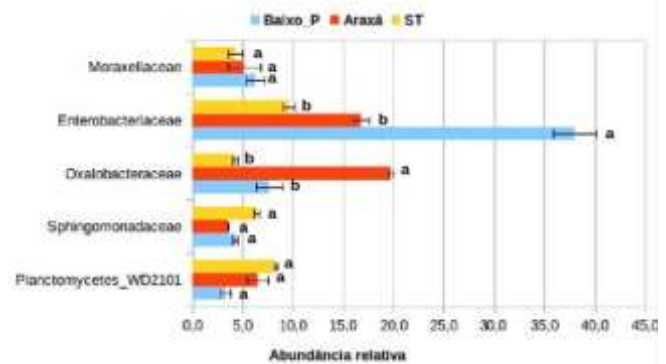


Figura 2: Abundância superior a 3 % das famílias encontradas nos tratamentos com as diferentes fontes de P identificadas na Figura 1. As médias seguidas da mesma letra são significativamente similares pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

O filo Glomeromycota apresentou abundância de 7% no tratamento sem adição de P, 16% no tratamento com fosfato de Araxá e 17 % naquele adicionado com supertriplo. Alguns fatores podem ter contribuído para a ocorrência da abundância similar de Glomeromycota nos tratamentos acrescidos de fosfato de Araxá e de super triplo. Por exemplo, o efeito da liberação residual do P a partir do fosfato de Araxá ao longo dos três anos de cultivo de milho adubado com esta rocha na área coletada. Este processo pode ter propiciado uma dose de P solúvel no solo durante o crescimento das plantas similar à provida pelo super triplo e, portanto, a colonização micorrízica não foi alterada nestes dois tratamentos. No tratamento sem adição de P, os resultados foram contrários ao esperado. Nestas condições, a associação micorrízica resulta em aumento da disponibilidade de P para a planta. Por outro lado, as plantas submetidas a elevado estresse nutricional de P, têm o seu crescimento diminuído, o que, possivelmente, interferiu na capacidade de

estabelecer a colonização com fungos micorrízicos arbusculares FMA (Koide e Li, 1990). Outro fator é a ocorrência de competição pelo P na rizosfera entre as hifas dos FMA e as raízes (Smith et al. 2011).

CONCLUSÕES

O filo Proteobacteria foi o mais abundante em todas as fontes de P avaliadas, sendo que a família Oxalobacteraceae foi enriquecida no tratamento com adição de fosfato de Araxá. Para os fungos, o filo glomeromicota apresentou abundância relativa similar nos tratamentos adicionados de fosfato de araxá e supertríplo.

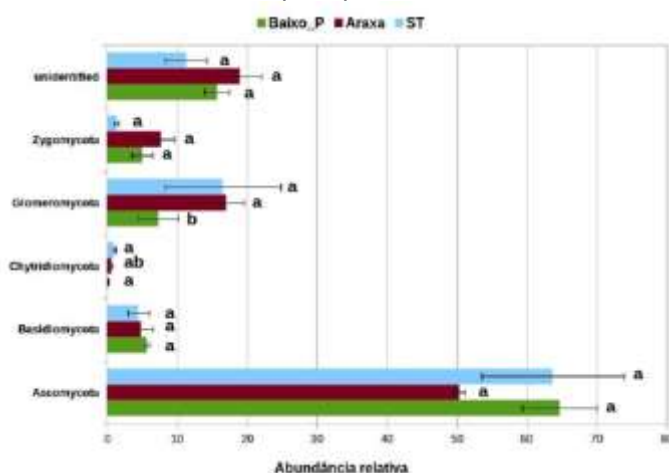


Figura 3: Abundância relativa dos filios de fungos nas diferentes fontes de P identificadas na Figura 1. As médias seguidas da mesma letra são significativamente similares pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao auxílio financeiro da Fapemig, CNPq e Embrapa Milho e Sorgo

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA). <http://www.anda.org.br/> acesso em 09 de maio de 2016.

JOHNSTON-MONJE, D., LUNDBERG, D. S., LAZAROVITS, G., REIS, V. M., & RAIZADA, M. N. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, p. 1-19, 2016.

KLINDWORTH, Anna et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical

and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, p. gks808, 2012.

KOIDE, ROGER T.; LI, MINGGUANG. On host regulation of the vesicular—arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 114, n. 1, p. 59-74, 1990.

MENDES, G. O, de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64. p., 239-249, 2014.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, DPS, 1999. 399p.

PEIFFER, J. A., SPOR, A., KOREN, O., JIN, Z., TRINGE, S. G., DANGL, J. L. & LEY, R. E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n.16, p. 6548-6553, 2013.

ROESCH, L. F., FULTHORPE, R. R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A. K., KENT, A. D., & TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007.

SILVA, U.C, MENDES, G.O, SILVA, N. M. R., DUARTE, J. L., SILVA, I. R., TÓTOLA, M. R., & COSTA, M. D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. **PloS One**, v.9, n.10, p.e110246, 2014.

SMITH, S. E., JAKOBSEN, I., GRØNLUND, M., & SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. **Plant Physiology** v.156, n.3, p.1050-1057, 2011.

TOJU, A.S. TANABE, S. YAMAMOTO, H. SATO. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e40863, 2012.