

## Diversidade genética da comunidade bacteriana e de fungos micorrízicos arbusculares em milho sob diferentes fontes de fosfato

**Amanda Nayê Guimarães Tavares<sup>(1)</sup>; Ubiana Cássia Silva<sup>(2)</sup>, Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>(3,4)</sup>;**

**Eliane Aparecida Gomes<sup>(5)</sup>; Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>(5)</sup>; Vera Lúcia dos Santos<sup>(6)</sup>**

<sup>(1)</sup> Estudante, Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida; <sup>(2)</sup> Estudante de Doutorado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG; ubiana.microb.ufmg@gmail.com; <sup>(3)</sup> Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; <sup>(4)</sup> Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; <sup>(5)</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo; <sup>(6)</sup> Professora, UFMG.

### RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes na agricultura mundial, sendo o Brasil o terceiro maior produtor. No entanto, a produtividade desta cultura no Brasil ainda é considerada baixa. Para alcançar maiores índices de produtividade é necessário o emprego de tecnologias sustentáveis que interfiram nos fatores de produção, como o emprego de inoculantes microbianos capazes de disponibilizar o fósforo (P) para a planta. Neste contexto, estudos que visam conhecer a diversidade microbiana associada ao milho cultivado sob diferentes estresses pode propiciar o desenvolvimento de inoculantes microbianos eficientes na promoção de crescimento da planta. Este trabalho objetivou o estudo do perfil da comunidade bacteriana e de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associados à rizosfera e partes internas da raiz do milho, cultivado com diferentes fontes de fosfato, utilizando a técnica t-RFLP. O DNA extraído do solo rizosférico e das bactérias endofíticas da raiz foi amplificado com primers para os genes 16S rRNA e 23S rRNA de bactérias e FMA, respectivamente. Os resultados mostraram que tanto a comunidade bacteriana como a de FMA sofreram alteração de acordo com a fonte de P adicionada. A comunidade bacteriana diferiu ainda com o ambiente colonizado, solo rizosférico e região interna da raiz (comunidade endofítica). Conclui-se então que diferentes tipos de adubação fosfatada modulam a composição da comunidade microbiana associada ao milho, o que deve ser um fator importante a ser considerado quando o objetivo for acessar esses microrganismos a partir de técnicas de isolamento e utilização destes como bioinoculantes.

**Termos de indexação:** tRFLP, bactéria, fungo, solo.

### INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes na agricultura mundial, sendo o segundo cereal mais utilizado para o consumo humano (Monje, 2011). O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes na agricultura mundial, sendo o segundo cereal mais utilizado para o consumo humano (Monje, 2011).

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes na agricultura mundial, sendo o segundo cereal mais utilizado para o consumo humano (Monje, 2011). Para o cultivo em larga escala desta *commoditie* é necessária a adição de fertilizantes como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). O P é o terceiro componente que limita o crescimento das plantas e atua em inúmeros processos, incluindo fotossíntese, respiração, sinalização celular e síntese de ácidos nucleicos (Vance et al., 2003). Para o milho, o P é extremamente requerido no período de florescimento, completando sua exigência máxima quando os grãos começam a encher (Vasconcellos, 2000). Neste contexto, o efeito da interação planta-microrganismo pode ser benéfico para a planta hospedeira auxiliando no seu desenvolvimento (Mendes et al., 2013). Os microrganismos podem interagir de diferentes formas com as plantas, funcionando coletivamente como um microbioma. Eles podem colonizar os tecidos internos das plantas, sendo nomeados microrganismos endofíticos, a superfície das folhas (epifíticos) e compartimentos da raiz separadamente: rizosfera, rizoplane e endosfera (Ryan et al., 2008; Philippot et al., 2013).

O conhecimento e a manipulação do microbioma das plantas podem configurar em um recurso biotecnológico alinhado aos interesses de diminuição do custo de produção e aumento da sustentabilidade na agricultura. Uma tecnologia promissora consiste no uso de inoculantes

microbianos com capacidade de promover o crescimento vegetal ou atuarem como agentes de controle biológico de pragas e doenças (Mendes et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil da comunidade bacteriana e de fungos micorrízicos arbusculares associados à rizosfera e partes internas da raiz do milho, cultivado com diferentes fontes de fosfato, utilizando a técnica t-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*).

### MATERIAL E MÉTODOS

#### **Delineamento experimental**

O experimento foi instalado 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 sob a disposição de delineamento experimental de blocos casualizados. 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<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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, de cada repetição, foram coletadas 5 plantas, totalizando 15 plantas por tratamento e 45 amostras totais. Estas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos.

### Coleta e processamento das amostras

Subamostras das raízes com o solo rizosférico aderido foram processadas para extração do DNA total. Inicialmente, as amostras recém colhidas no campo foram lavadas com a pressão da água para retirar o excesso de solo. Em torno de 5 g das raízes mais finas com solo rizosférico aderido foram adicionadas em tubo cônico contendo 30 mL de tampão fosfato (6,33 g L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 16,5 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Os tubos foram agitados por 15 seg 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 30 s, seguidos de 30 seg 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, sendo o pellet congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Para a obtenção das bactérias endofíticas das raízes, estas foram lavadas com água destilada até ficarem claras e submetidas a desinfecção. Para tal, as raízes foram mantidas imersas durante 3 min em 30 mL de solução de etanol 70% (v/v), lavadas com água destilada para retirar o excesso de álcool, e imersas em 30 mL de hipoclorito de sódio 2% (m/v) por 5 min. Ao final, as raízes foram lavadas por 4 vezes com água destilada autoclavada, sendo a última água plaqueada para verificar da eficiência da desinfecção (Bulgari et al., 2009). A seguir, a liberação das células bacterianas foi realizada segundo metodologia estabelecida por Sessitsch et al. (2012), com modificações. Brevemente, as raízes foram cortadas e após a realização de ranhuras com bisturi estéril, as mesmas

foram transferidas para erlenmeyer contendo solução salina 0,85% (v/v) e esferas de vidro. Após agitação de 200 rpm por 7 horas à temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada em membrana de 5 m utilizando sistema a vácuo. O permeado foi filtrado em membrana com poro de 0,22 µm para concentrar as células bacterianas e estas membranas foram armazenadas a -80 °C.

### Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico do solo e das membranas contendo as células bacterianas foi utilizado o kit Power Max Soil DNA (MoBIO Laboratories, Inc.), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e a quantificação realizada em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

### T-RFLP

Para análise de bactérias, região do gene 16S rDNA foi amplificada com os primers 8F (6-FAM) e 1492R (LaMontagne et al., 2002). A reação de PCR foi constituída por 50 ng de DNA, 0,25 mmol/L de cada primer, 5 µL de tampão de reação 10X, 3 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mmol/L de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Paisley, UK) em 50 µL.

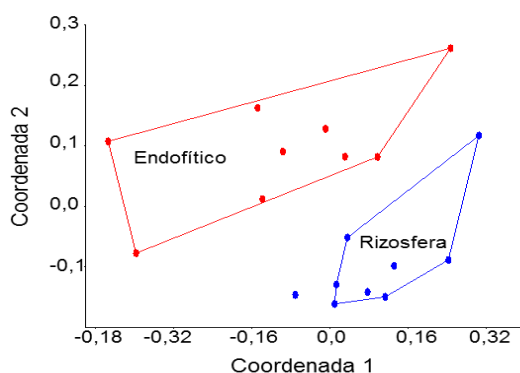
Para a amplificação do gene 23S rDNA de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), foi utilizado nested-PCR a partir de reação com primers LR1 e FLR2 (Trouvelot et al., 1999). A reação inicial constituiu de 50 ng de DNA, 0,2 mmol/L de primer, 5 µL de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mmol/L de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), em 50 µL. Para a 2ª reação de PCR foram utilizados 2,5 µL do produto da 1ª reação e os primers FLR3 (6-FAM) e FLR4 (NED) (Gollotte, 2004). As condições de PCR foram as mesmas utilizadas na 1ª reação. Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição AluI (16S rDNA) e TaqI (23S rDNA). Para a digestão foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL de tampão 10X e 1 U de cada enzima em 20 µL.

Para avaliar os fragmentos de DNA gerados, 2 µL da digestão foram misturados a 9,8 µL de formamida deionizada (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2 µL de padrão ROX 500 (Applied Biosystems). A análise foi realizada no equipamento Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems) com o software GeneMapper 5.0. Posteriormente, os dados foram analisados no software online T-REX (Culman et al., 2009), possibilitando filtragem dos ruídos e alinhamento automático do tamanho dos fragmentos. Em seguida, os dados foram exportados em planilha

binária e ordenados pela análise de componentes principais (PCA) ou por escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard utilizando o programa Past versão 3.04 (Hammer et al., 2001).

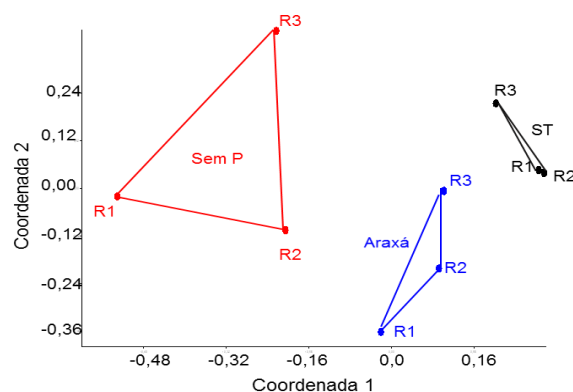
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar a separação da comunidade bacteriana em função dos ambientes, solo rizosférico e interior da raiz (**Figura 1**). Os microrganismos podem interagir de diferentes formas com as plantas e colonizar os tecidos internos e externos, bem como a região da rizosfera. Entretanto, cada ambiente apresenta características físicas e químicas diferenciadas, o que pode desencadear a seleção de distintas comunidades microbianas. A região da rizosfera é caracterizada por receber metabólitos produzidos pela planta, como mucilagens e exsudados liberados pelas raízes que estimulam o crescimento e a diversidade da microbiota (Bais et al., 2011). A rizosfera sofre influência direta dos componentes do solo e de estresses abióticos, como disponibilidade de água e nutrientes. Já a comunidade microbiana que habita o interior da planta está em um ambiente protegido, porém exposta a outros estresses bióticos, como as pressões de seleção do sistema de defesa das plantas, selecionando os microrganismos capazes de penetrar nos tecidos vegetais sem serem reconhecidos como patógenos (Kogel et al., 2006).



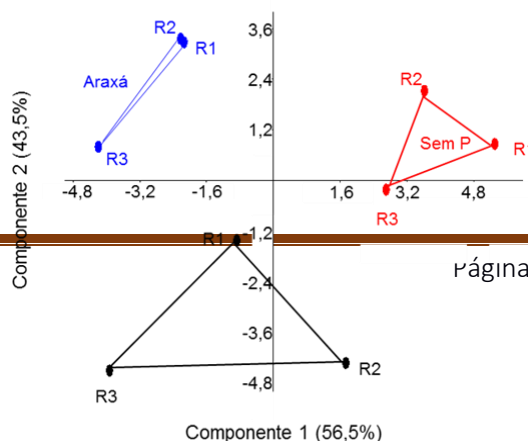
**Figura 1.** Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de para bactérias rizosféricas e endofíticas de milho.

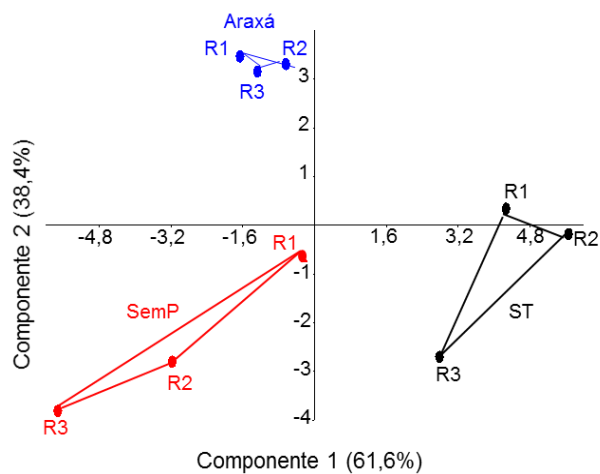
Além da diferença encontrada entre os ambientes rizosfera e interior da planta, observa-se também que a comunidade microbiana de bactérias agrupou em função da fonte de P adicionada ao solo, indicando que, independente do ambiente avaliado, o tipo de adubação fosfatada afetou a composição da comunidade bacteriana (**Figuras 2 e 3**). Para os fungos micorrízicos arbusculares também foi observada separação das amostras de acordo com o tipo de adubação fosfatada (**Figura 4**).



**Figura 2.** Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) para bactéria endofítica em função das fontes de P: Sem adição de P (vermelho), fósforo de Araxá (azul) e P solúvel (preto).

**Figura 3.** Análise de componentes principais para bactéria da rizosfera em função das fontes de P: Sem adição de P (vermelho), fósforo de Araxá (azul) e P solúvel (preto).





**Figura 4.** Análise de componentes principais da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de para fungos micorrízicos em função das fontes de P: Sem adição de P (vermelho), Araxá (azul) e P solúvel (preto).

Toljander et al. (2008) verificaram também o efeito da fertilização na comunidade bacteriana e de FMA comparando tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos por T-RFLP. As modificações foram correlacionadas com o nível de fosfato no solo, mas principalmente com o pH do solo.

Estudos que visam conhecer a diversidade microbiana associada ao milho cultivado sob diferentes estresses e entender o seu papel na nutrição desta cultura podem direcionar a busca por microrganismos eficientes na promoção do crescimento, propiciando o desenvolvimento de inoculantes microbianos eficazes no suprimento de nutrientes para a cultura do milho.

## CONCLUSÕES

A estrutura das comunidades bacterianas associadas ao milho pode variar em função da parte da planta colonizada, rizosfera e endosfera da raiz.

A fonte de P adicionada ao solo também afeta a diversidade da comunidade de bactérias tanto na rizosfera quanto na endosfera, bem como a composição da comunidade de FMA.

O t-RFLP apresenta sensibilidade para detecção das diferenças na estrutura das comunidades de bactéria e FMA associados às plantas de milho.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Milho e Sorgo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais -

FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior - CAPES.

## REFERÊNCIAS

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Reviews of Plant Biology**. v.57, n. 1, p. 233–266, 2011.

BULGARI D., et al. (2009) Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. **J. Microbiol.** v.47, p.393-401.

CULMAN, S. W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H. G.; CADILLO-QUIROZ, H.; BUCKLEY, D. H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.171-180, 2009.

GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, Berlin, v.14, p.111-117, 2004.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. **Past**: Palaeontological statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. 2011. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: 28 mar. 2016.

KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion Plant Biology**. v.9, p. 358-363, 2006.

LAMONTAGNE, M. G.; MICHEL, JR.; HOLDEN, P. A.; REDDY, C. A. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.49, p.255-264, 2002.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant-beneficial, plant-pathogenic and human-pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Review**, v.37, p.634-663, 2013.

MONJE, D. M. J. Microbial ecology of endophytic bacteria in zea species as influenced by plant genotype, seed origin, and soil environmental – **Tese de doutorado**. University of Guelph, 2011.

PHILIPPOT L., RAAIJMAKERS J. M., LEMANCEAU P., VAN DER PUTTEN W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.789-799, 2013.

RYAN R. P., GERMAINE K., FRANKS A., RYAN D. J., DOWLING D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.1–9, 2008.

- SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRASSEL, S.; ROUVELOT, S.; Van TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZI-A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, PEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, A., *Vit*, phasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence *in situ* OVERBEEL, L.; BRAR, D.; VAN ELSAS, J. D.; REINHOLD-HUREK, *Bridization. Mycorrhiza*, Amsterdam, v.8, p.203-206, 1999.
- Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.25, p.28-36, 2012.
- ACQUINO, C.P., EHDE-STONE C., ALLAN, DL. Phosphorous acquisition and use: critical adaptations by plants for screening a renewable resource. **New Phytology**. v.157, p.423-447, 2003.
- TOLJANDER, J.F., SANTOS-GONZÁLEZ, J.C., TEHLER, A., FINLAY, R.D. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. **FEMS Microbiology Ecology**. v.65, p.323-338, 2008.
- CONCELLOS, C. A.; PITTA, G. V. E.; FRANÇA, G. E. DE; FERNANDES, V. M. C. Fósforo para o milho. **Cultivar Grandes Culturas** – artigos técnicos. 2000.