



XXXIII

Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas
31 de julho à 05 de agosto - Center Convention - Uberlândia/Minas Gerais

PIROSEQUENCIAMENTO E qPCR REVELAM EXTENSA DIVERSIDADE FUNCIONAL EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO DA AMAZÔNIA E CARVÃO PIROGÊNICO

Mariana Gomes Germano^(1,2); **Lucas William Mendes**⁽²⁾; **Shoko Iwai**⁽³⁾; **Wenceslau Geraldes Teixeira**⁽⁴⁾; **John Quensen**⁽⁵⁾; **James Tiedje**⁽⁵⁾; **Siu Mui Tsai**⁽⁶⁾

⁽¹⁾Analista; Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal; Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina-PR, mgermano@cnpsa.embrapa.br; ⁽²⁾Pós-graduação; Laboratório de Biologia Celular e Molecular; CENA/USP, Av. Centenário, 303, Piracicaba-SP, 13400-970; ⁽³⁾Pesquisador; UCSF Medical Center; University of California, San Francisco, Box 0538, 513 Parnassus Ave, Med Sci S-357, 94143 – 0538; ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Solos; Jardim Botânico, 1.024, Rio de Janeiro-RJ, 22460-000; ⁽⁵⁾Pesquisador; Center for Microbial Ecology; Michigan State University, 540 Plant and Soil Sciences Building, East Lansing, MI 48824-1325; ⁽⁶⁾Pesquisador; Laboratório de Biologia Celular e Molecular; CENA/USP, Av. Centenário, 303, Piracicaba-SP, 13400-970.

Resumo - Várias estratégias têm sido utilizadas para avaliar as relações entre o funcionamento dos ecossistemas e a estrutura de comunidades microbianas, com o objetivo de atribuir o papel de membros específicos dentro da comunidade, visando à estabilidade do sistema. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de genes de dioxigenases para degradação de hidrocarbonetos aromáticos em amostras de solos de Terra Preta de Índio da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra, e seu respectivo carvão pirogênico, por meio de pirosequenciamento. Paralelamente, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real em amostras de solo e carvão pirogênico, para quantificar a abundância de genes funcionais nestes ambientes, com o objetivo de inferir a participação da microbiota do carvão em processos específicos no solo. As 9357 sequências geradas por pirosequenciamento foram agrupadas em aproximadamente 1600 *clusters*, onde mais de 56% foi composto por sequências descritas unicamente neste estudo, representando uma diversidade ainda não reportada para genes catabólicos bacterianos em solos TPI. O número de cópias de genes de dioxigenases em amostras de carvão determinada por PCR quantitativo, foi maior no sítio TPI sob floresta secundária, confirmando o papel do carvão pirogênico na manutenção da diversidade microbiana. Abordagens metagenômicas baseadas em genes específicos, como realizado neste estudo, podem prover uma melhor compreensão da biologia envolvida na diversidade de ambientes tropicais antropogênicos, com grande quantidade de carvão pirogênico, como as Terras Pretas de Índio da Amazônia.

Palavras-Chave: sequenciamento em larga escala, ecologia microbiana, genes funcionais, *Bacteria*

INTRODUÇÃO

Solos com horizonte superficial antrópico, conhecidos como Terra Preta de Índio (TPI) ou simplesmente Terra Preta, representam um dos registros mais marcantes da antiga ocupação humana na região amazônica, sendo comumente localizados ao

longo de rios e interflúvios, ocupando várzeas, elevações marginais adjacentes e terra firme (Kern et al., 2003).

Um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento diferenciado dos solos TPI é a maior quantidade e a diferença qualitativa da sua matéria orgânica, que consiste em, aproximadamente, 35% de carvão pirogênico (Glaser, 2007). A presença de material orgânico estável e a atividade biológica indicam que as TPI podem ser sítios de alta diversidade microbiana.

O manejo da matéria orgânica visando à conservação e melhoria da qualidade do solo é fundamental na manutenção da sustentabilidade dos agroecossistemas tropicais. Nesse contexto, os processos de biodegradação regem grande parte do ciclo do carbono, cuja fração biológica é dependente de enzimas microbianas como as dioxigenases, que utilizam compostos orgânicos presentes no solo como fonte de carbono e energia (Wackett, 2004). Desta forma, o estudo da diversidade de genes catabólicos pode facilitar a compreensão das bases adaptativas de micro-organismos funcionais do carvão pirogênico e seu papel no equilíbrio da fertilidade das TPI, além de determinar sua influência nas comunidades biológicas destes solos.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo está localizada na Estação Experimental do Caldeirão (03° 14' S; 60° 13' W) da Embrapa Amazônia Ocidental-CPAA, no Município de Iranduba, próximo a Manaus, AM. As amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-10cm em solos TPI sob dois sistemas de uso terra, sendo um sítio sob floresta secundária (CAPOEIRA) com mais de 30 anos de abandono, e outro sob cultivo agrícola há pelo menos 20 anos (CULTIVADO). O carvão pirogênico foi separado a partir de amostras de solo TPI dos dois sítios com auxílio de peneira e lupa.

Pirosequenciamento de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico

O DNA total da comunidade microbiana dos solos TPI e carvão pirogênico foi extraído em triplicata, utilizando-se o *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no Center for Microbial Ecology (Michigan State University, MI-USA), sob responsabilidade do Dr. James M. Tiedje, em sequenciador Genome Sequencer FLX System (454, Roche) com a plataforma *GS FLX Titanium*, cujo comprimento das sequências geradas (*reads*) fica em torno de 400 pb. Os *primers* utilizados para detecção do gene catabólico foram BPHD-f1 e r3 (Iwai et al., 2010).

As sequências de dioxigenases obtidas foram analisadas utilizando-se o Fungene (Funcional gene pipeline & repository, <http://fungene.cme.msu.edu/>). Para as análises de diversidade utilizou-se o software MOTHUR.

PCR quantitativo

As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas para quantificação do número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas nos solos TPI e amostras de carvão pirogênico para os dois sítios analisados neste estudo. Como padrão para comparações, foi utilizado o gene ribossomal 16S rRNA. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems), utilizando o sistema SYBR Green e os mesmos *primers* utilizados no pirosequenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de dioxigenases aromáticas obtidas por pirosequenciamento para os dois sítios TPI e seu respectivo carvão pirogênico, foram inicialmente analisadas quanto à qualidade pelo software do próprio equipamento, que descartou as leituras de baixa qualidade. As regiões correspondentes aos *primers* BPHD e aos *barcodes* foram também removidas no processo de filtragem inicial.

O número de sequências válidas geradas para os solos TPI e o carvão pirogênico ficou entre 1923 sequências para o solo TPI do Caldeirão-Capoeira e 2610 para amostras de carvão no mesmo sítio (Tabela 1).

Como controle positivo, foi utilizada uma comunidade microbiana artificial (*mock community*), que compreende uma amostra de DNA onde se conhece a proporção do gene funcional [10% de DNA genômico de *Burkholderia xenovorans* LB400 (gene *bph*)].

Os erros em relação às fases de leitura das possíveis proteínas foram corrigidos utilizando-se a ferramenta RDP FrameBot (<http://fungene.cme.msu.edu/>). As sequências que passaram pelos filtros anteriores foram alinhadas utilizando-se a ferramenta HMMER3 *aligner*, disponível do FunGene, com a sequência de referência de *Pseudomonas putida* F1 (YP_001268196).

Finalmente, as sequências válidas foram agrupadas (*clustering*) utilizando-se o software MOTHUR, considerando-se um nível de dissimilaridade de 94% ao nível de aminoácido (*cutoff* 0,06) entre as sequências de genes de dioxigenases aromáticas (Tabela 2).

Os índices de diversidade nos solos de TPI foram maiores em relação ao carvão pirogênico para os genes

de dioxigenases obtidos pelo pirosequenciamento, bem como as estimativas de riqueza de espécies, dadas por Chao1, ACE e *Jackknife*.

A análise realizada com o programa J-Libshuff, incluído no MOTHUR, apontou diferença estatística significativa entre todas as amostras analisadas, indicando que as comunidades funcionais de *Bacteria* presentes em solos TPI e carvão pirogênico são influenciadas diretamente pelas condições físico-químicas e ecológicas de ambientes distintos.

Para verificar a riqueza de Famílias Protêicas Operacionais (FPOs) das amostras de TPI e carvão analisadas, foi utilizado o método de rarefação ao nível de 94% de similaridade entre as sequências de aminoácidos (Figuras 1 e 2), cujos resultados corroboraram as medidas de riqueza. As curvas indicaram que o número de sequências de genes de dioxigenases aromáticas não foi suficiente para amostrar completamente a riqueza de espécies das comunidades microbianas dos solos TPI e do carvão pirogênico.

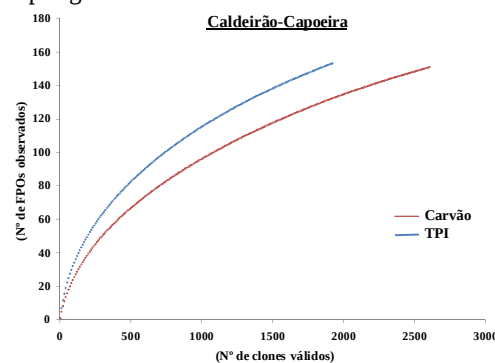


Figura 1. Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Caldeirão-Capoeira.

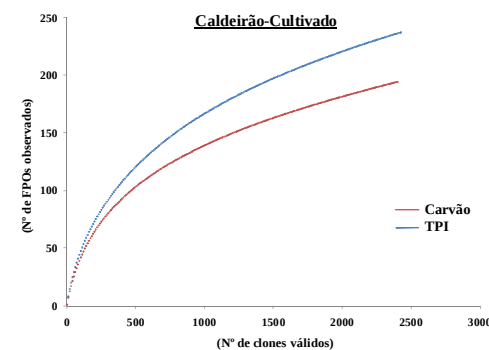


Figura 2. Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Caldeirão-Cultivado.

Para verificar as intersecções e peculiaridades de cada ambiente, foram construídos Diagramas de Venn, identificando o número de FPOs exclusivas e compartilhadas entre os solos TPI e o carvão pirogênico para cada sítio TPI analisado (Figura 3).

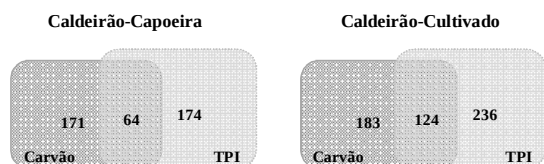


Figura 3. Diagramas de Venn baseados nas FPOs de dioxigenases aromáticas únicas e compartilhadas (*cutoff* 0,06) para os solos de TPI e carvão pirogênico dos dois sítios analisados por pirosequenciamento.

A porcentagem de FPOs compartilhadas entre as amostras de TPI e carvão nos sítios Caldeirão-Capoeira e Caldeirão-Cultivado variou entre 15 e 23%, respectivamente, em relação ao total de FPOs, demonstrando elevada diferença entre as sequências de genes funcionais nestes ambientes sob distintos usos da terra.

No sítio sob floresta secundária (CAPOEIRA), o número de FPOs únicas para TPI e carvão pirogênico foi similar, demonstrando a importância da cobertura vegetal para a manutenção da diversidade das comunidades bacterianas funcionais do solo. Além disso, o número de FPOs compartilhadas neste sítio foi bastante inferior ao número encontrado no Caldeirão sob cultivo agrícola, demonstrando a influência da atividade agrícola nas comunidades microbianas envolvidas em processos metabólicos fundamentais nos solos antrópicos, como a ciclagem de nutrientes e a dinâmica da matéria orgânica.

Em seguida às análises de diversidade e riqueza de espécies, foram obtidos os agrupamentos (*clusters*) entre as sequências de dioxigenases de TPI e carvão pirogênico com o banco de proteínas Pfam (pfam.sanger.ac.uk/), com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas entre estas e as enzimas disponíveis em bancos públicos de sequências. Uma vez que o pirosequenciamento produz grande quantidade de dados, é necessário agrupar as sequências para reduzir o número de análises.

Para isto, foram selecionadas 693 sequências com mais de 350 aminoácidos a partir do banco de dados de proteínas, que possuem ambos os domínios Rieske (PF00355) e Ring_hydroxyl_A (PF00848), contemplados pelos *primers* BPHD utilizados neste estudo.

Foram gerados 727 e 871 *clusters* distintos a partir da matriz de dissimilaridade (94% ao nível de aminoácido) com as sequências de dioxigenases de solo e carvão pirogênico dos sítios do Caldeirão-Capoeira e Cultivado, respectivamente, e as sequências do Pfam (Figura 4). Os *clusters* foram analisados separadamente e classificados como (i) novos grupos, compostos unicamente por sequências de TPI, carvão pirogênico e por ambos, (ii) *clusters* constituídos por dioxigenases do banco de dados e TPI ou carvão, além de grupos mistos de sequências de TPI, carvão pirogênico e Pfam, e finalmente, (iii) *clusters* que incluíram somente sequências do banco de dados.

As porcentagens de *clusters* únicos para TPI, bem como exclusivos de carvão, foram maiores do que os

valores encontrados para os grupos mistos entre estas amostras, fato que demonstra que grupos bacterianos distintos são encontrados nestes dois ambientes. Estes *clusters*, constituídos unicamente por dioxigenases descritas neste estudo, incluíram a maioria das sequências analisadas.

A PCR quantitativa em tempo real permitiu a quantificação do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA em amostras de solo e carvão dos sítios de Terra Preta, além da quantificação do gene catabólico de dioxigenases aromáticas nas amostras analisadas (Figura 5). O número de cópias do gene ribossomal em amostras tanto de TPI quanto de carvão foi muito similar para ambos os sítios.

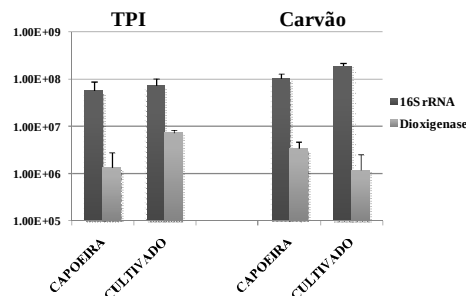


Figura 5. Gráfico com a quantificação (abundância relativa) dos genes 16S rRNA e dioxigenases aromáticas nas amostras de solo TPI e carvão dos sítios (indicados no eixo horizontal) analisados por PCR quantitativo. Eixo vertical: escala logarítmica (cópias do gene g^{-1}). Barra de erros representa o erro padrão ($n=3$)

Em relação ao gene catabólico, foi possível observar maior número de cópias do gene em amostras de carvão no sítio CAPOEIRA. Este dado sugere que o carvão pirogênico pode favorecer a sobrevivência e a diversidade de populações funcionalmente ativas em solos TPI. As Terras Pretas apresentam elevado grau de resiliência da fertilidade, e esse fenômeno pode estar diretamente relacionado às comunidades microbianas funcionais envolvidas na ciclagem de carbono e nitrogênio.

No sítio sob cultivo, a maior abundância do gene foi encontrada no solo, demonstrando a influência do uso da terra na diversidade de comunidades microbianas do solo.

Os resultados apresentados neste estudo sobre a diversidade de genes funcionais nas Terras Pretas da Amazônia produziram informação não reportada anteriormente acerca do papel da comunidade bacteriana em processos metabólicos relacionados à fertilidade destes solos.

CONCLUSÕES

1. A técnica de pirosequenciamento permite a detecção robusta da diversidade de genes funcionais ainda não reportados em solos TPI na Amazônia.

2. A abundância relativa de genes catabólicos detectados por PCR quantitativo demonstra o papel do carvão pirogênico na sustentação da qualidade biológica destes solos antrópicos.

3. As diferenças nas proporções dos *clusters* que incluíram as sequências exclusivas deste estudo (i)

demonstram a enorme complexidade de dioxigenases ambientais, principalmente em solos tropicais como as TPI.

4. As abordagens metagenômicas baseadas em genes específicos, como utilizado neste estudo, aplicadas a solos TPI sob diferentes sistemas de uso da terra, possibilitam a verificação da influência da atividade agrícola nas comunidades microbianas do solo.

5. O carvão pirogênico desempenha um papel importante na manutenção da diversidade de populações funcionais associadas a processos específicos na superfície do horizonte antrópico das TPI.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; ao CNPq-Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Ao Dr. Julio Franchini, pela contribuição nas análises.

REFERÊNCIAS

- KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-45.
- GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 362, p. 187-196, 2007.
- WACKETT, L.P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 41259-41262, 2004.
- IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxigenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

Tabela 1. Dados do pirosequenciamento das amostras de solos TPI e carvão pirogênico

Caldeirão TPI site	Source	Barcode Name	Barcode Sequence	sequences match barcode	sequences average length	valid sequences*	% valid sequences*
CAPOEIRA	TPI	MID109	TCTGTCTCGC	2401	457	1923	86.43%
CULTIVADO	TPI	MID110	TGAGTGACGC	3279	463	2428	85.95%
CAPOEIRA	Carvão	MID115	ACTCACAGAG	2975	455	2610	92.42%
CULTIVADO	Carvão	MID116	AGACTCAGCG	2882	463	2396	90.86%

*Sequências que passaram pelos processos de filtragem inicial e correção de frameshifts

Tabela 2. Medidas de riqueza e índices de diversidade para os sítios do Caldeirão sob capoeira e cultivo agrícola

Sítio TPI (Caldeirão)	Fonte	FPOs*	Medidas de riqueza*			Índices de Diversidade*	
			Chao1	ACE	Jackknife	Shannon	Simpson
CAPOEIRA	TPI	153	225,73 ± 71,68	294,60 ± 68,10	255,10 ± 56,53	3,28 ± 0,11	0,09 ± 0,011
	Carvão	151	212,00 ± 59,24	284,57 ± 67,75	217,53 ± 33,71	2,32 ± 0,12	0,32 ± 0,028
CULTIVADO	TPI	237	353,00 ± 96,09	334,42 ± 62,72	417,80 ± 91,97	3,98 ± 0,10	0,06 ± 0,010
	Carvão	194	300,50 ± 99,69	276,82 ± 60,08	321,32 ± 62,62	3,45 ± 0,11	0,14 ± 0,019

*Medidas de heterogeneidade calculadas com base em 94% de similaridade entre as sequências de genes de dioxigenases de *Bacteria* para as amostras de TPI e de carvão pirogênico (cutoff 0,06). Os desvios padrão estão mostrados na tabela. FPOs: Famílias Protéicas Operacionais.

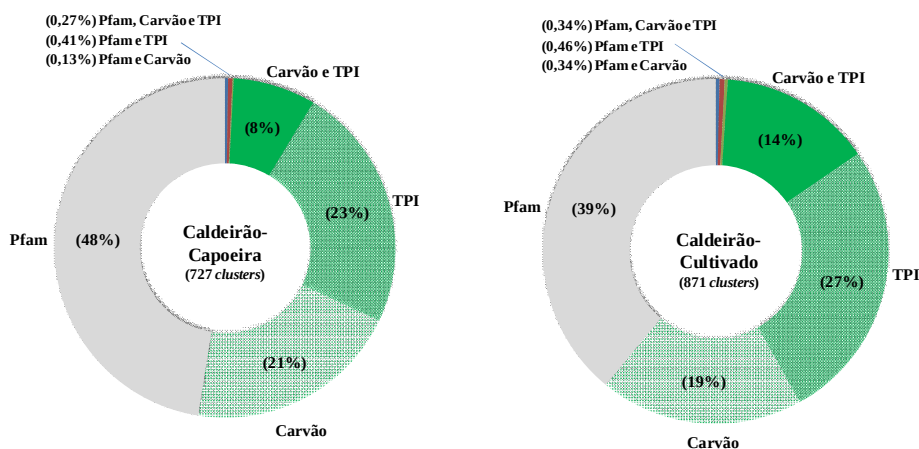


Figura 4. Gráficos de abundância relativa dos agrupamentos (*clusters*) formados entre as sequências de dioxigenases de TPI e carvão pirogênico e proteínas do banco de dados (Pfam), com dissimilaridade de 94% (cutoff 0,06) ao nível de aminoácido. Números entre parênteses: porcentagem de *clusters* em cada sítio