

Metagenoma das comunidades microbianas presentes na rizosfera e raízes de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P

Eliane Aparecida Gomes⁽¹⁾; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽²⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽¹⁾; Roberto Willians Noda⁽¹⁾; Bangzhou Zhang⁽³⁾; James Tiedje⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Pesquisadora; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; eliane.a.gomes@embrapa.br; ⁽²⁾ Analista; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Estudante de doutorado; Michigan State University, East Lansing, MI, USA ⁽⁴⁾ Professor; Michigan State University, East Lansing, MI, USA.

RESUMO: A comunidade microbiana é responsável por importantes processos de ciclagens de nutrientes que podem influenciar a qualidade do solo, a produtividade das culturas e a sustentabilidade ambiental. Bactérias e fungos participam da solubilização e mineralização de nutrientes, principalmente fósforo (P), podendo atuar também no aumento da absorção deste nutriente pelas plantas. O presente trabalho tem como objetivo analisar, por metagenoma, a comunidade de fungos e bactérias associada às raízes e rizosfera de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P, cultivados em solos com alto e baixo nível deste nutriente. DNA foi extraído das raízes e do solo rizosférico e as sequências de DNA obtidas (16S rDNA de bactérias e ITS rDNA de fungos) foram identificadas taxonomicamente e agrupadas pelo método de análise de coordenadas principais (PCoA). Foi observada uma separação dos microrganismos em quatro grupos, correspondendo àqueles presentes no solo rizosférico e nas raízes, sendo estes novamente separados em baixo e alto nível de P no solo. As análises de diversidade mostraram que a rizosfera apresenta maior número de espécies e maior índice de diversidade em comparação com as raízes, tanto para bactérias quanto para fungos, indicando que as plantas selecionam as comunidades microbianas que colonizam suas raízes. Pela identificação taxonômica dos microrganismos, foi possível concluir que o nível de P no solo e o respectivo habitat dos microrganismos (raízes ou solo rizosférico) foram mais importantes na distribuição das comunidades microbianas do que os genótipos avaliados.

Termos de indexação: Sequenciamento de DNA de nova geração, Illumina, diversidade microbiana.

INTRODUÇÃO

O milho apresenta uma alta taxa de crescimento e uma elevada demanda por nutrientes, sendo o

fósforo (P) um dos nutrientes mais importantes para o seu crescimento e desenvolvimento, pois é o segundo mineral que mais limita a produção de grãos, depois do nitrogênio (Novais et al, 2007).

Sabe-se que as raízes de milho apresentam frequentemente, interações com microrganismos benéficos, como as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (Oliveira et al., 2009a; 2009b; Jorguera et al., 2011; Mander et al., 2012) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que têm uma importante função na solubilização, mineralização, aquisição e na mobilização de nutrientes do solo, principalmente P (Smith & Read, 2008). Portanto, uma maior compreensão da diversidade de microrganismos que vivem na rizosfera e nas raízes de plantas de milho eficientes no uso de P poderá favorecer a seleção e identificação de estirpes potencialmente úteis para disponibilizar este nutriente para as plantas. Tal estratégia pode ser obtida tanto pelo manejo das populações microbianas nativas dos solos, quanto pela adição de inoculantes.

Recentemente, o desenvolvimento de técnicas de metagenoma do solo permitiu aos pesquisadores ter uma ideia mais completa das comunidades microbianas do solo e, assim, entender melhor suas interações com as plantas (Li et al., 2012; Marcina et al., 2013; Peiffer et al., 2013). Além disso, o alto poder de resolução destas técnicas permite a análise de grupos de microrganismos raros, não detectados por outras técnicas ou aqueles que não crescem nos meios de cultura disponíveis. O presente trabalho tem como objetivo analisar, por metagenoma, a comunidade de fungos e bactérias associada às raízes e rizosfera de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P, cultivados em solos com alto e baixo nível deste nutriente.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos e amostragens

Duas linhagens de milho, L3 eficiente e L22 ineficiente no uso de P e o cruzamento entre estas

duas linhagens foram cultivados em solos com baixo (4 mg P.dm^{-3}) e alto nível de P (30 mg P.dm^{-3}) em um delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições. Na fase de florescimento, 60 dias após o plantio, amostras de raízes e de solo rizosférico foram coletadas e lavadas em uma solução de 0,1 % (m/v) de pirofosfato de sódio. DNA foi extraído do solo rizosférico utilizando o kit Power Soil DNA (MoBio Laboratories, Inc., USA) e das raízes lavadas utilizando o kit DNAeasy (Qiagen, Alemanha).

Sequenciamento de DNA

A amplificação do DNA foi feita utilizando o DNA das raízes e rizosfera separadamente e o kit AccuPrime™ Pfx SuperMix (Life Technologies, USA). Foram utilizados primers que amplificam um fragmento de 291 pb da região hipervariável V4 do rDNA 16S de bactérias e os primers ITS_9 e ITS_4 que amplificam um fragmento de tamanho variável (de 150 a 400 pb) da região ITS de fungos, com a adição de uma sequência de código de barras e os adaptadores requeridos para sequenciamento Illumina. O DNA amplificado foi enviado ao JGI/DOE (Joint Genome Institute do Departamento de Energia dos Estados Unidos, CA) para sequenciamento, utilizando o equipamento MiSeq Illumina (Illumina, Inc., CA, USA).

Análise dos dados

As sequências foram filtradas quanto à qualidade das bases e tamanho, além de uma etapa de triagem dos primers e adaptadores utilizando o programa UCHIME (Edgard et al., 2011). Em seguida, as sequências contendo os códigos de barra foram selecionadas e sujeitas à análise dos grupos taxonômicos pelo uso do "Naïve Bayesian Classifier v.2.1" do Ribosomal Database Project (rdp.cme.msu.edu). O alinhamento das sequências, inferência de riqueza e comparação de bibliotecas foram feitos utilizando-se o pacote Mothur (Schloss et al., 2009). Por meio destas ferramentas, os Índices de Chao, Simpson e de Shannon foram utilizados para determinação da alfa diversidade e os índices de Unifrac e Bray-curtis foram utilizados para análise de coordenadas principais (PCoA) para 16S rDNA gene e ITS, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 3.773.407 e 2.516.453 sequências foram selecionadas a partir da análise das regiões 16S rDNA e ITS, respectivamente, após a etapa de filtragem das sequências de má qualidade e de contaminantes. Após a separação em OTUs (unidades taxonômicas operacionais) e identificação taxonômica, as sequências de DNA foram agrupadas pelo método de análise de coordenadas principais (PCoA). A comunidade de fungos e

bactérias da rizosfera foi claramente separada em quatro grupos, correspondendo aos microrganismos presentes nas raízes e rizosfera dos genótipos, sendo estes novamente separados em baixo e alto nível de P no solo (Figura 1). As análises de alfa diversidade mostraram que a rizosfera apresenta maior número de espécies e maior índice de diversidade de Shannon e de Simpson em comparação com as raízes, tanto para bactérias quanto para fungos, mostrando que as plantas selecionam as comunidades microbianas que colonizam suas raízes (Tabelas 1 e 2).

A rizosfera foi preferencialmente colonizada por bactérias dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes e as raízes por Cyanobacteria, Proteobacteria e Tenericutes. Entre os gêneros dominantes de bactérias na rizosfera incluem-se *Pseudomonas*, *Leclercia*, *Burkholderia*, *Kaistobacter*, *Ralstonia* e *Diaphorobacter*, e nas raízes *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Cytophaga*, *Ralstonia* e *Bradyrhizobium* (Figura 2). Além da diferença entre as comunidades que habitam a rizosfera em comparação com as raízes, o nível de P no solo também influenciou a distribuição da comunidade bacteriana. Membros de *Burkholderia* e *Ralstonia* foram enriquecidos no solo rizosférico com baixo nível de P, enquanto que *Pseudomonas* e *Leclercia* foram predominantes na rizosfera com alto nível deste nutriente. Nas raízes do genótipo L22 cultivado em alto nível de P, podemos observar a presença de um alto número de Candidatus Phytoplasma (Figura 2).

Dentre os fungos, foram observados um total de 455 gêneros distribuídos em 158 famílias, 75 ordens, 20 classes e 6 filos. Ascomycota foi o filo predominante tanto na rizosfera quanto nas raízes (89% e 82%, respectivamente).

O gênero dominante nas raízes foi *Prathoda*, seguido por *Exophiala* e *Phaeococcomyces* enquanto que no solo os gêneros foram distribuídos mais uniformemente. Os 10 e 20 gêneros mais comuns contribuíram com 41,8% e 55,4% de todas as sequências, respectivamente, como evidenciado na Figura 3.

O filo Glomeromycota (fungos micorrízicos) foi representado por 1% na rizosfera e 5% nas raízes e os gêneros *Scutellospora* e *Gigaspora* foram predominantes principalmente em milho cultivado em baixo P. Ao contrário, *Glomus* foi mais frequente nas raízes e *Entrophospora* na rizosfera dos tratamentos com alto P no solo (Figura 4).

CONCLUSÕES

A população de fungos e bactérias que habita as raízes dos genótipos contrastantes de milho é diferente da população da rizosfera.

O teor de P no solo influencia a composição da comunidade de fungos e bactérias presentes nas raízes e na rizosfera dos genótipos de milho.

Os principais fatores que determinam a diversidade microbiana são o habitat (raiz ou rizosfera), seguido pelo nível do P no solo.

Os genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P não são determinantes na composição da comunidade de bactérias e fungos presentes na rizosfera e raízes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Embrapa, Fapemig, Great Lakes Bioenergy Research Center e Michigan State University (USA).

REFERÊNCIAS

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v.27, p.2194-2200, 2011.

JORGUERA, M.A.; CROWLEY, D.E.; MARSCHNER, P.; GREINER, R.; FERNANDEZ, M.T.; ROMERO, D.; MENEZES-BLACKBURN, D.; MORA, M.L. Identification of propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.75, p.163-172, 2011.

LI R.; KHAFIPOUR E.; KRAUSE D.O.; ENTZ M.H.; DE KIEVIT T.R.; DILANTHA FERNANDO W.G. Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. **Plos One**, v.7, p.1-6, 2012.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; CONDRON, L.; O'CALLAGHAN, M. Incidence and diversity of phosphate solubilizing bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.44, p.93-101, 2012.

MARCINA, C.; MARCIN, G.; JUSTYNA, M-P.; KATARZYNA, K; MARIA, N. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. **Applied Soil Ecology**, v.64, p.7-14, 2013.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.471-550

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S.; CARNEIRO, N.P.; Guimarães, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1782-1787, 2009a.

OLIVEIRA, C.A., SA, N.M.H., GOMES, E.A., MARRIEL, I.E., SCOTTI, M.R., GUIMARAES, C.T., SCHAFFERT, R.E., ALVES, V.M.C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied and Soil Ecology**, v. 41, p.249-258, 2009b.

SCHLOSS P.D.; WESTCOTT S.L.; RYABIN T.; HALL J.R.; HARTMANN M.; HOLLISTER E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY B.B.; PARKS D.H.; ROBINSON C.J.; SAHL J.W.; STRES B.; THALLINGER G.G.; VAN HORN D.J.; WEBER, C.F. Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7537-7541, 2011.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3. ed. New York: Academic Press, 2008. 787 p.

PEIFFER, JA; SPOR, A., KOREN, O; JIN, Z; TRINGE, SG; DANGL, JL; BUCKLER, ES; LEY, RE. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.110, p.6548-6553, 2013.

Figuras e Tabelas

Tabela 1 - Índices de diversidade observados entre as bactérias nos diferentes tratamentos.

Amostras	Chao *	Especies obs	Shannon	Simpson
L3xL22PS	780 ^c	751 ^d	6.827 ^e	0.970 ^c
L3xL22S	750 ^c	709 ^d	7.057 ^e	0.977 ^c
L3PS	747 ^c	716 ^d	6.140 ^d	0.932 ^c
L3S	719 ^c	691 ^c	6.750 ^e	0.967 ^c
L22S	714 ^c	669 ^c	6.882 ^e	0.972 ^c
L22PS	710 ^c	629 ^c	4.692 ^d	0.887 ^c
L3xL22PR	673 ^c	593 ^b	3.135 ^b	0.650 ^b
L3PR	628 ^b	543 ^b	3.707 ^c	0.740 ^b
L22PR	625 ^b	529 ^b	3.057 ^b	0.695 ^b
L3xL22R	618 ^b	534 ^b	3.377 ^b	0.690 ^b
L3R	595 ^b	474 ^a	2.552 ^a	0.597 ^a
L22R	519 ^a	417 ^a	2.182 ^a	0.535 ^a

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.

Tabela 2 - Índices de diversidade observados entre os fungos nos diferentes tratamentos.

Amostras	Chao *	Especies obs	Shannon	Simpson
L22PS	582 ^b	500 ^b	6.243 ^c	0.969 ^c
L22S	689 ^c	607 ^c	5.954 ^c	0.953 ^c
L3PS	617 ^b	524 ^b	5.901 ^c	0.960 ^c
L3S	717 ^c	626 ^c	5.690 ^c	0.928 ^c
L3xL22PS	667 ^c	548 ^b	5.687 ^c	0.952 ^c
L3xL22S	783 ^c	676 ^c	5.648 ^c	0.943 ^c
L22R	484 ^a	411 ^a	4.904 ^b	0.894 ^b
L3R	465 ^a	385 ^a	4.562 ^b	0.891 ^b
L22PR	413 ^a	339 ^a	4.366 ^b	0.860 ^b
L3xL22PR	416 ^a	331 ^a	4.050 ^a	0.831 ^a
L3PR	398 ^a	318 ^a	3.754 ^a	0.839 ^a
L3xL22R	434 ^a	358 ^a	3.673 ^a	0.800 ^a

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.

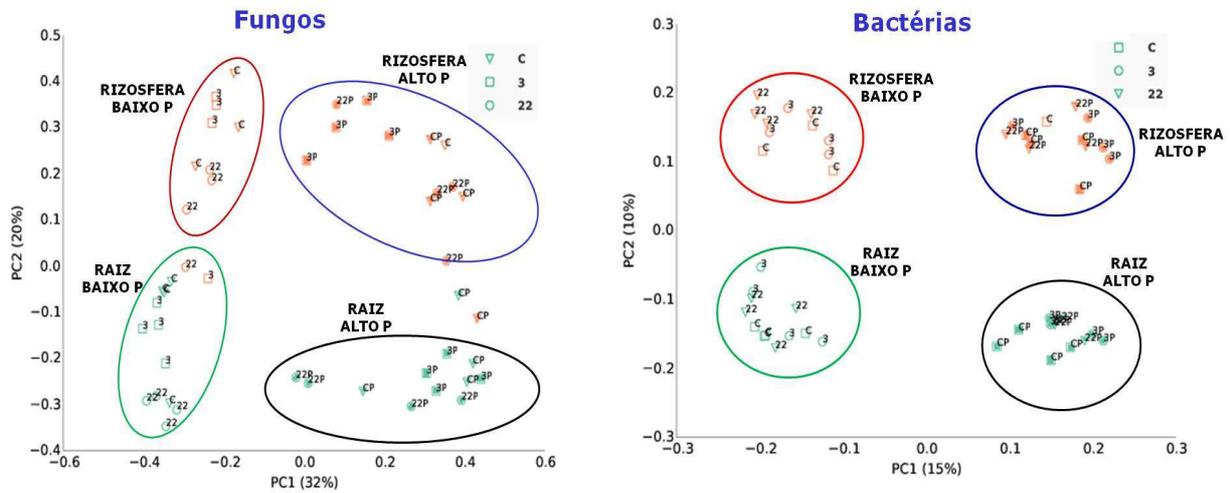


Figura 1 – Ordenação das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de fungos e de bactérias por gênero por análise de coordenadas principais (PCoA). C: L3xL22, 3: linhagem L3, L22: linhagem L22.

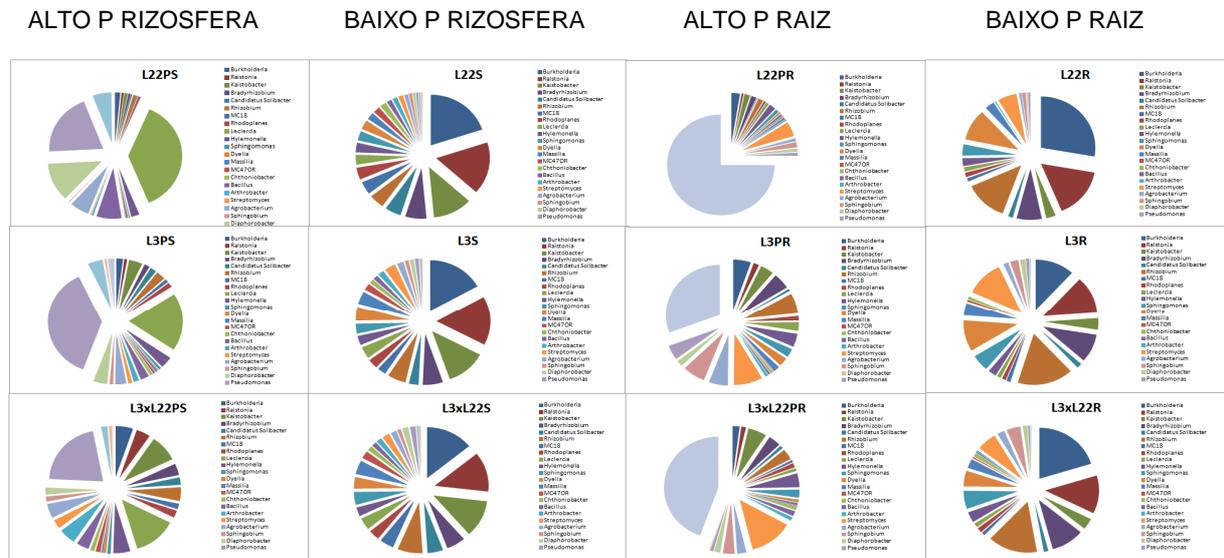


Figura 2 – Distribuição dos fungos classificados por gênero nos diferentes tratamentos.

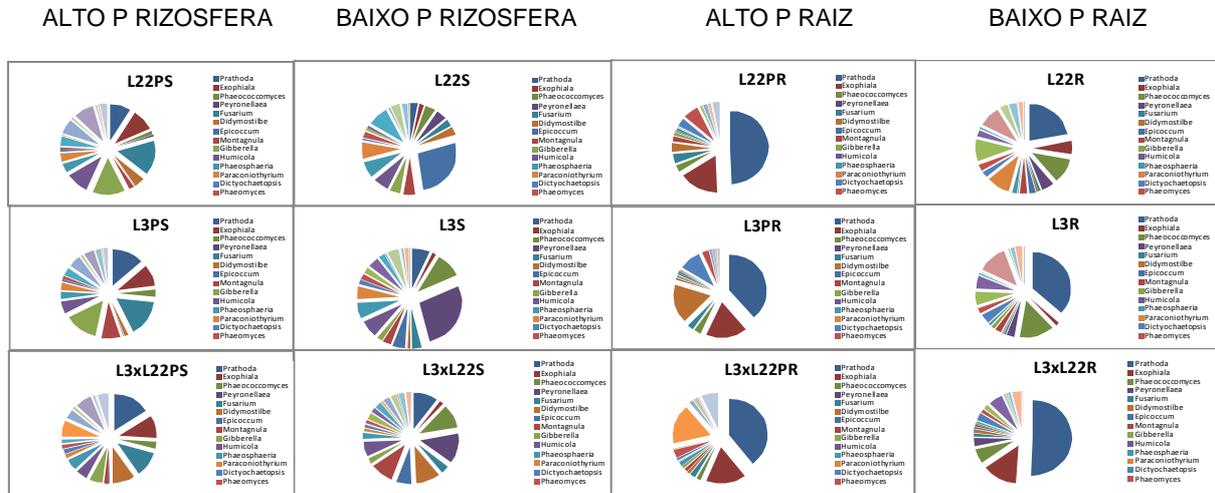


Figura 3 – Distribuição das bactérias classificadas por gênero nos diferentes tratamentos.

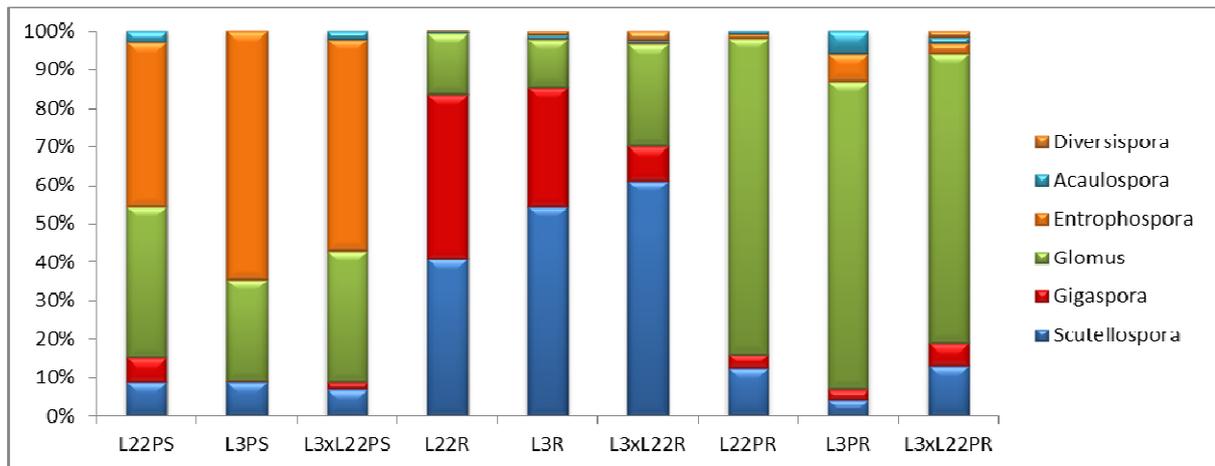


Figura 4 – Distribuição dos fungos micorrízicos arbusculares por gênero nos diferentes tratamentos. Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 2.