

## ESTUDO DA INTERAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DA TERRA PRETA DA AMAZÔNIA COM O FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.).

Lucas R. de Oliveira<sup>1\*</sup>, Juliane K. Ishida, Tsai Siu Mui<sup>1</sup>

1. Estudante de IC do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP

1. Pesquisadora Pós-Doutoranda do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP

. Professora Titular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP/ Orientadora

### Resumo:

*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP) causa a murcha-de-fusário em feijoeiro e a Terra Preta da Amazônia (TPA) possui alta diversidade de microrganismos, assim, avaliamos se a comunidade microbiana desse solo é capaz de inibir os efeitos de FOP e também se pode atuar na produção de biomassa da planta. Os genótipos IAC Alvorada e IAC Milênio foram cultivados em hidroponia e infectados com FOP. Então analisou-se: comprimento, massa fresca e seca radicular e da parte aérea, volume de raízes e a absorção de macro e micronutrientes. Houveram acréscimos nos parâmetros avaliados para os dois genótipos quando cultivados em suspensão com o microbioma residente em TPA, mesmo na presença de FOP. Associado têm-se a maior quantidade de micronutrientes absorvidos quando cultivados em TPA, que pode justificar os incrementos. Os dados indicam que a comunidade microbiana da TPA auxilia na promoção do crescimento dos dois genótipos avaliados e é capaz de minimizar os efeitos negativos de FOP.

**Palavras-chave:** Promoção do crescimento; solo supressivo; microrganismos.

**Apoio financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** USP

### Introdução:

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a segunda cultura de leguminosa mais importante do mundo (Singh; Muñoz, 1999), ainda é figura central na dieta de mais de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo e a principal fonte de proteínas para populações na América Latina e África. (Pfeiffer; McClafferty, 2007; Recchia et al. 2013). Contudo, fatores como doenças causadas por microrganismos impedem que haja maior produtividade (Sartorato; Rava, 1994). Dentre elas destaca-se a murcha-de-fusário causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP), a qual atinge o sistema radicular da planta e é considerada a doença de solo mais importante que afeta o feijoeiro (Chiorato et al., 2015; Henrique et al. 2015).

A fim de evitar que a cultura seja afetada por patógenos e garantir a alta produtividade, pode buscar-se nos solos supressivos solução útil para tal problema, sendo que esta é uma propriedade conferida pela comunidade microbiana residente através de mecanismos não conhecidos (Mendes et al., 2011). Nesse contexto destaca-se a Terra Preta da Amazônia (TPA), que é um antropossolo resultante da gestão de resíduos humanos, com os primeiros sítios datados de seis mil anos atrás (Kern et al. 2004; Clements et al. 2015). Este solo apresenta coloração escura, dada pelos descartes domésticos, rituais e produção agrícola que modificaram o solo local; havendo artefatos de cerâmica e material orgânico decomposto (Sombroek et al. 2009; Grossman et al. 2010; Clements et al. 2015).

A TPA é um solo que apresenta alta fertilidade química, com altos níveis de fósforo, cálcio, magnésio, zinco, manganês e rico em matéria orgânica, além de possuir o pH mais alcalino que os solos adjacentes (Grossman et al. 2010; Lima et al. 2015). Destaca-se também sua alta diversidade e riqueza de microrganismos (Taketani et al. 2013; Lucheta et al. 2015). Esses organismos são atuantes na composição e incorporação de elementos minerais no solo, também importantes no desenvolvimento das plantas e nos ciclos biogeoquímicos do carbono e nitrogênio (Germano et al. 2012).

Assim sendo, tivemos o objetivo de avaliar se a comunidade microbiana da TPA é capaz de promover o crescimento em dois genótipos de feijoeiro com diferentes níveis de resistência a FOP: Alvorada e IAC Milênio; também avaliamos se esta comunidade pode inibir a influência negativa de FOP no sistema radicular da planta, e verificamos a absorção de nutrientes quando na presença e ausência do microbioma e também do referido fungo.

### Metodologia:

Foram utilizando dois genótipos de feijoeiro nos experimentos: IAC Milênio que é resistente a FOP e IAC Alvorada que é suscetível. As superfícies das sementes foram esterilizadas em 0,1%(v/v) de Triton X-100, 70%(v/v) de etanol e 10%(v/v) de solução comercial de hipoclorito de sódio e por fim água deionizada abundante. Posteriormente, foram germinadas em papel umedecido por quatro dias e transferidas para crescimento em hidropônia, sendo as plântulas inseridas em tubos plásticos de 1.5 mL com os fundos removidos manualmente, fixados em placa de EVA (do inglês, *Ethylene Vinyl Acetate*), colocadas em potes com volume aproximado de dois litros e para assegurar aeração do sistema foram anexados compressores de ar, ficando o mesmo em sala de vegetação a 25±2 °C sob fotoperíodo de 12 horas. No sistema havia a

presença ou ausência de suspensão de TPA ( $10\text{g}$  de solo. $100\text{mL}^{-1}$  de água Milli-Q), sendo que nas duas situações foram adicionadas solução nutritiva (0.25X Hoagland – Sigma, H2395) e mantidas em agitação constante durante 30 minutos, então sedimentado por 24 horas e filtrado com auxílio de uma tela de serigrafia (diâmetro do poro  $\pm 150\ \mu\text{m}$ ); para a situação de ausência do microbioma presente no solo, após a filtragem a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, afim de eliminar os microrganismos e permanecer apenas com os nutrientes dissolvidos. Após sete dias da semeadura cerca de 1/3 das raízes foram cortadas e imersas em suspensão de esporos ( $10^6$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ ), previamente preparada a partir de cultura monoesporágica cultivada em placas de *Petri* por oito a dez dias. Após 14 dias da infecção com FOP foram coletadas quatro repetições biológicas, com pelo menos duas plantas em cada repetição.

Para verificar a influência da presença da comunidade microbiana da TPA avaliou-se a massa fresca e seca das raízes e parte aérea das plantas; o comprimento radicular e da parte aérea, sendo as plantas fotografadas e então avaliado utilizando o software *ImageJ* ([HTTP://imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij)) e por fim, verificou-se o volume de raízes, o qual foi obtido a partir de análises utilizando o software *WinRhizo*. Os parâmetros foram analisados em *Microsoft Office Excel* e *Past* submetidos a teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) aplicado para constatar se as diferenças foram significativas.

Para determinação de macro e micronutrientes as amostras vegetais foram moídas em moinho criogênico (*SPEX 6870 Freeze Mill*) e posteriormente decompostas por radiação micro-ondas (*ETHOS 1600 Milestone Microwave*). Cada amostra foi digerida em triplicata, sendo que em 250mg do material seco e moído foi adicionado 20%(v/v)  $\text{HNO}_3$  e 30%(m/m)  $\text{H}_2\text{O}_2$  e após a decomposição a solução foi transferida para tubos tipo *Falcon* e completado o volume de 25 mL com água Milli-Q. As determinações de macro e micronutrientes nas amostras digeridas foram realizadas através da espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, utilizando o equipamento iCap 7400 Duo (*Thermo Scientific*).

### Resultados e Discussão:

A comunidade microbiana do solo pode influenciar o estado nutricional das plantas, exercendo papéis na facilitação da absorção e na translocação de minerais e nutrientes do solo para a planta (Mendes, 2013). A interação dos microrganismos com as plantas pode ser dada de maneira direta ou indireta. As rizobactérias e os fungos micorrízicos são exemplos bem conhecidos da influência direta de microrganismos em plantas na promoção do crescimento/desenvolvimento do vegetal (Hawkins et al., 2000; Adeleke et al., 2012). Indiretamente ainda a comunidade microbiana pode atuar aumentando a disponibilidade de nutrientes para a absorção pelas plantas através da mineralização que converte a matéria em formas inorgânicas assimiláveis (van der Heijden et al., 2007). Assim, observamos neste trabalho que no genótipo IAC Alvorada todos os parâmetros avaliados apresentaram aumentos quando na presença da comunidade microbiana, sendo os acréscimos de 28% na massa fresca da parte aérea e 44% nas raízes; 40 e 54% na massa seca da parte aérea e sistema radicular, respectivamente; quanto ao comprimento houve aumento de 37% na parte aérea e 51% no sistema radicular e por fim o volume de raízes foi incrementado em 54%. Quanto ao genótipo IAC Milênio, na presença do microbioma de TPA, os aumentos foram de 20% na massa fresca da parte aérea e 41% nas raízes; 27% na massa seca da parte aérea e 46% no sistema radicular; o comprimento da parte aérea teve acréscimo de 29% e o radicular de 23%, e o volume de raízes foi acrescido em 53%. Os valores médios para tiveram significância confirmada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Observamos ainda que para o genótipo IAC Alvorada, tanto na parte aérea quanto nas raízes, a absorção de macronutrientes foi menor quando na presença do microbioma de TPA que na situação oposta, com exceção de Ca no sistema radicular. No mesmo genótipo também vimos que dos micronutrientes adquiridos Al, B, Mn e Fe apresentaram-se em maior quantidade na presença de TPA na parte aérea e Al, Mn e Fe tiveram o mesmo resultado no sistema radicular. Quanto a IAC Milênio, notamos que na parte aérea os dados de macronutrientes foram semelhantes a IAC Alvorada, com exceção feita a Mg que também foi mais presente nas raízes, assim como Ca; por sua vez Al, Mn e Fe na parte aérea e Al, B, Cu, Mn e Fe no sistema radicular apresentaram maior absorção sem a presença do microbioma de TPA. Tomando os dados obtidos, pode-se entender que a comunidade microbiana de TPA interagiu de forma positiva e contribuiu para o crescimento do feijoeiro, possivelmente pela facilitação da captação e assimilação de micronutrientes com auxílio de microrganismos ou mesmo devido maior disponibilidade natural destes nutrientes no solo. Destaca-se com isso a importância da manutenção das condições químicas, físicas e biológicas desse tipo de solo, pois a intensificação de práticas agrícolas tem afetado a riqueza de microrganismos no solo.

Sabendo que FOP afeta o desenvolvimento radicular e tendo em vista as características de supressividade observadas por comunidades locais, analisamos se os mesmos parâmetros foram afetados quando o feijoeiro foi infectado. O genótipo IAC Alvorada, que é considerado suscetível a FOP, mesmo quando infectado apresentou aumentos de 31% na massa fresca da parte aérea, 24% na massa seca da parte aérea, 35% na massa fresca de raízes, 46% na massa seca de raízes, 16% no comprimento da parte aérea, 48% no comprimento do sistema radicular e 45% no volume de raízes. Em IAC Milênio, que é resistente a FOP, também notamos o aumento em alguns parâmetros, havendo acréscimos de 51% na massa fresca de raízes, 32% na massa seca de raízes, 34% no comprimento do sistema radicular e 55% no volume de raízes. Todos os dados tiveram significância conforme teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Assim, notamos que a microbiota minimiza a influência do fungo patógeno sobre a planta hospedeira tanto em IAC Milênio, quanto em IAC Alvorada. E ainda sabendo-se que na presença de FOP o feijoeiro tem o seu sistema vascular colonizado e há um prejuízo no transporte de água e nutrientes na planta (Alves-Sanchez et al., 2002), avaliamos a absorção de nutrientes nas situações de ausência e presença de FOP, sem a interferência da comunidade microbiana da TPA e vimos que

sem o patógeno Mg e Ca apresentaram-se em maior quantidade na parte aérea e, com exceção de Ca, todos os macronutrientes comportaram-se igual no sistema radicular para IAC Alvorada; e neste ainda os micronutrientes: Al na parte aérea e B, Zn e Cu no sistema radicular têm maior quantidade na situação sem o patógeno. Com relação a IAC Milênio, de todos os macronutrientes analisados sem a presença do patógeno, apenas Ca na parte aérea obteve maior absorção e com diferença estatística significativa se comparado com a situação na presença de FOP; ao passo que dos micronutrientes Al e Cu na parte aérea e B no sistema radicular tiveram o mesmo comportamento. Um dos mecanismos de resistência das plantas à murchas vasculares, tal como ocasionado por FOP, pode ser estrutural em que as barreiras físicas impedem a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos (Pascolati & Leite, 1995). Tendo em vista tal informação, pode-se supor que tal característica do tecido vegetal do feijoeiro contribui para a maior absorção dos nutrientes minerais pela planta quando na ausência de FOP e impede grande prejuízo mesmo quando este é presente, conforme também pode ser visto nos dados de crescimento.

### Conclusões:

Com base no conjunto de dados obtidos, concluiu-se que a comunidade microbiana de TPA interagiu de maneira positiva com os dois genótipos de feijoeiro utilizados neste trabalho e promoveu o seu crescimento, além disso, notou-se que ela atuou na minimização da influência negativa do fungo patógeno sobre a planta hospedeira; portanto, tem-se a hipótese inicial confirmada. Viu-se também que houve um aumento na assimilação de micronutrientes nos dois genótipos testados, mostrando que a facilitação de sua captação e assimilação com auxílio de microrganismos ou mesmo a maior disponibilidade natural no solo podem explicar a promoção do crescimento do feijoeiro observada.

### Referências bibliográficas

- Adeleke RA, Cloete TE, Bertrand A & Khasa DP (2012) Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. *Mycorrhiza* 22: 535–544.
- Alves-Santos, F., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagues, J., Martin-Dominguez, R., Garcia-Benavides, P., & Crespo, M. et al. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology*, 51(5), 605-611. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x>
- Chiorato, A., Carbonell, S., Bosetti, F., Sasserón, G., Lopes, R., & Azevedo, C. (2015). Common bean genotypes for agronomic and market-related traits in VCU trials. *Scientia Agricola*, 72(1), 34-40. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0172>
- Clement, C., Denevan, W., Heckenberger, M., Junqueira, A., Neves, E., Teixeira, W., & Woods, W. (2015). The domestication of Amazonia before European conquest. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1812), 20150813. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0813>
- Germano, M., Cannavan, F., Mendes, L., Lima, A., Teixeira, W., Pellizari, V., & Tsai, S. (2012). Functional diversity of bacterial genes associated with aromatic hydrocarbon degradation in anthropogenic dark earth of Amazonia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(5), 654-664. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2012000500004>
- Grossman JM, O'Neill BE, Tsai SM, Liang B, Neves E, Lehmann J, Thies JE (2010) Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. *Microb Ecol* 60:192–205.
- Hawkins HJ, Johansen A & George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 275–285.
- Henrique, F., Carbonell, S., Ito, M., Gonçalves, J., Sasserón, G., & Chiorato, A. (2015). Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli in common bean. *Bragantia*, 74(1), 84-92. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0265>
- Kern DC, Daquino G, Rodrigues T, Frazao F, Sombroek W, Myers T, Neves EG (2004) Distribution of Amazonian dark earths in the Brazilian Amazon. In: Lehmann J, Kern DC, Glaser B, Woods W (eds) Amazonian dark earths. Springer, Netherlands, pp 51–75.
- Lucheta, A., de Souza Cannavan, F., Roesch, L., Tsai, S., & Kuramae, E. (2015). Fungal Community Assembly in the Amazonian Dark Earth. *Microbial Ecology*, 71(4), 962-973. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0703-7>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., & Schneider, J. et al. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203980>
- Pascolati, S.F; Leite, B. (1995). Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. pp. 417-453.
- Pfeiffer, W., & McClafferty, B. (2007). HarvestPlus: Breeding Crops for Better Nutrition. *Crop Science*, 47(Supplement\_3), S-

88. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0020ipbs>

Recchia, G., Caldas, D., Beraldo, A., da Silva, M., & Tsai, S. (2013). Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal Of Molecular Sciences*, 14(4), 7155-7179. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14047155>

Sartorato, A., & Rava, C. (1994). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília, DF: Embrapa-SPI.

Singh, S., & Muñoz, C. (1999). Resistance to Common Bacterial Blight among *Phaseolus* Species and Common Bean Improvement. *Crop Science*, 39(1), 80. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183x003900010013x>

Sombroek, W. et al. (2009). *As terras pretas de índio na Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas*. Manaus: Embrapa.

Taketani, R., Lima, A., da Conceição Jesus, E., Teixeira, W., Tiedje, J., & Tsai, S. (2013). Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S rRNA gene 454 pyrosequencing. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104(2), 233-242. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-9942-0>

van der Heijden, M., Bardgett, R., & van Straalen, N. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>