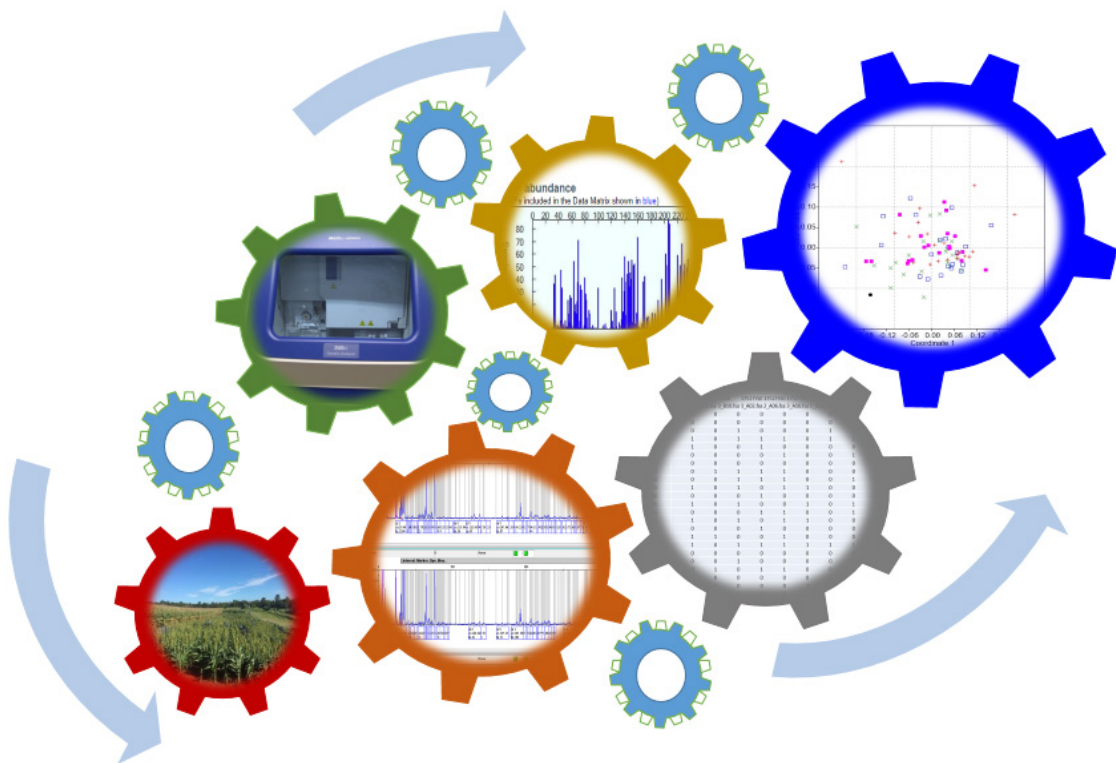


Otimização de Metodologia Baseada em T-RFLP para Estudo da Microbiota Rizosférica de Milho



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
218**

**Otimização de Metodologia Baseada
Em T-RFLP para Estudo da
Microbiota Rizosférica de Milho**

Mariana Lourenço Campolino
Raquel Gomes de Oliveira
Marielle de Paula Sousa
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Eliane Aparecida Gomes
Sylvia Morais de Sousa*

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2020*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretária-Executiva
Elena Charlotte Landau

Membros
Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria Cristina Dias Paes

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Ilustração da capa
Mariana Lourenço Campolino

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Otimização de metodologia baseada em T-RFLP para estudo da microbiota rizosférica de milho / Mariana Lourenço Campolino ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

22 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 218).

1. Comunidade microbiana. 2. Zea mays. 3. Rizosfera. I. Campolino, Mariana Lourenço. II. Oliveira, Raquel Gomes de. III. Sousa, Marielle de Paula. IV. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. V. Gomes, Eliane Aparecida. VI. Sousa, Sylvia Moraes de. VII. Série.

CDD 579.17 (21. ed

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	18
Referências	19

Otimização de Metodologia Baseada Em T-RFLP para Estudo da Microbiota Rizosférica de Milho

Mariana Lourenço Campolino

Raquel Gomes de Oliveira

Marielle de Paula Sousa

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Eliane Aparecida Gomes

Sylvia Morais de Sousa*

Resumo – O estudo da diversidade das comunidades microbianas rizosféricas tem grande importância para a compreensão de diferentes sistemas ecológicos e agrícolas. As técnicas moleculares baseadas em genes 16S rRNA, como o T-RFLP, são metodologias independentes de cultivo, robustas e reproduzíveis, que, além de identificar o perfil da comunidade microbiana, refletem a composição das populações numericamente dominantes em uma amostra. O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia de análise da técnica T-RFLP para a avaliação da diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização fosfatada. Foram propostas alterações no processo de amplificação do gene 16S rRNA, na digestão do fragmento amplificado, na filtragem dos picos verdadeiros pelo software T-REX e na análise estatística dos dados proposta por Trabelsi et al. (2017). O número médio de fragmentos encontrados neste estudo foi reduzido, uma vez que tais modificações permitiram maior acurácia dos resultados pela validação da presença dos picos verdadeiros. Além

1. Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ;

2. Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ;

3. Graduanda em Engenharia Química, Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM;

4. Químico, DSc em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo;

5. Bióloga, DSc em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo;

5. Bióloga, DSc em Genética e Biologia Molecular Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo. **Autora correspondente.**

disso, a adequação da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis remodelou a ordenação dos dados, possibilitando o uso do teste ANOSIM para a validação dos resultados. Essa adequação teve efeito significativo no valor do teste, resultando em uma maior acurácia da técnica T-RFLP, o que permitiu uma interpretação mais realista dos resultados de diversidade bacteriana rizosférica.

Termos para indexação: fertilização fosfatada; microbioma; rizosfera; T-RFLP.

Optimization of Methodology T-RFLP-Based for the Study of the Rhizospheric Maize Microbiota

Abstract – The study of the diversity of rhizospheric microbial communities is of great importance for the understanding of different ecological and agricultural systems. Molecular techniques based on 16S rRNA genes, such as T-RFLP, are culture-independent methods, robust and reproducible that in addition to identifying the profile of the microbial community, reflect the composition of numerically dominant populations in a sample. The aim of this work was to optimize the methodology analysis of the T-RFLP technique for the evaluation of the bacterial diversity of the rhizosphere of maize genotypes grown under different fertilization conditions. There were proposed changes in the amplification of the 16S rRNA gene in the digestion of the amplified fragment, filtration of true peaks by the T-REX software and statistical analysis of the data proposed by Trabelsi et al. (2017). The average number of fragments found in this study was reduced since these modifications allowed greater accuracy of the results by validation of the presence of true peaks. In addition, the adequacy of the Bray-Curtis dissimilarity matrix remodeled the ordering of the data, made it possible to use the ANOSIM test to validate the results. This adequacy had a significant effect on the test value, resulting in greater accuracy of the T-RFLP technique, allowing a more realistic interpretation of the results of rhizospheric bacterial diversity.

Index terms: phosphate fertilization; microbiome; rhizosphere; T-RFLP.

Introdução

O estudo e a compreensão da estrutura e da diversidade das comunidades microbianas rizosféricas têm sido aprimorados por métodos moleculares baseados nos genes 16S rRNA, como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer et al., 1993), análise de espaçador intergênico ribossômico automatizado (ARISA) (Fisher; Triplett, 1999) e polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) (Liu et al., 1997).

O T-RFLP é uma técnica independente de cultivo, robusta e reproduzível, que, além de produzir o perfil da comunidade microbiana, reflete a composição das populações numericamente dominantes em uma amostra (Liu et al., 1997; Osborn et al., 2000; Caffaro-Filho et al., 2007; Shyu et al., 2007). Por tudo isso, mesmo com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração, a técnica de T-RFLP continua sendo muito utilizada no campo da ecologia microbiana, particularmente no estudo da dinâmica de comunidades microbianas em relação aos efeitos de mudanças ambientais e para a análise de comunidades microbianas ambientais complexas (De Vrieze et al., 2018). O T-RFLP também vem sendo utilizado para análise da estrutura e diversidade da comunidade microbiana de ambientes agrícolas, em ambientes aquáticos, na análise da diversidade de fungos em solos de florestas, em análises comparativas da comunidade bacteriana intestinal de peixes, dentre outras aplicações (Cheng et al., 2016; Karczewski et al., 2017; Lindström et al., 2018; Munir et al., 2018; Kari et al., 2019).

Nos últimos anos, esta técnica tem sido empregada na amplificação dos genes de rRNA de subunidades pequenas do ribossomo (16S ou 18S) a partir de DNA total da comunidade por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em que um ou ambos os oligonucleotídeos são marcados com fluoróforos (Tiquia et al., 2005; Chauhan et al., 2011; Toju et al., 2012; Silva et al., 2017; Trabelsi et al., 2017). A mistura resultante dos fragmentos do gene rRNA pode ser digerida com uma ou mais enzimas de restrição, sendo os tamanhos e as abundâncias relativas dos fragmentos terminais (T-RFs) marcados com fluorescência determinados em um sequenciador de DNA automatizado. Uma vez que as diferenças nos tamanhos dos T-RFs refletem polimorfismos nas sequências dos genes 16S rRNA, populações filogeneticamente distintas de organismos podem ser avaliadas. Dessa forma, o pa-

drão dos T-RFs representa o conjunto de fragmentos de DNA que refletem a composição das populações numericamente dominantes na comunidade microbiana (Tiquia et al., 2005; Trabelsi et al., 2017).

Desde o surgimento do T-RFLP, alterações pontuais no modelo original da técnica (Liu et al., 1997) possibilitaram sua utilização em uma ampla variedade de estudos. Primeiramente, a ampliação do uso de oligonucleotídeos relacionados com as regiões ribossomais 16S e 18S, diversificação de enzimas de restrição e meios de validação dos resultados resultaram em um maior número de fragmentos, promovendo maior sensibilidade à técnica (Tiquia et al., 2005; Silva et al., 2017; Trabelsi et al., 2017; De Vrieze et al., 2018).

Em 2017, Trabelsi e colaboradores apresentaram uma metodologia baseada em T-RFLP para avaliar o efeito da fertilização fosfatada na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera do feijão. Nessa metodologia foram utilizados os oligonucleotídeos 27F e 1492R (Mengoni et al., 2004), cujos produtos amplificados foram digeridos separadamente com as enzimas AluI e Hae III. Os fragmentos com tamanho entre 50 e 500 pares de bases e com altura de pico superior a 20 unidades de fluorescência foram utilizados para análise do perfil da comunidade bacteriana. O efeito da fertilização foi avaliado pela matriz binária obtida a partir da combinação linear de dados entre as duas enzimas de restrição. Além disso, o software Past 2.02 (Hammer et al., 2001) foi utilizado para análise multidimensional não métrica (NMDS) baseada na distância de Jaccard.

O processo de filtragem dos dados, a remoção de picos falsos e a validação dos T-RFs são altamente impactantes na interpretação e discussão dos resultados obtidos. Dessa forma, para aumentar a confiabilidade dos resultados, algumas ferramentas podem ser utilizadas, como o T-REX, um software online, gratuito, desenvolvido para o processamento e análise de dados de T-RFLP e que auxilia de forma mais eficiente na avaliação integrada e rápida das matrizes de dados, permitindo uma análise completa do conjunto de dados (trex.biohpc.org) (Culman et al., 2009).

As análises estatísticas direcionadas aos estudos do microbioma também facilitam a interpretação dos dados e aumentam a confiabilidade dos resultados. A utilização de índices de similaridade ou distância entre as comunidades microbianas a partir de dados de T-RFLP se baseia na presença ou

ausência do T-RF (Silva et al., 2017; Trabelsi et al., 2017). Quando a pesquisa visa o estudo da proporção de espécies compartilhadas entre duas ou mais amostras, normalmente é utilizado o índice de Jaccard. No entanto, quando o objetivo é comparar amostras não só pela presença ou ausência, mas também por suas abundâncias, é necessário usar um índice quantitativo, como um índice de distância (dissimilaridade) (Manly, 2008; Valentin, 2012; Buttigieg; Ramette 2014).

No estudo de sistemas ecológicos, os índices quantitativos mais utilizados são distância Euclidiana e a de Bray-Curtis. A distância Euclidiana pode ser descrita como a distância entre duas parcelas medidas por unidades de indivíduos de duas espécies. Apesar de este método ser facilmente aplicado e útil em sistemas de classificação, ele não varia entre 0 e 1, por isso não é utilizado em matrizes de presença e ausência como aquelas normalmente obtidas pelo T-RFLP. O índice de Bray-Curtis pode ser expresso como a proporção de similaridade ou dissimilaridade na abundância das espécies e os valores obtidos são compreendidos entre 0 (mínimo) e 1 (máximo). Essa padronização no intervalo facilita a comparação e interpretação dos dados (Manly, 2008; Valentin, 2012; Buttigieg; Ramette 2014).

A matriz de dissimilaridade necessita de uma avaliação como qualquer dado quantitativo. Dessa forma o teste de análise de similaridade (ANOSIM), que é direcionado a matrizes de dissimilaridade em vez de dados brutos, é uma forma de avaliar o agrupamento obtido pela matriz. Normalmente o ANOSIM é realizado juntamente com o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), para que juntos reduzam de forma significativa o número de variáveis ou dimensões observadas (Buttigieg; Ramette 2014).

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo contribuir com uma adequação metodológica da técnica de T-RFLP para a avaliação de dados obtidos na investigação da diversidade bacteriana rizosférica de genótipos de milho. As alterações realizadas promoveram maior acurácia, permitindo uma interpretação mais realista e substancial dos resultados obtidos.

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Para a realização do estudo comparativo entre as metodologias baseadas em T-RFLP foi utilizado como exemplo o experimento realizado por Campolino et al. (2018), no qual quatro genótipos comerciais de milho (BRS1055, 1M1752, AG8088 e DKB390) foram cultivados no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo (19°28' S e °15'08" W) sob plantio direto, na safra de 2016/2017, em um Latossolo, textura argilosa (64% de argila). Foram utilizadas três fontes de fósforo: totalmente solúvel (superfosfato triplo -TSP), parcialmente solúvel (fosfato reativo - Bayóvar) e insolúvel (fosfato de rocha - Itafós), aplicadas em diferentes doses de P total: 0 (P0), 50 e 100 Kg de P_2O_5 ha⁻¹, sendo que todos os tratamentos foram feitos em triplicata. As condições de plantio, coleta, extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana das amostras foram descritas detalhadamente por Campolino et al. (2018).

Genotipagem por T-RFLP

Para a comparação dos resultados relacionados com as modificações na metodologia do T-RFLP, as amostras foram processadas e analisadas segundo a metodologia de Trabelsi et al. (2017), com substituição do oligonucleotídeo 27F (Mengoni et al., 2004) pelo 8F (La Montagne et al., 2002). Neste estudo, foram introduzidas modificações relacionadas ao processo de digestão, filtragem e análise dos dados conforme detalhado na Figura 1. Dessa forma, os fragmentos amplificados das regiões 16S rDNA foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI* (TIPAYNOA et al., 2012), *TaqI* (VERBRUGGEN et al., 2012) e *HaeIII* (TRABELSI et al., 2017). Para a digestão com a enzima *AluI* e *HaeIII* foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima 10 X e 1 µL da enzima 10 U µL⁻¹, incubados a 37 °C por 4 h. Para a digestão com a enzima *TaqI* foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima 10X, 0,2 µL de BSA 10 ng µL⁻¹ e 0,5 µL da enzima 10 U µL⁻¹, sendo a mistura incubada a 65 °C por 4 h. Para a digestão com a enzima *TaqI* foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima 10X, 0,2 µL de BSA 10 ng µL⁻¹ e 0,5 µL da enzima 10 U µL⁻¹, sendo a mistura

incubada a 65 °C por 4 h. Para avaliar os fragmentos de DNA gerados, 2 µL da digestão foram adicionados a 9,8 µL de formamida deionizada (Applied Biosystems, EUA) e 0,2 µL de padrão ROX 500 (Applied Biosystems).

Análise de Dados

Para a avaliação da diversidade microbiana por T-RFLP, os perfis de digestão foram avaliados no equipamento Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems) com o software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems) com as opções padrão do módulo AFLP. Foram considerados T-RFs com tamanho entre 30 e 500 pares de bases e com uma altura de pico de fluorescência superior a 40 unidades necessariamente presentes nas triplicatas biológicas. Além disso, foi adicionada a etapa de processamento online de dados pelo software Processing and Analysis of T-RFLP data: T-REX (<http://trex.biohpc.org/>) (Culman et al., 2009). Após filtragem e alinhamento, os dados foram exportados para uma matriz binária e ordenados com base no padrão de discriminação determinado por escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, avaliados pelo teste de ANOSIM ($p \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Past3 v.3.25 (Hammer et al., 2001).

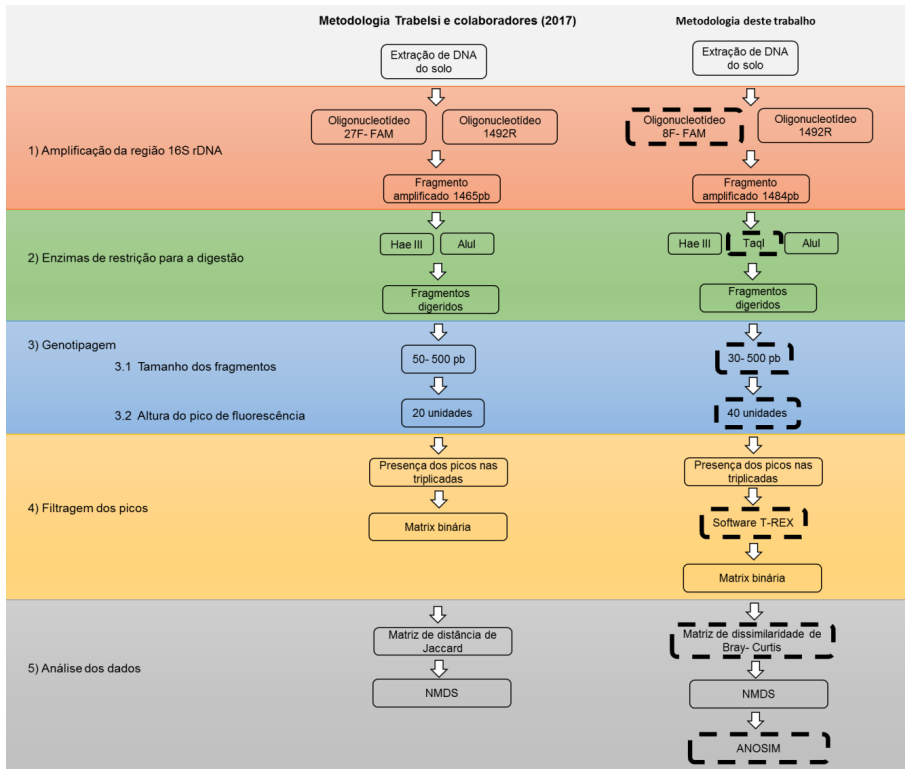


Figura 1. Esquema comparativo entre as metodologias do T-RFLP baseadas em Trabelsi et al. (2017) e a proposta neste trabalho. As linhas pontilhadas indicam as etapas onde foram feitas as modificações neste trabalho.

Resultados e Discussão

A troca do oligonucleotídeo 27F-FAM marcado com fluorescência FAM na posição 5' da metodologia de Trabelsi et al. (2017) para o 8F-FAM marcado com fluorescência FAM na posição 5' nesse estudo produziu um acréscimo de 19 pares de base (pb) na amplificação da região 16S rDNA, resultando em um fragmento de 1484 pb. Entretanto, as modificações propostas neste estudo, tais como (1) inclusão da enzima de restrição *Taq I* na digestão; (2) filtragem de T-RFs com tamanho entre 30 e 500 pares de bases e altura de pico de fluorescência superior a 40 unidades necessariamente presentes nas triplicatas biológicas e (3) adição da etapa de filtragem de dados pelo Software T-REX, resultaram em um menor número médio de fragmentos gerados (Tabela 1). Esse decréscimo pode ser explicado pela introdução de etapas adicionais que possibilitaram a filtragem dos ruídos (falsos T-RFs) e alinhamento automático referente ao tamanho dos fragmentos gerados pela digestão enzimática.

Determinar picos verdadeiros, ou seja, distinguir os picos das flutuações de fundo em fluorescência é um grande desafio na análise de dados T-RFLP, uma vez que o limiar de base pode afetar o perfil de fragmentos e as avaliações seguintes. O T-REX (Culman et al., 2009) utiliza uma abordagem delimitada por Abdo et al. (2006) para encontrar picos verdadeiros e eliminar o ruído de fundo. Os picos verdadeiros são identificados como aqueles cuja altura ou área excede o desvio padrão calculado sobre todos os picos. O procedimento é então reiterado com os picos que não foram identificados como verdadeiros.

Tabela 1. Comparação das frequências absolutas médias de picos (T-RFs) utilizando duas metodologias para análise de dados de T-RFLP da comunidade bacteriana presente em diferentes genótipos de milho cultivados em diferentes fontes e níveis de P pela técnica de T-RFLP.

Fonte de P	Dose de P_2O_5 (Kg.ha ⁻¹)	Genótipo	Metodologia (Trabelsi et al., 2017)	Este trabalho
			T-RFs	T-RFs
P0	0		38	36
Itafós	50		48	44
	100		86	80
Bayóvar	50	BRS1055	74	69
	100		68	68
TSP	50		48	45
	100		68	65
P0	0		86	63
Itafós	50		88	75
	100		60	60
Bayóvar	50	1M1752	61	58
	100		62	53
TSP	50		93	79
	100		50	50
P0	0		62	62
Itafós	50		53	47
	100		48	49
Bayóvar	50	AG8088	55	46
	100		43	41
TSP	50		52	52
	100		86	81
P0	0		55	34
Itafós	50		48	42
	100		71	70
Bayóvar	50	DKB390	76	71
	100		52	50
TSP	50		73	68
	100		70	67

Além da filtragem dos picos, o T-REX alinha os T-RFs baseado na abordagem feita pelo software T-Align (Smith et al., 2005), que agrupa todas as amostras em função dos tamanhos encontrados. A adição desses passos de filtragem e alinhamento de T-RFs colaborou para um melhor ajuste e confiabilidade da técnica. Após esse processo, são geradas matrizes binárias por grupo de amostras de um determinado pico em relação ao seu tamanho. Na

metodologia proposta por Trabelsi et al. (2017), a matriz binária utilizada para as análises de agrupamento foram geradas pelo software GeneMapper v 4.0, enquanto na metodologia proposta neste trabalho, as matrizes foram geradas pelo software T-REX, que otimizou o processo de análise de dados.

A interpretação de resultados das matrizes binárias a partir de medidas de associação é uma importante ferramenta para a avaliação entre dois ou mais grupos amostrais na validação de similaridades ou dissimilaridades (Buttigieg; Ramette, 2014). O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) consiste em uma abordagem indireta de análise de gradiente que produz uma ordenação baseada em uma matriz de distância ou dissimilaridade oriunda de matrizes binárias. O NMDS representa o mais próximo possível a dissimilaridade em pares entre objetos em um espaço de uma dimensão. Uma ordenação NMDS com um valor de stress próximo ou acima de 0,2 é considerada suspeita, e um valor de stress próximo de 0,3 indica que a ordenação é arbitrária. Valores de stress iguais ou inferiores a 0,05 indicam um bom ajuste (Clarke, 1993; Legendre et al., 2005).

Pela metodologia padrão (Trabelsi et al., 2017), o NMDS foi baseado na matriz de distância de Jaccard. Porém, na metodologia proposta por esse trabalho, a análise não métrica foi realizada pela matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. Os resultados obtidos pelo NMDS dos dados apurados pela metodologia padrão do T-RFLP indicaram um valor de stress maior que 0,05 (0,1365, Figura 2A). Por outro lado, com a utilização da metodologia proposta neste trabalho, o valor do stress satisfaz o modelo (0,0479, Figura 2B). O ajuste satisfatório obtido pela nova metodologia pode estar relacionado com a utilização do índice de Bray-Curtis na análise. O índice de Jaccard, utilizado por Trabelsi et al. (2017), classifica as amostras apenas por meio de presença e ausência dos picos oriundos do T-RFLP. Entretanto, o índice de Bray-Curtis computa os dados não só pela presença e ausência, mas também expressa uma proporção de similaridade ou dissimilaridade (distância) na abundância dos picos, favorecendo o processo de associação na comparação e interpretação dos resultados (Manly, 2008; Valentin, 2012; Buttigieg; Ramette, 2014).

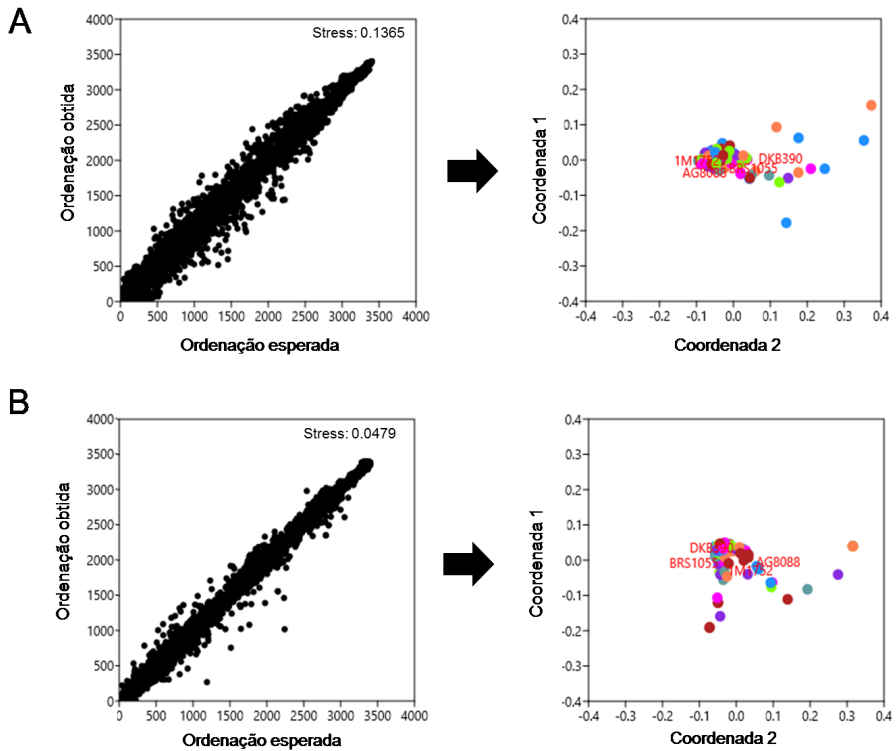


Figura 2. Parâmetros de ordenação obtidos e esperados e perfis do escalonamento não métrico multidimensional (NMDS) da comunidade bacteriana de solo rizosférico de genótipos de milho cultivados em diferentes fontes e níveis de P. A: Metodologia padrão do T-RFLP baseada na matriz de Jaccard. B: Metodologia proposta neste trabalho baseada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. Os pontos coloridos nos perfis NMDS são referentes aos tratamentos de fertilização fosfatada, que foram utilizados como exemplo no trabalho.

Para testar o efeito dos tratamentos dos perfis NMDS baseados na matriz de dissimilaridade de Jaccard (Figura 2A) e de Bray-Curtis (Figura 2B) foi realizado o teste ANOSIM. Esse passo não foi aplicado por Trabelsi et al. (2017). O teste ANOSIM impõe um rigor estatístico aos agrupamentos formados por meio de uma variável categórica, que podem ser visualizados por meio do NMDS, análise de componentes principais ou de Cluster de uma matriz de distância. A lógica da ANOSIM é permutar a matriz de distância, com os dados categorizados, gerando os valores das variáveis ao acaso. Portanto, se o

resultado da matriz original for muito improvável de ser encontrado ao acaso, a hipótese nula é rejeitada, e se aceita o fato de que existe uma associação entre as categorias e a matriz de distâncias encontradas (Clarke; Gorley, 2001; Buttigieg; Ramette, 2014).

Os valores do ANOSIM encontrados para o efeito do genótipo e fonte/dose de P respectivamente foram de 0,9870 e 0,0725 na metodologia de Trabelsi et al. (2017). Em nosso estudo, seguindo a mesma ordem dos fatores, os valores foram de 0,0356 e 0,0499. Por este teste foi possível verificar que não houve efeito significativo dos tratamentos avaliados, de maneira geral, pela metodologia padrão. Entretanto, o conjunto de mudanças realizadas na metodologia resultou em um ajuste melhor dos dados em uma matriz de dissimilaridade adequada possibilitando o uso do teste ANOSIM. Os valores encontrados mostraram que os fatores genótipo e fonte/dose de P impactaram de forma significativa a estrutura da comunidade bacteriana, permitindo outra interpretação do resultado final do estudo.

Conclusão

As mudanças metodológicas realizadas neste estudo como a substituição do oligonucleotídeo 27F-FAM pelo 8F-FAM, juntamente com a inclusão da enzima de restrição *TaqI* na etapa de digestão, a filtragem de tamanho e altura de T-RFs pelo Software T-REX, além da nova ordenação dos dados utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis (testada pelo teste ANOSIM), promoveram maior acurácia da técnica T-RFLP, permitindo uma interpretação mais realista dos resultados de diversidade bacteriana rizosférica.

Referências

ABDO, Z.; SCHUETTE, U. M.; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J.; FORNEY, L. J.; JOYCE, P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 929-938, 2006.

BUTTIGIEG, P. L.; RAMETTE, A. A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 543-550, 2014.

CAMPOLINO, M. L.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A.; COELHO, A. M.; SOUSA, S. M. de. **Diversidade genética da comunidade de microrganismos da rizosfera de genótipos de milho e sorgo cultivados em condições de campo sob diferentes fontes e níveis de fósforo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 29 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 169).

CAFFARO-FILHO, R. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L. R. Quantitative analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 736-738, 2007.

CHAUHAN, P. S.; CHAUDHRY, V.; MISHRA, S.; NAUTIYAL, C. S. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 15-32, 2011.

CHENG, F.; HOU, L.; WOESTE, K.; SHANG, Z.; PENG, X.; ZHAO, P.; ZHANG, S. Soil pretreatment and fast cell lysis for direct PCR from forest soils for T-RFLP analysis of fungal communities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 817-827, 2016.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, n. 1, p. 117-143, 1993.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **Primer v5: user manual/tutorial**. Plymouth: Primer-E, 2001

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, n. 1, p. 171, 2009.

DE VRIEZE, J.; IJAZ, U. Z.; SAUNDERS, A. M. Terminal restriction fragment length polymorphism is an “old school” reliable technique for swift microbial community screening in anaerobic digestion. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, article 16818, 2018.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4630-4636, 1999.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST**: Paleontological Statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. [S.l.: s.n.], 2001. Disponível em: <http://palaeo-eletronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 25 ago. 2020.

KARCZEWSKI, K.; WOLFGANG, R. H.; MEYER, E. I. Comparison of DNA-fingerprinting (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems. **Limnologica**, v. 67, p. 45-53, 2017.

KARI, A.; NAGYMÁTÉ, Z.; ROMSICS, C.; VAJNA, B.; KUTASI, J.; PUSPÁN, I.; KÁRPÁTI, E.; KOVÁCS, R.; MÁRIALIGETI, K. Monitoring of soil microbial inoculants and their impact on maize (*Zea mays* L.) rhizosphere using T-RFLP molecular fingerprint method. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 233-244, 2019.

LA MONTAGNE, M. G.; MICHEL JR., F. C.; 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**, v. 49, n. 3, p. 255-264, 2002.

LEGENDRE, P.; BORCARD, D.; PERES-NETO, P. R. Analyzing beta diversity: partitioning the spatial variation of community composition data. **Ecology Monographs**, v. 75, n. 4, p. 435-450, 2005.

LINDSTRÖM, S.; ROWE, O.; TIMONEN, S.; SUNDSTRÖM, L.; JOHANSSON, H. Trends in bacterial and fungal communities in ant nests observed with Terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and Next

Generation Sequencing (NGS) techniques-validity and compatibility in ecological studies. **PeerJ**, v. 6, e5289, 2018.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

MANLY, B. **Métodos estatísticos multivariados**: uma introdução. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

MENGONI, A.; GRASSI, E.; BARZANTI, R.; BIONDI, E. G.; GONNELLI, C.; KIM, C. K.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 2, p. 209-217, 2004.

MUNIR, M. B.; MARSH, T. L.; BLAUD, A.; HASHIM, R.; JOSHUA, W. J.; NOR, S. A. M. Analysing the effect of dietary prebiotics and probiotics on gut bacterial richness and diversity of Asian snakehead fingerlings using T-RFLP method. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 10, p. 3350-3361, 2018.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2000.

SMITH, C. J.; DANILOWICZ, B. S.; CLEAR, A. K.; COSTELLO, F. J.; WILSON B.; MEIJER, W. G. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 375-380, 2005.

SHYU, C.; SOULE, T.; BENT, S. J.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 4, p. 562-570, 2007.

SILVA, U. C.; MEDEIROS, J. D.; LEITE, L. R.; MORAIS, D. K.; CUADROS-ORELLANA, S.; OLIVEIRA, C. A.; LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SANTOS, V. L. dos. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, article 1266, 2017.

TIQUIA, S. M.; ICHIDA, J. M.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT, E. H.; MICHEL, F. C. Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 412-419, 2005.

TIPAYNOA, S.; KIMB, C.; TONGMIN, S. A. A. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 137-146, 2012.

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

TRABELSI, D.; CHERNI, A.; ZINEB, A. B.; DHANE, S. F.; MHAMDI, R. Fertilization of *Phaseolus vulgaris* with the Tunisian rock phosphate affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 114, p. 1-8, 2017.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica**: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

VERBRUGGEN, E.; KURAMAE, E. E.; HILLEKENS, R.; HOLLANDER, M.; KIERS, E. T.; RÖLING, W. F. M.; KOWALCHUK, G. A.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Testing potential effects of maize expressing the *Bacillus thuringiensis* endotoxin (Bt Maize) on mycorrhizal fungal communities via DNACry1Ab and RNA-based pyrosequencing and molecular fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7384-7392, 2012.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

