



LEYDIANE MATEUS BASTOS

**RESPOSTA DA COMUNIDADE BACTERIANA NA
RIZOSFERA DE MILHO À APLICAÇÃO DE NITROGENIO**

Teresina-Pi

2022

LEYDIANE MATEUS BASTOS

**RESPOSTA DA COMUNIDADE BACTERIANA NA RIZOSFERA DE MILHO À
APLICAÇÃO DE NITROGENIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientador

Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Teresina-Pi

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

B327r

Bastos, Leydiane Mateus.

Resposta da comunidade bacteriana na rizosfera de milho à aplicação de nitrogênio / Leydiane Mateus Bastos. -- 2022.

42 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2023.

“Orientador: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo.”

1. Metagenômica, 2. *Zea Mays*. 3. Adubação. 4. DNA - Solo. 5.

Solo - Microbiologia. I. Araújo, Ademir Sérgio Ferreira. II. Título.

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

LEYDIANE MATEUS BASTOS

**RESPOSTA DA COMUNIDADE BACTERIANA NA RIZOSFERA DE MILHO À
APLICAÇÃO DE NITROGENIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

APROVADA em 26 de janeiro de 2023

Comissão julgadora:



Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira (UFC)



Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes (UFPI)



Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo
Orientador

**Teresina-Pi
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores que ministraram aulas para a turma de pós-graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Petrônio Portela, por todos esses anos de transmissão segura e paciente de conhecimento. Em especial ao meu orientador professor Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo pelo incentivo à execução desse trabalho. Ao professor Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira da Universidade Federal do Ceará pela ajuda com as figuras produzidas para o trabalho.

Enfim, agradeço a todos que pelas orientações, fornecimento de bases bibliográficas, acompanhamento técnico, credibilidade, atenção ou que fosse com um bom dia, um sorriso ou palavras de incentivo, deram contribuição para que esse sonho se tornasse realidade, tornando-se essenciais a essa etapa de minha vida.

Dedico a Deus,
Que iluminou o meu caminho e meu deu forças durante esta
caminhada. Aos meus queridos pais, familiares e amigos.

RESUMO

A fração viva do solo é essencial para seu funcionamento, sendo a esta atribuídos muitos processos que regem a manutenção e a funcionalidade do mesmo. A rizosfera refere-se à região do solo influenciada pelas raízes, com máxima atividade microbiana. O nitrogênio (N) é um nutriente importante para as plantas e influencia o crescimento das raízes. Assim, a fertilização com este nutriente pode contribuir com o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, pode moldar a comunidade microbiana rizosférica. Este estudo levantou a hipótese de que bactérias rizosféricas, principalmente ligados à ciclagem de N, poderiam ser influenciados pela fertilização com N. O milho foi cultivado (hibrido AG1061) em tratamentos não fertilizados e N-fertilizados e a comunidade bacteriana rizosférica foi avaliada por sequenciamento de 16S rRNA. Observou-se que a comunidade bacteriana rizosférica em estudo apresentou maior riqueza nas amostras sem N, além de apresentar comunidade bacteriana distinta e predominância de Actinobacteria em comparação ao milho fertilizado com N. *Bacillus* aumentou na rizosfera do milho fertilizado com N, enquanto *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* aumentaram na rizosfera não fertilizada. As bactérias generalistas superaram as especialistas na rizosfera do milho fertilizado com N. Os resultados deste estudo confirmam que o N é um nutriente importante que influencia a comunidade microbiana rizosférica do milho.

PALAVRAS CHAVES: METAGENÔMICA, ZEA MAYS, ADUBAÇÃO; DNA DO SOLO; MICROBIOLOGIA DO SOLO.

ABSTRACT

The living fraction of the soil is essential for its functioning, being attributed to many processes that govern its maintenance and functionality. The rhizosphere refers to the soil region influenced by the roots, with maximum microbial activity. Nitrogen (N) is an important nutrient for plants and influences root growth. Thus, fertilization with this nutrient can contribute to plant development and, consequently, can shape the rhizospheric microbial community. This study hypothesized that rhizospheric bacteria, mainly linked to N cycling, could be influenced by N fertilization. Maize was grown (hybrid AG1061) in unfertilized and N-fertilized treatments and the rhizospheric bacterial community was evaluated by sequencing of 16S rRNA. It was observed that the rhizospheric bacterial community under study showed greater richness in samples without N, in addition to presenting a distinct bacterial community and predominance of Actinobacteria compared to corn fertilized with N. *Bacillus* increased in the rhizosphere of corn fertilized with N, while *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* increased in the unfertilized rhizosphere. Generalist bacteria outperformed specialists in the rhizosphere of N-fertilized maize. The results of this study confirm that N is an important nutrient that influences the rhizospheric microbial community of maize.

KEYWORDS: METAGENOMICS, ZEA MAYS, FERTILIZATION; SOIL DNA; SOIL MICROBIOLOGY.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura e diversidade das comunidades microbianas em bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. (a) Análise de redundância das comunidades microbianas comparando bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. (b) Medições do índice de riqueza e diversidade de Shannon das comunidades microbianas no nível da OTU. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas independentes. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada pool com base no teste HSD de Tukey ($p < 0,05$).....**21**
- Figura 2.** Composição da comunidade microbiana em bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada baseada no gene 16S rRNA. Gráfico de barras mostrando a abundância diferencial de filos entre solo a granel e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada pool com base na análise de LEfSe ($p < 0,05$).....**23**
- Figura 3.** Método de classificação multinomial de espécies (CLAM) para o teste de ocupação de nicho baseado em comparação de pares. Os generalistas (cinza), especialistas (verde e azul) e raros (preto) são indicados com seus respectivos percentuais.....**25**
- Figura 4.** Mapa de calor mostrando os coeficientes de correlação de classificação de Spearman e significância estatística entre a abundância de filos e os parâmetros do solo e da planta. As cores azul e vermelho indicam correlações positivas e negativas significativas, respectivamente ($P < 0,05$).....**27**
- Figura 5.** Efeito da aplicação de N na abundância de funções bacterianas potenciais. As funções foram previstas com base no gene 16S rRNA bacteriano e archaeal usando o software FAPROTAX. Apenas funções potenciais com diferença estatística pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer após correção de Benjamini-Hochberg ($P < 0,05$) são mostradas.....**28**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- propriedades químicas do solo. Teresina, Pi, 2022.....	17
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CB	Comunidade bacteriana
COT	Carbono orgânico total
CB	Comunidades bacteriana
db-RDA	Análise de redundância baseada em distância juntamente
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
EMBRAPA	Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
MBC	Biomassa bacteriana
N	Nitrogênio
N-plant	Nitrogênio na planta
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PERMANOVA	Análise de variância permutacional multivariada
PGPR	Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal
RDA	Análise de redundância das comunidades microbianas
RDW	Massa da matéria seca da raiz
SDW	Massa da matéria seca da parte aérea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Diversidade microbiana na rizosfera.....	12
2.2 Importância do nitrogênio para as plantas.....	14
2.3 Efeito do nitrogênio sobre a comunidade bacteriana na rizosfera.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Instalação, condução e coleta do experimento.....	17
3.2 Extração e sequenciamento de DNA.....	18
3.3 Análise de dados.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Estrutura e diversidade da comunidade bacteriana.....	20
4.2 Composição da comunidade microbiana.....	22
4.3 Ocupação de nicho e correlação.....	24
4.4 Correlação com os caracteres agrônômicos.....	26
4.5 Perfil funcional da comunidade bacteriana.....	27
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) está entre os principais cereais cultivados no Brasil, sendo de grande importância econômica, social e cultural. Na safra 2021/2022 foram cultivados cerca de 15,9 milhões de hectares da cultura no país, com produtividade média de 4.189 kg ha⁻¹, havendo uma perspectiva global de aumento na demanda e no preço do produto (CONAB 2022).

Os macronutrientes mais requeridos pelas plantas são o nitrogênio (N), o potássio e o fósforo. A cultura do milho é, geralmente, influenciada por problemas de estresse ambiental, dentre os quais se destacam aqueles relacionados à baixa fertilidade natural dos solos brasileiros, principalmente, em termos de disponibilidade de nitrogênio (N). (Júnior FB et al., 2000).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, que são denominados diazotróficos. As bactérias dizotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como o ácido indol acético, entre outros (De Souza Moreira et al., 2010).

A fração viva do solo é essencial para seu funcionamento, sendo a esta atribuídos muitos processos que regem a manutenção e a funcionalidade do mesmo. A rizosfera refere-se à região do solo influenciada pelas raízes, com máxima atividade microbiana. O crescimento das plantas é controlado substancialmente pelo solo na região radicular, um ambiente que a própria planta ajuda a criar e onde a atividade microbiana associada exerce diversas atividades benéficas (Emprapa, 2022).

A região rizosférica fornece um abrigo para a troca de componentes bioquímicos que estabelecem relações interespecies entre as raízes e os microrganismos (Upadhyay et al., 2022). A superfície da raiz ou do rizoplano é o local onde se produz o intercâmbio de sinais químicos que definem as interações microorganismos-planta-solo.

A composição das comunidades bacterianas (CBs) no solo sem influência da raiz (Solo não rizosférico) e da rizosfera é muito diferente, o que sugere uma forte seletividade, que aumenta nos ambientes microbianos não próprios edáficos das plantas, como a endosfera (região dentro dos órgãos vegetais aéreos e

subterrâneos) e da filosfera (faixa circunscrita pelas superfícies vegetais) (Salamone, 2022).

As raízes das plantas liberam exsudatos que alimentam as atividades microbianas e podem estruturar as CBs da rizosfera, mas como diferentes espécies de plantas usam seu exsudato radicular para potencialmente selecionar diferentes bactérias do solo na rizosfera não é bem compreendido. Resultados de estudos em plantas demonstram que os exsudatos radiculares de uma determinada espécie de planta têm o potencial de estimular ou suprimir bactérias do solo e sugere um mecanismo que diferentes espécies de plantas usam para selecionar seu conjunto específico de bactérias da rizosfera. (Dhungana et al., 2022)

Pesquisas destacam métodos que avaliam a diversidade metabólica e métodos moleculares utilizados para alcançar maior número de espécies e avaliar melhor a estrutura da comunidade bacteriana. Entre outros, como a análise do rDNA ribossomal (16S rDNA) para bactérias, a partir da amplificação por PCR (Reação em cadeia da Polimerase), e a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Oliveira et al., 2009)

Com isso, a hipótese deste estudo propõe que as plantas com adubação nitrogenada atraem uma comunidade bacteriana distinta na rizosfera. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do N sobre estrutura, diversidade e composição da comunidade bacteriana (CB) na rizosfera do milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversidade microbiana na rizosfera

Em cada sistema, cada planta é o resultado de todas as interações entre esta e os microrganismos associados, que, em seu conjunto, podem ser descritos como microbiota ou microbioma. A planta e seu microbioma, que é o conjunto de genomas microbianos, são muito dependentes de um outro (Salamone, 2022).

A rizosfera é a região do solo onde ocorrem diversos processos biológicos e bioquímicos em interação com as raízes das plantas (Moreira, 2006). A fração viva do solo é essencial para seu funcionamento, sendo a esta atribuídos muitos processos que regem a manutenção e a funcionalidade dos solos. No entanto, o desempenho de funções similares em solos distintos pode ser tanto realizado pelo mesmo grupo de organismos, ou por organismos distintos, o que leva à necessidade de compreender a composição e o funcionamento metabólico do microbioma dos solos que sustentam os biomas brasileiros. (Cardoso et al. 2016)

Estudos revelam que a qualidade do solo pode ser estimada e quantificada através da avaliação de parâmetros físicos, químicos, bioquímicos e biológicos. No que diz respeito aos parâmetros biológicos, os microrganismos do solo e suas funções foram reconhecidos como componentes integrais da qualidade do solo indispensáveis ao desempenho de suas funções (Morales et al., 2021).

Uma série de fatores influenciam na composição do microbioma da rizosfera, como as características químicas e físicas dos solos, o tipo de planta, taxas de precipitação, entre outros. O crescimento das plantas leva a seleção de microrganismos que irão habitar essa fração de solo mais próxima das raízes, conhecida como rizosfera, e levar ao estabelecimento dessa interação vital para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. (Cotta et al. 2019)

Espécies vegetais se relacionam com microrganismos em múltiplas esferas mediadas por suas estruturas, como folhas e raízes, por exemplo. Essa interação mediada pelas raízes ocorre principalmente no âmbito da rizosfera, que corresponde a fração do solo que sofre uma forte pressão de seleção devido a liberação pela planta de diversos compostos (exsudatos) que altera a dinâmica do solo. (Cotta et al. 2019)

Devido não só a quantidade, mas também à diversidade de compostos orgânicos depositados na rizosfera, assim como o ambiente físico-químico, a

quantidade de diversos tipos de microrganismos na rizosfera pode exceder mais de mil vezes aquela do solo não rizosférico (Moreira, 2006).

Regiões mais próximas às raízes, principalmente o rizoplano e a rizosfera, são os locais preferenciais de colonização de microrganismos, sendo essa predileção relacionada à sinalização molecular entre plantas e microrganismos ou à grande disponibilidade de nutrientes oriundos da exsudação radicular no qual contribui com o metabolismo, multiplicação de células microbianas e interação entre as essas comunidades. (Costa et al. 2014)

Os compostos secretados pela raiz da planta determinam a composição do microbioma além de estimular ou reprimir membros da comunidade microbiana (De Faria et al., 2021). Dentre os microrganismos probióticos que habitam o rizoplano encontramos as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal ou PGPR, que incluem os gêneros cultiváveis *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia* e *Streptomyces* (Marrero et al., 2015).

Interações estabelecidas entre os microrganismos podem ser positivas como por exemplo a cooperação, como negativas, no caso da competição. Diversos autores argumentam que o ambiente rizosférico é um nicho extremamente competitivo em função de sua alta abundância microbiana, intensificando as disputas pela ocupação de nichos e obtenção de nutrientes. (Pii et al. 2015)

A compreensão das interações entre a planta hospedeira e seu microbioma desempenha um papel fundamental para garantir a saúde e produtividade da mesma, pois a microbiota pode interferir no crescimento de diversas culturas em seus vários estágios de desenvolvimento (De Faria et al., 2021).

Estudos mais recentes, nos quais os microbiomas da rizosfera foram caracterizados com base na extração direta do DNA total da comunidade, também fornecem fortes evidências para microbiomas específicos de espécies de plantas. (Cotta et al. 2019)

Dessa forma, estudos baseados na ecologia microbiana da rizosfera buscam conhecer a diversidade em comunidades bacterianas que são selecionadas na rizosfera de diferentes espécies de plantas, bem como as funções metabólicas e genéticas dessas comunidades.

2.2 Importância do nitrogênio para as plantas

A produção de culturas perenes de bioenergia em terras agrícolas que não são ideais para culturas alimentares pode mitigar as emissões de óxido nitroso e reduzir a perda de nutrientes ao produzir matérias-primas de bioenergia. A capacidade das culturas bioenergéticas de fornecer esses múltiplos serviços ecossistêmicos depende das interações entre o ciclo do N do solo e o sistema de produção de bioenergia, mas nossa compreensão dessas interações é limitada (Kim et al., 2022).

O nitrogênio (N) é um dos macronutrientes demandados em maior quantidade pelos cultivos agrícolas e está intimamente relacionado com a produtividade e qualidade de grãos, tornando-se essencial e frequentemente limitante na produção agrícola. Desempenha papel chave na obtenção de altas produtividades, uma vez que ele ocupa posição de destaque na nutrição mineral de plantas (Vieira, 2017).

No entanto, ainda existem dúvidas sobre a influência que esse nutriente pode exercer sobre o crescimento da planta e a qualidade das raízes de reserva (Nunes et al., 2016). Autores enfatizam que as funções básicas do N estão interligadas ao crescimento e a cor verde escura das plantas, além de promover o desenvolvimento do sistema radicular, o que ajuda na absorção dos outros nutrientes presentes no solo (Thomé et al., 2010)

A absorção de nitrogênio pela planta ocorre na forma de amônio (NH_4^+) ou de nitrato (NO_3^-), porém estas formas representam menos de 2% do nitrogênio total do solo, e a maior parte do nitrogênio absorvido pela planta deriva-se da mineralização do nitrogênio orgânico ou da aplicação de nitrogênio na forma mineral. (Shimada et al. 2021). Diversos estudos avaliaram os efeitos da concentração de fertilizantes nitrogenados no crescimento e produtividade da planta (Thomé et al., 2010; Bertonecell et al., 2017; Leite et al., 2017)

O crescimento e produção do vegetal está associado ao excesso ou deficiência de N podendo ser prejudicial à planta (Alves, DKM et al. 2020). Por exemplo, quando a demanda de nitrogênio não é adequada, o crescimento é retardado e esse é mobilizado das folhas mais velhas para as áreas de novo crescimento (Batista et al., 2003).

Embora o ciclo global de nitrogênio (N) seja amplamente conduzido por bactérias do solo, os exsudatos das raízes das plantas podem modificar profundamente as CBs do solo e influenciar suas transformações de N (Coskun et al., 2017).

Estudos detalhados mostram o controle que os exsudatos radiculares exercem sobre dois processos principais de N no solo: nitrificação e FBN. Ainda foram discutidos avanços recentes nesta área, incluindo a identificação de exsudatos radiculares como inibidores da nitrificação e como compostos sinalizadores que facilitam a simbiose de aquisição de N. Indicamos lacunas no conhecimento atual, incluindo questões de como os exsudatos das raízes afetam os agentes microbianos recém-descobertos e os componentes do ciclo N (Coskun et al., 2017).

Pesquisas evidenciam que a eficiência na utilização do N pela planta considera os aspectos de absorção e metabolização deste elemento. Resultados anteriores abordam o metabolismo do nitrato e do amônio e discutem as principais regulações metabólicas relacionadas à absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas bem como os mecanismos de regulação do metabolismo do N na planta durante o seu ciclo (Oliveira et al., 2009).

Com isso, podemos concluir que a demanda de nitrogênio pelas plantas varia com a espécie, e o teor de nitrogênio também varia com a parte da planta analisada. Estudos sobre a dosagem ideal de nitrogênio para o cultivo de diversas espécies de importância econômica têm sido amplamente analisadas.

Dada a sua importância e a alta mobilidade no solo, o nitrogênio tem sido intensamente estudado, no sentido de maximizar a eficiência do seu uso. Para tanto, tem-se procurado diminuir as perdas do nitrogênio no solo, bem como melhorar a absorção e a metabolização do N no interior da planta. (Bredemeier et al., 2000)

2.3 Efeito do nitrogênio sobre a comunidade bacteriana na rizosfera

As transformações microbianas do nitrogênio (N) no solo podem ser afetadas pelas práticas de manejo da saúde do solo (Hu et. al., 2021). As plantas geralmente mostram diferentes respostas em sua fisiologia e crescimento às fontes de N utilizadas. A absorção do nitrato ocorre pelo processo ativo em sistema simporte, contra um potencial eletroquímico, com transporte simultâneo de H⁺ e NO₃⁻ para dentro das células numa relação de 2:1, sendo o custo energético para esta absorção de 2 moles de ATP para cada mol de NO₃-absorvido. (Taiz et al. 2017)

A capacidade de um organismo obter sua nutrição nitrogenada de uma fonte inexplorada pela maioria de seus competidores é uma vantagem no ambiente rizosférico (Cardoso et al., 2016). Determinadas bactérias utilizam como fonte de

nitrogênio para o seu metabolismo o enorme reservatório gasoso da atmosfera e estas possuem a capacidade de catalisar a redução do nitrogênio molecular à amônia e incorporar esse nitrogênio em suas moléculas orgânicas (aminoácidos e proteínas), processo denominado de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) (Newton, 2000).

Algumas rizobactérias são importantes bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico com destaque para as afiliadas aos gêneros *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (KLOEPPER et al., 1989). Rizobactérias de uma variedade local de milho e de uma variedade híbrida de milho foram isoladas e identificadas exibindo características promotoras do crescimento vegetal (Chinakwe et al., 2019).

Algumas PGPRs diazotróficas fornecem às suas plantas hospedeiras uma parte da quantidade do nitrogênio fixado que elas precisam; entretanto, o nitrogênio fixado é somente um componente menor do benefício geral para a planta (Chanway e Holl, 1991).

Com isso, o nitrogênio fixado por associações microbiológicas pode representar uma alternativa de substituição para os fertilizantes químicos nitrogenados, com as vantagens de ser mais viável economicamente e não poluir o meio ambiente, sendo uma possibilidade de prevenir a degradação do meio e aumentar a segurança alimentar; também pode oferecer subsídios à agricultura de subsistência devido ao baixo custo dos inoculantes. (De Lima et al. 2021)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalação, condução e coleta do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Piauí (05° 05' S; 42° 48' W. 75 m) utilizando vasos plásticos (3,0 L) preenchidos com solo (Fluvisol Neossol). As amostras de solo (0-20 cm de profundidade) foram coletadas de parcelas experimentais com histórico de cultivo de milho.

Foram determinadas as propriedades químicas do solo, sendo o pH, Ca, Mg, K trocável e o P disponível estimado de acordo com a EMBRAPA (1997). O C orgânico total (COT) foi determinado de acordo com Yeomans e Bremner (1988). As propriedades químicas do solo estão de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Propriedades químicas do solo. Teresina, Pi, 2022.

pH	COT	Ca	Mg	K	P
6,0	5,3 g kg ⁻¹	1,8 cmolc kg ⁻¹	0,5 cmolc kg ⁻¹	38,2 mg kg ⁻¹	4,3 mg kg ⁻¹

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos (não adubado e N adubado) em quatro repetições. A adubação nitrogenada consistiu em 334 mg de uréia por vaso, o que equivale a 100 kg de N por hectare. Sementes de milho (*Zea mays* L.), do cultivar híbrido AG1061, foram desinfestadas na superfície (hipoclorito de sódio 5% por 3 min) e lavadas com água destilada estéril.

Foram semeadas cinco sementes por vaso e oito dias após a germinação, as plantas foram desbastadas, deixando-se uma planta por vaso. Tanto os vasos não adubados quanto os adubados com N receberam 410 mg de superfosfato simples (100 kg por ha) e 225 mg de cloreto de potássio (60 kg por ha). Os vasos foram irrigados diariamente com água esterilizada para manter a umidade do solo a 70% da capacidade de campo.

As plantas foram coletadas 50 dias após a emergência das plantas (estágio de floração) e a amostragem do solo rizosférico foi realizada da seguinte forma: as raízes e o solo aderente de cada planta foram colocados em uma peneira de malha de 1 mm e lavados com um jato suave de água da torneira para remover o solo.

Todas as amostras de solo foram armazenadas a -20 °C até a extração e análise do DNA. C e N da biomassa microbiana do solo foram estimados usando o

método de extração-fumigação com clorofórmio de acordo com Vance et al. (1987). A parte aérea foi separada das raízes, secas (65°C; 72 h) e pesadas para determinar a massa da matéria seca da parte aérea (SDW) e das raízes (RDW). O teor de N total na parte aérea foi estimado pelo método de Kjeldahl.

3.2 Extração e sequenciamento de DNA

O DNA foi extraído de 0,5 g (peso úmido total) de solo usando o Power Lyzer Power Soil DNA Isolation Kit (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A extração de DNA foi realizada em triplicata para cada amostra de solo. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram determinadas com o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada com primers de região específica (515F/806R) (Caporaso et al., 2011). Cada reação de PCR de 25 µL continha o seguinte: 12,25 µL de água sem nuclease (Certified Nuclease-free, Promega, Madison, WI, EUA), 5,0 µL de solução tampão 5x (MgCl₂ 2Mm), 0,75 µL de solução de dNTP's de DNA modelo.

Além disso, uma reação de controle foi realizada pela adição de água em vez de DNA. As condições para PCR foram: 95°C por 3 minutos para desnaturar o DNA, com 35 ciclos a 98°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 3 min a 72°C para garantir o alongamento completo.

Após a indexação, os produtos de PCR foram limpos com Agencourt AMPure XP – PCR purification beads (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), de acordo com o manual do fabricante, e quantificados com o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Uma vez quantificadas, as concentrações equimolares de cada biblioteca foram reunidas em um único tubo. Após a quantificação, a molaridade do conjunto foi determinada e diluída para 2 nM, desnaturada e, em seguida, diluída para uma concentração final de 8,0 pM com um pico PhiX de 20% (Illumina, San Diego, CA, EUA) para carregamento no Illumina MiSeq máquina de sequenciamento (Illumina, San Diego, CA, EUA).

3.3 Análise de dados

Os dados de sequência bruta foram processados usando QIIME versão 1.9.1 (Caporaso et al. 2011). Resumidamente, as sequências foram desmultiplexadas, filtradas e quiméricas e as sequências de baixa qualidade foram removidas para procedimentos posteriores.

Aproximadamente 298.774 sequências de alta qualidade foram obtidas, com uma média de ~27.161 sequências por amostra. Singletons e doubletons foram removidos, e as amostras foram rarefeitas para 27.003 sequências, seguindo o número da amostra mais baixa. A afiliação taxonômica foi realizada com 97% de similaridade utilizando a base de dados SILVA v. 138 (Quast et al., 2013), e a matriz gerada foi posteriormente utilizada para análises estatísticas. Arquivos FASTQ brutos estão disponíveis no Mendeley Data System.

Para análise estatística, a homogeneidade-normalidade das variâncias dos dados foi verificada pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk. Além disso, adotamos o teste ANOVA, e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Métricas de diversidade alfa, por exemplo, riqueza microbiana (ou seja, número de OTU) e índice de diversidade de Shannon foram calculados.

Correlacionamos a estrutura bacteriana com as propriedades químicas da planta usando análise de redundância baseada em distância (db-RDA) juntamente com uma análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) para verificar as diferenças entre os grupos (Anderson 2001). A composição microbiana foi comparada entre os tratamentos com base no nível de filo. Além disso, acessamos as funções microbianas putativas usando a abordagem FAPROTAX v. 1.2.3 incluindo todos os gêneros detectados (Louca et al. 2016).

O teste de correlação de postos de Spearman foi aplicado para acessar a relação entre grupos bacterianos com propriedades químicas da planta. Por fim, a ocupação do nicho foi analisada por meio da metodologia de classificação multinomial de espécies, colocando as comunidades bacterianas em especialistas, generalistas e grupos ecológicos raros (Pedrinho et al. 2020).

4. RESULTADOS

4.1 Estrutura e diversidade da comunidade bacteriana

Usando a análise RDA (Análise de redundância das comunidades microbianas) para comparar a CM em solo não rizosférico e rizosfera de milho, foi possível observar nos dois eixos 97% de similaridade total dos dados na estrutura das CB encontradas nesses ambientes com uma diferença significativa ($p < 0,05$) para a dose de N aplicada (PERMANOVA $F = 3,4547$; $P = 0,0009$), sendo o eixo x explicado por 76,27% e o eixo y explicado por 21,2% (Fig.1(a)).

As principais características avaliadas foram a Biomassa bacteriana (MBC), massa da matéria seca da parte aérea da planta (SDW), massa da matéria seca da raiz (RDW) e Nitrogênio na planta (N-plant). Nota-se uma maior correlação entre as características da planta na rizosfera com aplicação de Nitrogênio, evidenciando um maior agrupamento com valores mais elevados no crescimento da SDW e MBC (Fig. 1(a)).

Quanto à riqueza microbiana, a maior variação ocorreu na rizosfera sem adubação nitrogenada com aproximadamente 2500 OTUs (Fig. 1(b)). Havendo uma diferença significativa em comparação com solo não rizosférico onde apresentou uma média de 1000 OTUs, no entanto entre as duas rizosferas não foi observado uma grande divergência (Fig. 1(b)).

A diversidade da CB apresentou menor índice em solo não rizosférico efeito contrário mostrou-se na rizosfera com nitrogênio, não expressando diferença significativa em comparação com a rizosfera sem nitrogênio (Fig. 1(c)). Assim, a maior riqueza de espécies foi observada em rizosfera sem nitrogênio enquanto que valores mais elevados da diversidade foram evidenciados na rizosfera nitrogenada.

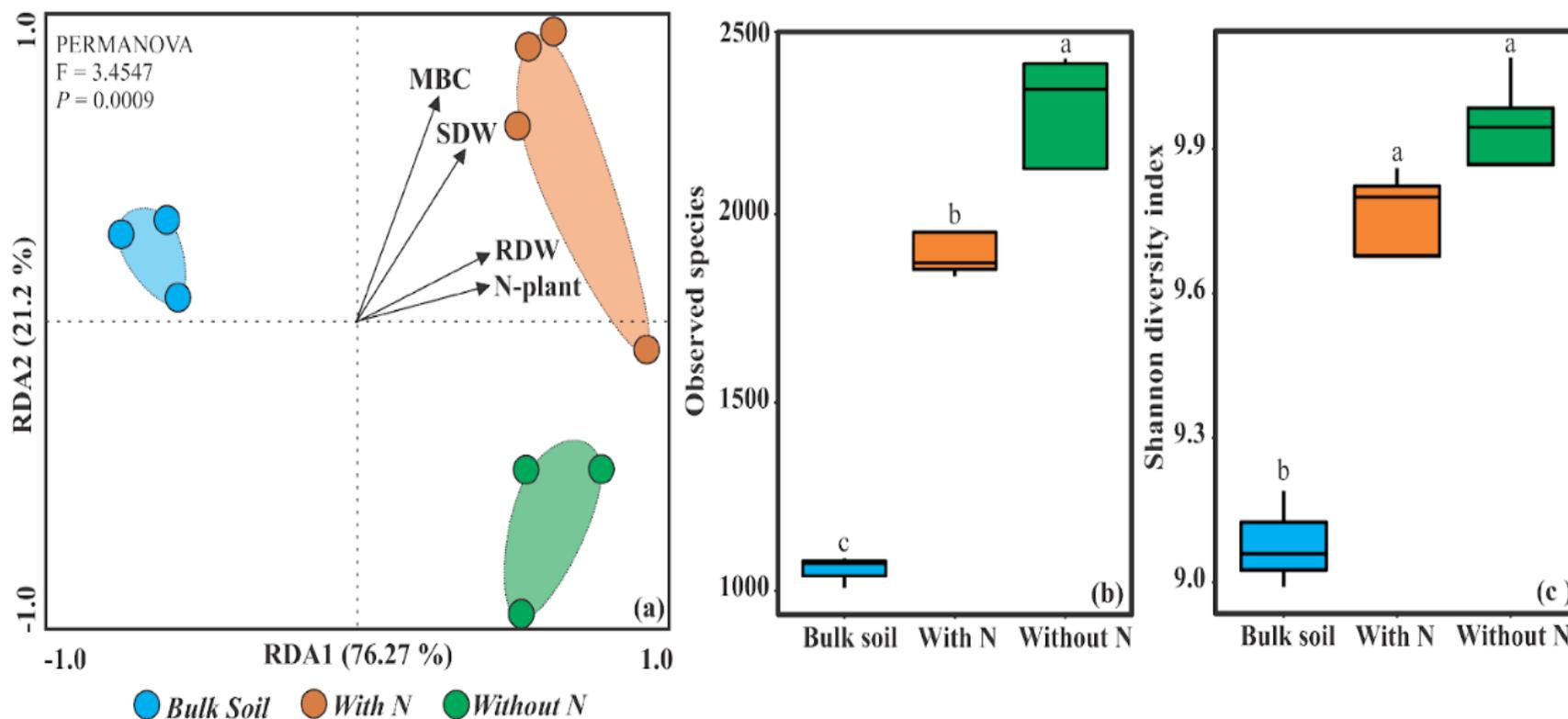


Figura 1. Estrutura e diversidade das comunidades microbianas em bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. (a) Análise de redundância das comunidades microbianas comparando bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. (b) Medições do índice de riqueza e diversidade de Shannon das comunidades microbianas no nível da OTU. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas independentes. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada pool com base no teste HSD de Tukey ($p < 0,05$).

4.2 Composição da comunidade microbiana

A análise da composição taxonômica da CB foi avaliada em nível de filo, sendo as mais abundantes em ordem crescente Proteobacterias, Actinobacterias, Firmicutes, Acidobacterias, Chloflexi e Planctomycetes Fig. 2(a). As Proteobacterias foram menos abundantes no solo não rizosférico em comparação entre rizosfera com e sem adubação nitrogenada. Não há diferença significativa na variação das Actinobacterias nos três tratamentos.

Quanto às Firmicutes podemos notar uma maior quantidade na rizosfera N-fertilizada. O filo Acidobacterias mostrou-se em menor quantidade em solo não rizosférico quando comparado entre as rizosferas. Já para as Chloflexi e Planctomycetes não foi observada diferenciação na abundância entre as três amostras de solo.

Observamos diferentes padrões quando comparamos grupos bacterianos específicos em solos não rizosférico e rizosfera N-fertilizada e não fertilizada (Fig 2. (b)). Dentre eles *Bacillus* obteve resultados inferiores na rizosfera sem N. *Sphingomonas* foi menos abundante na rizosfera nitrogenada e *Norcardioides* mostrou-se menos evidente em solo não rizosférico.

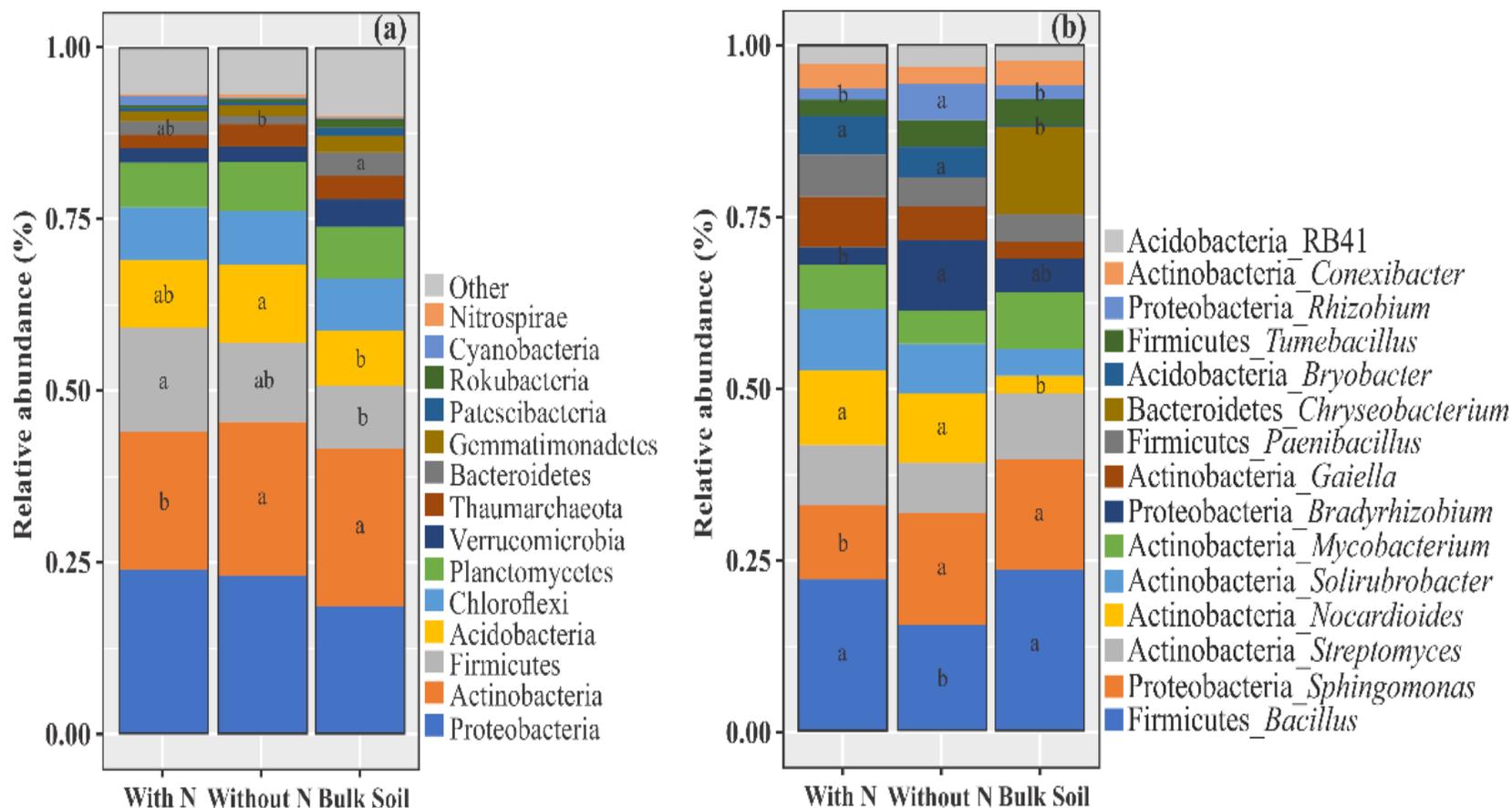


Figura 2. Composição da comunidade microbiana em bulk soil e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada baseada no gene 16S rRNA. Gráfico de barras mostrando a abundância diferencial de filos entre solo a granel e rizosfera de milho com e sem adubação nitrogenada. Diferentes letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre cada pool com base na análise de LEfSe ($p < 0,05$)

4.3 Ocupação de nicho e correlação

A análise da ocupação de nicho mostrou resultados distintos em comparação com solos não rizosféricos e rizosféricos Fig.3. As bactérias generalistas superaram as especialistas nos três tipos de tratamentos. Sendo que na rizosfera especialistas com N exibiram valores de 8,9% e especialistas sem N 2,7% Fig. 3(a).

Uma proporção semelhante da comunidade bacteriana foi vista comparando especialistas em solos volumosos sem fertilização N (14,5%) entre especialistas na rizosfera sem N (32,8%) Fig. 3(b), e especialistas em solos volumosos com adubação nitrogenada (12,9%) entre especialistas na rizosfera com N (35,5%) Fig. 3(c).

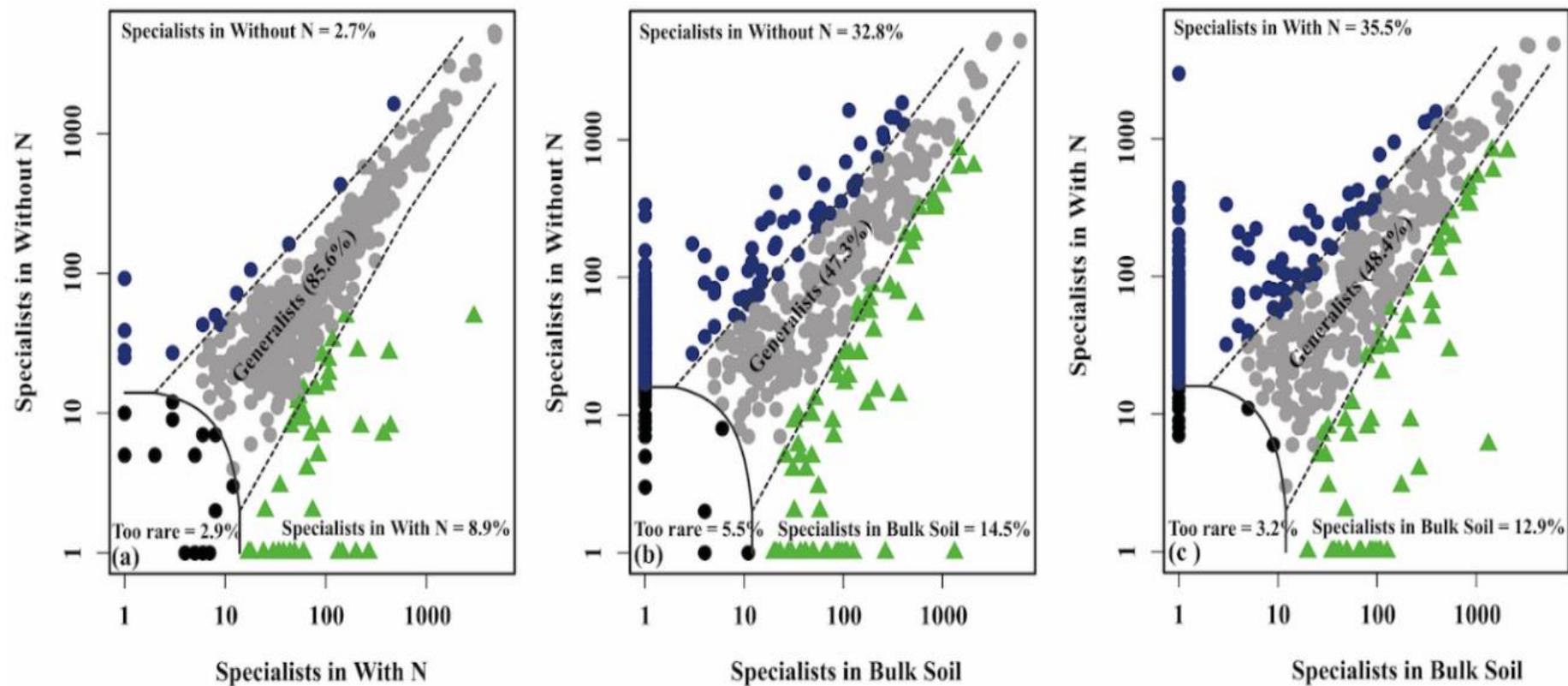


Figura 3. Método de classificação multinomial de espécies (CLAM) para o teste de ocupação de nicho baseado em comparação de pares. Os generalistas (cinza), especialistas (verde e azul) e raros (preto) são indicados com seus respectivos percentuais.

4.4 Correlação com os caracteres agronômicos

Analisou-se os parâmetros entre solo e planta dentre eles: carbono microbiano, nitrogênio microbiano, massa da matéria seca da parte aérea, massa da matéria seca da raiz, nitrogênio na planta e diâmetro das folhas. Foram observadas correlações positivas (na cor azul) e negativas (na cor vermelha), respectivamente, entre os filios bacterianos individuais encontrados na rizosfera N-fertilizada com características de desempenho da planta (Fig. 4).

O componente que obteve maior destaque com correlações positivas foi o carbono microbiano, sendo evidenciado nos filios Cyanobacterias, Patescibacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Para o item nitrogênio na planta os maiores índices foram as Cyanobacterias, Bacteroidetes e Firmicutes. Quanto ao diâmetro nas folhas houve similaridade positiva entre Bacteroidetes e Firmicutes. O nitrogênio microbiano obteve maiores índices entre Actinobacterias e Proteobacterias. E por fim, Bacteroidetes apresentou relação positiva entre a massa seca da parte aérea da planta e Cyanobacterias com a massa seca da raiz (Fig. 4).

No que diz respeito à correspondência negativa apenas os parâmetros carbono microbiano e diâmetro das folhas foram mais explícitos em Thaumarchaeota, e a massa seca das raízes no filo Verrucomicrobia (Fig. 4).

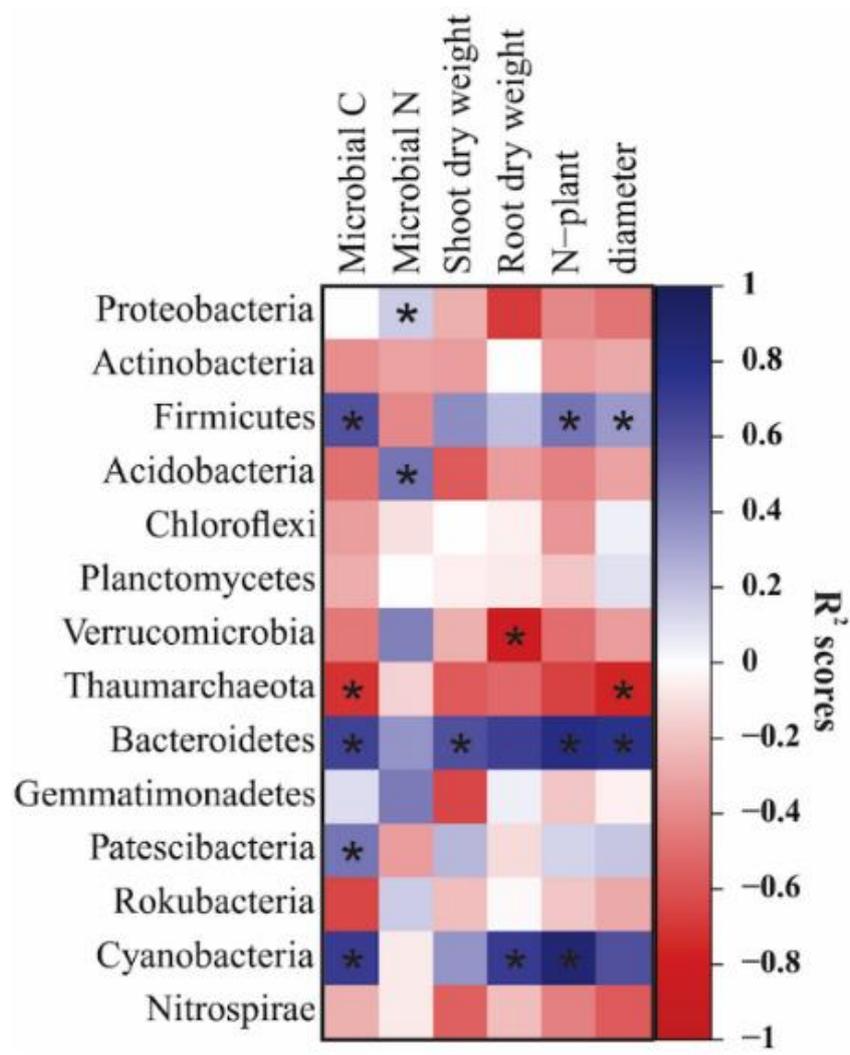


Figura 4. Mapa de calor mostrando os coeficientes de correlação de classificação de Spearman e significância estatística entre a abundância de filos e os parâmetros do solo e da planta. As cores azul e vermelho indicam correlações positivas e negativas significativas, respectivamente ($P < 0,05$).

4.5 Perfil funcional da comunidade bacteriana

Com intuito de averiguar o efeito da aplicação de N na abundância de funções bacterianas potenciais, foi realizada uma predição funcional da comunidade bacteriana associada aos genótipos do milho nos três tratamentos estudados (Fig. 5). As funções avaliadas foram: fixação de nitrogênio, quimioheterotrofia, fotoautotrofia oxigênica, ureólise, redução de nitrato, degradação de compostos aromáticos,

oxidação de manganês, oxidação de amônia aeróbica, nitrificação, oxidação de nitrito aeróbico e respiração de compostos de enxofre.

Observamos que algumas funções potenciais foram significativamente alteradas pela introdução de Nitrogênio, especificamente oxidação de amônia aeróbica, nitrificação e oxidação de nitrito aeróbico. Sendo as mesmas mais desenvolvidas em solo não rizosférico e rizosfera não nitrogenada (Fig. 5).

Já para redução de nitrato, degradação de compostos aromáticos e oxidação de manganês houve um menor desempenho em solos não rizosféricos. Um aumento potencial das funções de fixação de nitrogênio, quimioheterotrofia, fotoautotrofia oxigênica e ureólise pode ser observado na rizosfera com adubação nitrogenada (Fig. 5).

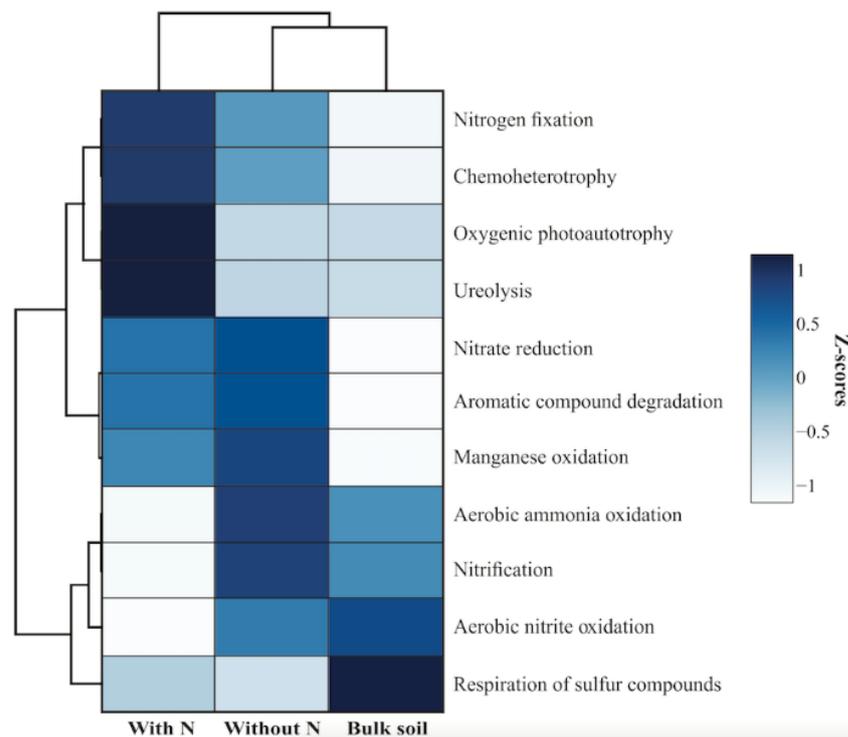


Figura 5. Efeito da aplicação de N na abundância de funções bacterianas potenciais. As funções foram previstas com base no gene 16S rRNA bacteriano e archaeal usando o software FAPROTAX. Apenas funções potenciais com diferença estatística pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer após correção de Benjamini-Hochberg ($P < 0,05$) são mostradas.

5. DISCUSSÃO

O uso de agroquímicos nas lavouras afeta diretamente as características físico, químicas e biológicas dos solos. A rizosfera, é conhecida como uma zona de intensa atividade microbiana, onde ocorrem diversas interações solo-planta-microbiana, desempenhando um papel vital no crescimento e rendimento das plantas (Philip, 2021).

A cultura do milho demanda altas doses de fertilizantes nitrogenados o que acarreta um maior custo na produção (Caprio, 2021). Com isso, a busca por tecnologias essenciais para uma agricultura sustentável tem estimulado o desenvolvimento de práticas de manejo dos componentes biológicos do solo.

Este estudo avaliou a diversidade funcional da comunidade bacteriana (CB) em solos não rizosféricos e na rizosfera de milho, com o objetivo de uma melhor compreensão de possíveis alterações na CB sob a aplicação de nitrogênio em sua rizosfera. Para isso, realizou-se o sequenciamento do gene 16S rRNA da CB encontrada nas amostras dos três tratamentos avaliados (solo não rizosférico, rizosfera com N e rizosfera sem N).

De início, os resultados atestaram a hipótese de que o nitrogênio atrai uma comunidade microbiana distinta na rizosfera, sugerindo efeitos rizosféricos diferentes no milho em comparação ao ambiente com ou sem adubação nitrogenada. Estudos revelam que o N também interfere na microbiota do solo, pois os microrganismos participam do ciclo do N, principalmente em relação ao processo de aplicação biológica do N (Matos, et al., 2021).

O nitrogênio atua como um dos macronutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, pois auxilia no desenvolvimento inicial da mesma bem como atua no metabolismo vegetal participando da biossíntese de proteínas e clorofila (Camargo et al., 2022). Grandes avanços na compreensão da complexidade do ciclo N foram feitos recentemente, com a descoberta de agentes microbianos anteriormente desconhecidos e transformações de N (Coskun D et al., 2017).

Os dados da análise RDA de componentes principais mostraram uma evidente separação da CB entre os solos rizosférico e não rizosférico, essa resposta já era esperada levando em consideração que o processo de liberação de exudados pelas raízes das plantas influencia a diversidade da CB dependendo do ambiente em que se encontra (solo rizosférico ou não rizosférico). Enquanto que as diferenças foram encontradas comparando rizosfera nitrogenada e sem N em relação ao solo não

rizosférico. Isto indica que o processo de fixação biológica de nitrogênio pode modificar a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera.

Pesquisas revelam evidências crescentes sugerindo que os exsudatos das raízes iniciam e modulam o diálogo entre as raízes e os micróbios do solo. Além disso, mostram que os exsudatos radiculares mantêm e suportam uma diversidade altamente específica de micróbios na rizosfera de uma determinada espécie de planta em particular, sugerindo assim uma estreita ligação evolutiva (Badri et al., 2009).

A riqueza e a diversidade genética microbiana não foram significativas entre as duas rizosferas, no entanto em solo não rizosférico ocorreu o contrário. Já a diversidade microbiana foi diferente em comparação entre solo rizosférico e não rizosférico. Este comportamento é semelhante ao observado em outro estudo onde foram identificados genes funcionais importantes que caracterizam a comunidade microbiana da rizosfera para entender as capacidades metabólicas na rizosfera do milho usando o método de arranjo genético funcional baseado em GeoChip (Li X. et al., 2014).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse nos estudos dos exsudatos das raízes das plantas e sua influência no microbioma planta-solo na formação dos ciclos de nutrientes. Trabalhos mostram que exsudatos radiculares que inibem especificamente a nitrificação do solo foram identificados em importantes espécies de culturas, incluindo arroz, trigo e sorgo, enquanto outros estimulam a nodulação radicular e a fixação de N_2 , mesmo em plantas vizinhas (Coskun D et al., 2017).

A composição da CB revelou uma abundância nos filos Proteobacterias, Actinobacterias e Firmicutes nas três regiões analisadas. Outros trabalhos demonstram resultados similares onde constataram que aproximadamente 32% das bactérias epifíticas isoladas da filosfera do milho foram identificados como diazotróficas com predominância dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes (Abadi et al., 2020). Em geral, esse grupo específico de bactérias são conhecidas como rizobacterias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), encontradas geralmente no solo ou colonizando raízes (Upadhyay et al., 2022).

A atuação desses microorganismos no solo é amplamente discutida, a existência de Proteobacterias em áreas de pastagem ou à interação com plantas está intimamente ligada à participação da microbiota do solo na decomposição da matéria orgânica. Já para o grupo das Actinobacterias, a relação frequente é com as

gramíneas (Costa, et al., 2014). Firmicutes abrange algumas bactérias conhecidas como promotoras de crescimento de plantas (Araujo et al., 2019).

Estudos anteriores da diversidade da CB também verificam a predominância dos filos Proteobacteria e Actinobacteria (Tian et al., 2017). Os filos Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes contribuíram com mais de 95% da diferença entre os sistemas avaliados em produções com a cultura de milho (Campolino et al., 2022). Com isso, é importante destacar que as PGPR podem reduzir consideravelmente a dependência de fertilizantes químicos e agrodefensivos nas lavouras (Upadhyay et al., 2022).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas promovem o crescimento das plantas por meio da proliferação de pêlos radiculares, aumentando a ramificação dos pêlos radiculares; aumento na emergência de plântulas; nodulação precoce; funcionamento do nódulo; maior área de superfície foliar; melhoria do vigor e da biomassa; aumento dos níveis de hormônios vegetais indígenas; e o mais importante, melhorando a eficiência do uso de nutrientes (Vocciante et al., 2022)

Através dos resultados obtidos neste estudo, foi possível identificar os principais gêneros presentes nos ambientes analisados. Sendo eles classificados como *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, e *Nocardioidecesera*, existindo uma diferença marcante na abundância do gênero *Nocardioidecesera* no solo não rizosférico equiparado às rizosferas, onde podemos observar um menor número.

Os microrganismos do solo apresentam alta diversidade metabólica característica que as tornam versáteis para ocupar diversos nichos ecológicos (MOREIRA, 2006). Em seguida comparamos a ocupação de nicho, pela proporção de micróbios generalistas e especialistas, para averiguar o efeito da aplicação de nitrogênio na rizosfera sob a ação microbiana. Em geral, os generalistas superaram os especialistas em todas as amostras avaliadas. Esse resultado mostrou que a cultura do milho obteve um melhor desenvolvimento em rizosfera com adubação nitrogenada, pois recrutou um grupo mais específico de bactérias.

Efeitos semelhantes foram encontrados em trabalhos demonstrando que no geral, em comparação com a rizosfera de milho e outras espécies evidencia a predominância de maiores proporções de micróbios especialistas que generalistas (Dos Santos et al., 2022). Pesquisas mostram que os micróbios especialistas possuem uma gama estreita de nichos e maior aptidão quando encontram suas condições ideais, sendo muito responsivos a perturbações ambientais, incluindo

mudanças nas propriedades físico-químicas do solo, como na rizosfera (Merloti et al., 2022 ; Monard et al., 2016).

Com o intuito de identificar os prováveis bioindicadores que influenciam o crescimento e a saúde do vegetal, calculamos todas as possíveis correlações de classificação de Spearman fazendo uma correlação entre grupos bacterianos individuais (no nível UTO) e características específicas de desempenho do milho. A análise dos componentes agronômicos revelou que os filos Cyanobacterias, Patescibacteria, Bacteroidetes e Firmicutes apresentaram uma maior correlação positiva relacionada ao componente carbono microbiano. Isso sugere que a presença desses grupos microbianos específicos influenciou de forma substancial a absorção do carbono microbiano pela planta.

As rizobacterias Cyanobacterias, Bacteroidetes e Firmicutes mostraram ligação positiva para nitrogênio na planta. Para o diâmetro da folha Bacteroidetes e Firmicutes foram mais evidentes. Actinobacterias e Proteobacterias tiveram ação expressiva no nitrogênio microbiano. O resultado apresentado mostrou que Bacteroidetes agiu positivamente no desenvolvimento da massa seca da parte aérea da planta, e Cyanobacterias para massa seca da raiz. Isso indica que essas bactérias auxiliaram no crescimento e a produtividade do milho influenciados favoravelmente pelo ambiente da rizosfera.

Ainda foi possível observar que alguns grupos bacterianos específicos apresentaram correlação negativa com a produtividade. Este resultado indica que dois filos bacterianos que colonizam a rizosfera do milho, Thaumarchaeota e Verrucomicrobia, não contribuem para o aumento da produtividade da espécie *Zea mays L.*

E por fim, o diagnóstico das funções bacterinas demonstraram que aplicação de N pode alterar as funções potenciais da comunidade bacteriana do solo envolvida no processo de desenvolvimento do milho. Nota-se que a oxidação de amônia aeróbica, a nitrificação e a oxidação de nitrito aeróbico mostraram ser os processos do ciclo de N mais influenciados pela presença de nitrogênio e ambiente de cultivo do milho.

No processo de nitrificação biológica, em condições aeróbicas, o amônio é oxidado à nitrato em duas fases: na primeira, é levado até nitrito pelas bactérias oxidadoras de amônio (AOB), e numa etapa subsequente o nitrito é consumido pelas bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), produzindo nitrato (CHANG et al., 2011).

A reduzida taxa de nitrificação verificada em ecossistemas dominados por gramíneas, em florestas e na rizosfera de várias espécies como nabo, alface, centeio, trigo, cebola, girassol e algumas árvores nativas tem sido atribuída à presença e ação inibidora de fenólicos e terpenóides sobre as bactérias nitrificantes (Moreira, 2006)

Estudos destacam que o N utilizado pelas plantas sofre uma pequena alteração no sistema solo-planta-atmosfera (mineralização, imobilização, nitrificação, desnitrificação, processos de perdas e FBN) é possível se observar pequenas variações nas concentrações da sua molécula, tornando o N mais enriquecido no solo e nas plantas do que na atmosfera (Santos, Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2022).

Trabalhos salientam que as mudanças no perfil funcional da comunidade microbiana na rizosfera de plantas de milho podem ser explicadas pela diversidade genética, pelos efeitos ambientais na expressão gênica e pelas interações ecológicas entre as diferentes populações (Reis, 2018).

6.CONCLUSÕES

A análise da comunidade bacteriana na rizosfera de milho revela que a adubação nitrogenada influencia na diversidade, estrutura e composição do microbioma. O solo não rizosférico teve maior diversidade de bactérias que o solo rizosférico, tanto em amostras com adubação nitrogenadas quanto as sem adubação, para todos os grupos bacterianos.

Com isso, os resultados deste estudo confirmam que o N é um fator importante que influencia a comunidade microbiana rizosférica do milho. A análise genômica por meio de técnicas independentes de cultivo permitiu avaliar as interações entre comunidade bacteriana e rizosfera de milho, bem como permitir estabelecer estratégias de gestão das mesmas que sejam supressoras de doenças.

6.0 REFERENCIAS

ABADI, V. A. J.; SEPEHRI, M.; RAHMANIN, H. A.; DOLATABAD, H. K.; SHAMSHIRIPOUR, M.; KHATABI, B. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. **Journal of Applied Microbiology**. 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14975>

ALVES, DKM et al. ALVARENGA, MAR Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em. **DESENVOLVIMENTO, PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE FRUTOS DE TOMATEIRO SUBMETIDO A DOSES E FONTES DE FÓSFORO E LÂMINAS DE IRRIGAÇÃO**, v. 109, n. 2, p. 80, 2020.

ARRUDA, Letícia Machado. Seleção e caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de milho cultivadas no Rio Grande do Sul. 2012.

ARAÚJO, A. S. F. *et al.* Bacterial community associated with rhizosphere of maize and cowpea in a subsequent cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 143, p. 26-34. 2019.

BADRI, Dayakar V.; VIVANCO, Jorge M. Regulation and function of root exudates. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 6, p. 666-681, 2009.

BAKKER, Peter AHM et al. The rhizosphere revisited: root microbiomics. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 165, 2013.

BATISTA, Magnalda Maria Fernandes et al. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 315-318, 2003.

BERTONCELLI, Douglas Junior et al. Agronomic aspects of two *Physalis* species as a function of Nitrogen fertilization. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 2, p. 230-238, 2017.

BODDEY, Robert M.; DOBEREINER, Johanna. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Nitrogen economy in tropical soils**, p. 241-250, 1995.

BREDEMEIER, Christian; MUNDSTOCK, Claudio Mario. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.

CAMARGO, Kelly Cristina et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* para a produção de milho para silagem. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e6611326165-e6611326165, 2022.

CAMPOLINO, M. L. et al. **Perfil da comunidade bacteriana da rizosfera de milho cultivado em diferentes sistemas de produção**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 33, 2022, Sete Lagoas. Brasil: 200 anos de independência: sustentabilidade e desafios para a cadeia produtiva de grãos: resumos. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2022. Evento online.

CAPRIO, Carlos Henrique. Interação de variedades de milho sob inoculação com *Azospirillum brasilense* em diferentes épocas de semeadura. 2017.

CHANG, Chia-Yuan et al. Microbial community analysis of an aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 9, p. 5337-5344, 2011.

CHANWAY, C. P.; HOLL, F. B. Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 3, p. 507-511, 1991.

CHINAKWE, Etienne et al. Plant growth promoting rhizobacteria from local and hybrid maize (*Zea mays*) varieties. **AFST**, v. 20, p. 387-392, 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária / Companhia Nacional de Abastecimento** – v.1 – Brasília: Conab, 2013- v. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

COSKUN, Devrim et al. How plant root exudates shape the nitrogen cycle. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 8, p. 661-673, 2017.

COSTA, Diogo Paes da et al. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1694-1702, 2014.

COTTA, Simone Raposo et al. O microbioma da rizosfera e sua potencialidade. **Revista RG News**, v. 5, n.1, p. 42-47, 2019.

DE FARIA, Mirian Rabelo et al. The rhizosphere microbiome: functions, dynamics, and 2 bnrrole in plant protection. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 13-25, 2021.

DE LIMA, D. R. M. et al. Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop. **Archives of microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1089–1105, abr. 2021.

DHUNGANA, Ishwora; KANTAR, Michael B.; NGUYEN, Nhu H. Root exudate composition from different plant species influences the growth of rhizosphere bacteria. **Rhizosphere**, p. 100645, 2022.

DOS REIS, Denise Pacheco et al. Diversidade metabólica da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* sp. **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2018.

DOS SANTOS, Sara Regina Leite et al. Seleção diferencial de espécies de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal em milho, feijão-caupi e feijão-fava. **Rizosfera**, v. 24, p. 100626, 2022.

FARINA, Roberto et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

GRAYSTON, Susan J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 369-378, 1998.

HU, Jialin et al. Soil health management enhances microbial nitrogen cycling capacity and activity. **Mosphere**, v. 6, n. 1, p. e01237-20, 2021.

JÚNIOR, FB Reis; DA SILVA, LUCIA GRACINDA. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.

KIM, Hyemi et al. Agricultural practices of perennial energy crops affect nitrogen cycling microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104366, 2022.

LEITE, Romeu da Silva et al. Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, p. 145-151, 2017.

LI, Xiangzhen et al. Functional potential of soil microbial communities in the maize rhizosphere. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112609, 2014.

MARRERO, Mariana A. et al. Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplaneo de distintas especies cultivadas. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 132-137, 2015.

MATOS, IF e cols. (2021). Ecofisiologia do Nitrogênio em Relações Simbióticas de Plantas e Microrganismos. Em: Cruz, C., Vishwakarma, K., Choudhary, DK, Varma, A. (eds) **Soil Nitrogen Ecology. Soil Biology**, vol 62. Springer, Cham. https://doi-org.ez17.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-3-030-71206-8_2

MERLOTI et al., 2022 LF Merloti A. Pedrinho, LW Mendes, JB Gontijo, M. de C. da Fonseca, MG Chaves, SS de F. Chaves, PB de Camargo, SM Tsai. O uso prolongado da terra na Amazônia influencia a dinâmica das comunidades microbianas no solo e na rizosfera. **Rizosfera**, 21 (2022), Artigo 100482, [10.1016/j.rhisph.2022.100482](https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100482)

MONARD, Cécile et al. Habitat generalists and specialists in microbial communities across a terrestrial-freshwater gradient. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

MORALES, Marianela Estefanía et al. Effect of winter cover crops on the soil microbiome: a systematic literature review. **Revista Argentina de Microbiología**, 2021.

MOREIRA, Fátima; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica**. Editora Ufla, 2006.

NUNES, Amanda Rodrigues Alves et al. Nitrogen on plant growth and storage root quality of Arracacha. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 242, 2016.

OLIVEIRA, Christiane Abreu de et al. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1473-1482, 2009.

PHILIP, Prabha Susan; KARTHIKA, K. S.; RAJIMOL, R. P. Functional Nitrogen in Rhizosphere. In: **Soil Nitrogen Ecology**. Springer, Cham, 2021. p. 113-138.

PII, Youry et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and fertility of soils**, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 4, p. 590-596, 2013.

RASCHE, Frank et al. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS microbiology ecology**, v. 56, n. 2, p. 219-235, 2006.

SALAMONE, Inés Eugenia García de. Microbiología, bioeconomía y objetivos de desarrollo sostenible. **Revista argentina de microbiología**, v. 54, n. 2, p. 131-140, 2022.

Santos, Leandro Reis Costa VARIAÇÕES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E NAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM GENÓTIPOS DE MILHO RECOMENDADOS PARA CULTIVO EM PERNAMBUCO / Leandro Reis Costa Santos, 2022.

SHIMADA, Belmiro Saburo; SIMON, Marcos Vinícius; DA SILVA, Vinícius Bueno. ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO PELAS PLANTAS DE MILHO. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 19-19, 2021.

SILVA, Gabriela Martins; CUNHA, Claudia Duarte da; VIDEIRA, Sandy Sampaio. Bioprospeção de bactérias de solo agrícola submetido a aplicação de agrominerais como fontes alternativas de nutrientes para plantas. 2022.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TIAN, Xue-Ying; ZHANG, Cheng-Sheng. Illumina-based analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity of the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2288, 2017.

THOMÉ, Márcia; OSAKI, Flora. Adubação de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento de *Physalis* spp. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 1, p. 11-18, 2010.

UPADHYAY, Sudhir K. et al. Root exudates: Mechanistic insight of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable crop production. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

VIEIRA, Rosana Faria. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2017.

VOCCIANTE, Marco et al. The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. **Applied Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1231, 2022.

WEI, Z. et al. Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. **Science Advances**, v. 5, n. 9, p. eaaw0759, 2019.

YEOMANS, Jane C.; BREMNER, John Michael. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 19, n. 13, p. 1467-1476, 1988.