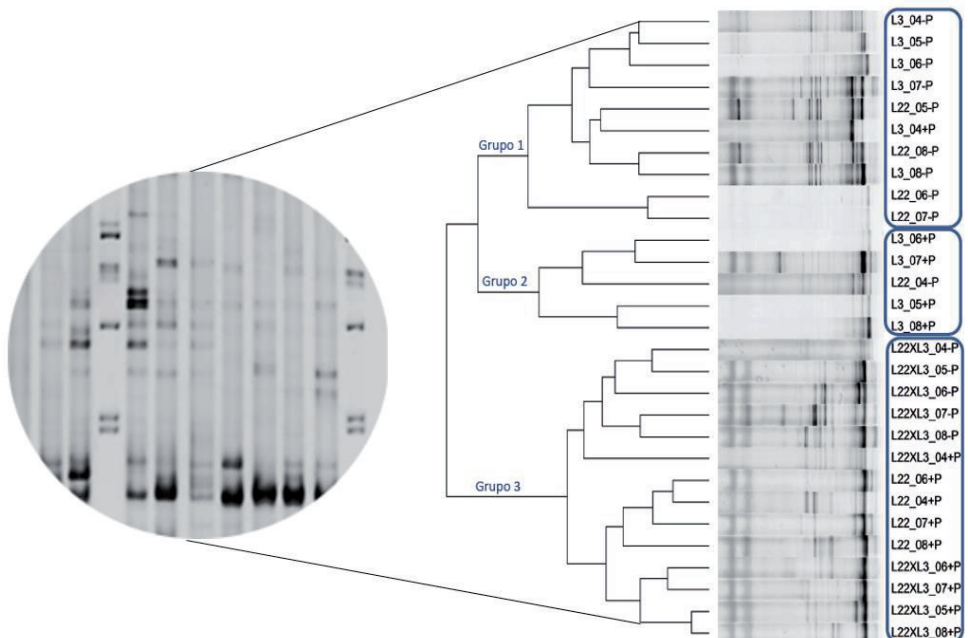


Microrganismos Endofíticos Associados a Raízes de Plantas de Milho (*Zea mays* L.) Cultivadas em Solo de Cerrado com Alta e Baixa Disponibilidade de Fósforo



ISSN 1679-0154
Dezembro 2016

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 153

Microrganismos Endofíticos Associados a Raízes de Plantas de Milho (*Zea mays* L.) Cultivadas em Solo de Cerrado com Alta e Baixa Disponibilidade de Fósforo

Eliane Aparecida Gomes
Carla Cristina de Avelar Oliveira
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Lauro José Moreira Guimarães

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

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

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Ubiraci Gomes de Paula Lana

1ª edição

Versão Eletrônica (2016)

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)
Embrapa Milho e Sorgo

Microrganismos endofíticos associados a raízes de plantas de milho (*Zea mays* L.) cultivadas em solo de cerrado com baixa e alta disponibilidade de fósforo / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.
28 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 153).

1. Microbiologia do solo. 2. Nutriente. 3. População microbiana. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	23
Referências	23

Microrganismos Endofíticos Associados a Raízes de Plantas de Milho (*Zea mays* L.) Cultivadas em Solo de Cerrado com Alta e Baixa Disponibilidade de Fósforo

*Eliane Aparecida Gomes*¹

*Carla Cristina de Avelar Oliveira*²

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*³

*Christiane Abreu de Oliveira Paiva*⁴

*Lauro José Moreira Guimarães*⁵

Resumo

O fósforo (P) é o segundo nutriente mais limitante na agricultura, o que leva à necessidade de aplicação de altas doses de fertilizantes, que torna a correção da fertilidade do solo um processo de elevados custos econômicos e ambientais para a produção agrícola. As plantas absorvem P principalmente na forma de íon-ortofosfato necessitando de contato direto das raízes com este elemento na solução do solo. Em ambientes de baixa disponibilidade, principalmente, os microrganismos são fundamentais à nutrição das plantas auxiliando na solubilização e aquisição de nutriente. O

¹Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

²Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig

³Químico, Mestre em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

⁴Eng.-Agrôn., D.Sc., Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

⁵Eng.-Agrôn., Ph.D., Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424, km 65, 35700-191 Sete Lagoas, MG, lauro.guimaraes@embrapa.br

objetivo desse trabalho foi caracterizar as comunidades de microrganismos endofíticos associados a raízes de genótipos de milho contrastantes na eficiência de aquisição de P, cultivados em solos com alta e baixa disponibilidade desse nutriente. Amostras de raízes das linhagens de milho L3 (eficiente na aquisição de P) e L22 (ineficiente na aquisição de P) e do híbrido L3xL22 foram lavadas em uma solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) por 60 min para eliminar o solo rizosférico. O DNA foi extraído das raízes, amplificado com primers específicos para fungos e bactérias e analisado por PCR-DGGE e sequenciado para identificação das comunidades microbianas. A análise dos géis de DGGE mostrou uma elevada diversidade microbiana, tanto no grupo de bactérias quanto de fungos endofíticos nos genótipos avaliados. De uma maneira geral, o nível de P no solo e os genótipos foram os fatores predominantes no agrupamento das bactérias e dos fungos. O sequenciamento de bandas das amostras dos géis indicou 50% dos microrganismos como bactérias não cultiváveis, enquanto o sequenciamento das amostras com primers específicos para fungos revelou a maior incidência de representantes dos filos *Ascomycota* e *Glomeromycota* (fungos micorrízicos arbusculares), principalmente dos gêneros *Dothideomycete* e *Scutellospora*, respectivamente, e também de fungos não cultiváveis. Os resultados demonstram influência do nível de P e do genótipo da planta hospedeira sobre a diversidade de comunidades microbianas que colonizam raízes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., fósforo, microrganismos endofíticos.

Endophytic Microorganisms Associated with Roots of Corn Plants (*Zea mays* L.) Grown in Cerrado Soils with High and Low Phosphorus Availability

*Eliane Aparecida Gomes*¹

*Carla Cristina de Avelar Oliveira*²

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*³

*Christiane Abreu de Oliveira Paiva*⁴

*Lauro José Moreira Guimarães*⁵

Abstract

Phosphorus (P) is the second most limiting nutrient in the agriculture, which leads to the need of application of high doses of fertilizers, making soil fertility remediation a process of high economic and environmental costs for agricultural production. Plants absorb P mainly in the form of orthophosphate ion, requiring direct contact of roots with this element in the soil solution. Mainly in low availability environment, microorganisms are essential to plant nutrition helping the solubilization and acquisition of nutrient. The aim of this study was to characterize the community of endophytic microorganisms associated with the roots of maize genotypes contrasting to P acquisition efficiency cultivated in soil with high and low availability of this nutrient. Root samples of the maize inbred lines L3 (efficient in P acquisition) and L22 (inefficient in P acquisition) and the hybrid L3xL22 were washed in a solution of 0.1 % (w/v) sodium pyrophosphate for 60 min to eliminate the rhizosphere soil. DNA was extracted from the roots, amplified with bacterial and fungi specific primers and analyzed by PCR-

DGGE and sequencing techniques for identification of the microbial communities. The analysis of the DGGE gels showed a high microbial diversity for bacterial and fungal endophytic in the genotypes evaluated. In general, P level in soil followed by the genotypes were the predominant factors in the overall distribution of bacteria and fungi. DNA sequencing of the gel bands indicated that 50% of the microorganisms were identified as non-cultured bacteria and the sequencing with fungi specific primers showed a higher incidence of representatives of phyla Ascomycota and Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi), especially *Dothideomycete* and *Scutellospora* genera, respectively, and also fungal uncultivated. The results showed the influence of P soil availability and the plant genotypes on the diversity of microbial communities that colonize maize roots.

Keywords: *Zea mays* L., phosphorus, endophytic microorganisms.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial, com uma produção acima de 76 milhões de toneladas na safra 2015/2016 em uma área total plantada de 15,7 milhões de hectares (CONAB, 2016). Para atender à grande demanda de grãos no País, tem ocorrido a expansão das fronteiras agrícolas para as regiões de Cerrado, que apresentam solos altamente intemperizados, ácidos, pouco férteis e com alta capacidade de fixação de fósforo (P) (NOVAIS; SMYTH, 1999).

Portanto, a obtenção de rendimentos elevados na maioria das culturas, como é particularmente importante na cultura do milho, exige altas doses de fertilizantes químicos, que aumentam significativamente o custo de produção agrícola (NOVAIS; SMYTH, 1999; BALIGAR et al., 2001). Entre as estratégias para minorar a necessidade de repetidas aplicações de fertilizantes está a utilização de genótipos mais eficientes na aquisição de P, combinada com práticas de manejo de solo e interações com microrganismos. Está bem estabelecido que os microrganismos provenientes do interior das plantas, endófitos, apresentam potencial como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na promoção de crescimento vegetal e no aumento da tolerância aos estresses hídricos e nutricionais (MEI; FLINN, 2010). Além disso, este grupo de microrganismos possui uma vantagem competitiva em relação aos demais por viverem dentro da planta e, portanto, protegidos de adversidades ambientais que afetam suas funções em determinados ecossistemas. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular baseadas em análises de DNA tem favorecido estudos ecológicos das populações de microrganismos endofíticos nativos, presentes nas áreas de cultivo, facilitando o entendimento do papel destes microrganismos na promoção do crescimento das plantas. Entre estas técnicas, o sequenciamento de rDNA (DNA ribossômico) e a eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE) têm sido as estratégias mais utilizadas para estudar as variações intra e interespecíficas na microbiota em amostras ambientais complexas (SOUZA et al., 2004). A vantagem da associação destas técnicas em estudos da estrutura de comunidades microbianas, além de economia de tempo, está na possibilidade de identificação filogenética destes microrganismos encontrados em condições naturais, sem a

necessidade de isolamento e cultivo *in vitro* (BRASIL, 2003; GOMES et al., 2014).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as comunidades de bactérias e fungos associadas a raízes de genótipos de milho contrastantes na eficiência de aquisição de P cultivados em solo com diferentes níveis deste nutriente.

Material e Métodos

Foram utilizadas duas linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa, contrastantes para eficiência no uso de P (linhagem L3, eficiente para uso de P e linhagem L22, ineficiente), e um cruzamento F1 entre estas linhagens (PARENTONI et al., 2011).

Amostragem e Extração de DNA

As plantas foram cultivadas em Latossolo Vermelho Distrófico, com baixo (4 mg P.dm^{-3}) e alto nível de P (30 mg P.dm^{-3}), em um delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Na fase de florescimento, 60 dias após o plantio, 5 g (peso fresco) de raízes finas foram coletadas, agitadas em peneira para separar o solo aderido e lavadas em uma solução de 0,1% (m/v) de pirofosfato de sódio, em um agitador horizontal, por 60 min, para eliminar o solo rizosférico. O DNA foi extraído das raízes lavadas utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

Amplificação por PCR

Para a amplificação parcial da região 16S rDNA de bactérias, foram utilizados os primers 1401R e 968F adicionados de um grampo CG (NÜBEL et al., 1996). Para a amplificação parcial da região 18S rDNA de fungos, foram utilizados os primers NS1 (WHITE et al., 1990) e EF3 (SMIT et al., 1999) na primeira reação, seguidos de 2 µl do produto da primeira reação, e os primers FF390 e FR1 adicionados de um grampo CG para a segunda reação (VAINIO; HANTULA, 2000).

Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Para a análise por DGGE foi utilizado DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos das reações de PCR foram aplicados em géis de poli(acrilamida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Os gradientes de desnaturação foram de 40-65% para bactérias e 35-55% para fungos, formados a partir de solução de acrilamida 6% contendo 0 e 100% de desnaturantes (7 M ureia e 40% formamida deionizada). Os fragmentos foram separados por eletroforese a 70 V por 16 horas na temperatura constante de 60 °C e então corados com solução de gel red (30 µl de gel red estoque, 2 ml de NaCl 5 M, 98 ml de água) sob agitação por 20 minutos. O gel foi fotografado no equipamento Transilluminator LPIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) sob luz UV.

Uma matriz de similaridade entre as amostras foi inferida a partir da imagem do gel de DGGE usando o programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) com o método Dice e uma tolerância de posição 1%.

Posteriormente foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group with Mathematical Average).

Sequenciamento de DNA

Bandas com boa definição foram removidas do gel de DGGE com auxílio de um bisturi, acondicionadas em microtubos de 1,5 ml contendo 50 μ l de água deionizada e armazenadas a 4 °C por aproximadamente 20 horas para eluição do DNA.

O DNA eluído foi utilizado em uma nova reação de PCR nas mesmas condições descritas na PCR, porém com os primers sem o grampo de CG. Para purificação do DNA, 1 μ l de cada uma das enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare, UK) foram adicionados a 10 μ l do produto da reação de PCR, sendo a reação submetida a 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 segundos, no equipamento Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

Para o sequenciamento de DNA, foi utilizado o kit “Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, sendo as amostras injetadas no equipamento 3500XL Genetic Analyzer (HITACHI, Japão). Para análise das sequências foi utilizado software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, EUA). As sequências foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BLASTN “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

Amplificação por PCR das Regiões 16S e 18S do rDNA

A amplificação do DNA das bactérias endofíticas presentes nas raízes dos genótipos de milho gerou fragmentos únicos com aproximadamente 450 pb, enquanto a amplificação do DNA de fungos endofíticos com os primers para a região 18S rDNA não gerou fragmentos visíveis no gel de agarose. Mesmo assim, procedeu-se à segunda reação, em que foram observados fragmentos com aproximadamente 390 pb. A amostra em branco utilizada como controle em ambas as reações não apresentou amplificação, indicando ausência de contaminação.

Diversidade Genética da Comunidade Endofítica por Análise de DGGE

Os géis de DGGE apresentaram bandas de DNA de diferentes tamanhos, indicando alta diversidade de bactérias e fungos endofíticos presentes nas amostras, tanto de raízes de linhagens quanto nas de híbrido de milho (Figuras 1 e 2). A análise das imagens dos géis permitiu a construção de dendrogramas que mostram o agrupamento das comunidades de bactérias e fungos (Figuras 3 e 4). Considerando uma similaridade de 65%, foram observados três grupos de comunidade de bactérias, separados de acordo com os níveis de P no solo e os genótipos da planta (Figura 3). O primeiro grupo foi representado pela linhagem L3 em alto P. O segundo grupo foi formado pelo híbrido cultivado em alta e baixa disponibilidade de P, indicando abundância similar de bactérias associada a este genótipo, independentemente do nível de P. Por outro lado, o terceiro grupo foi constituído de amostras da

linhagem L22 e a linhagem L3, em baixo P. Neste caso, os dados evidenciam maior influência do nível de P no solo em relação aos efeitos de genótipo nas interações bactérias - raízes.

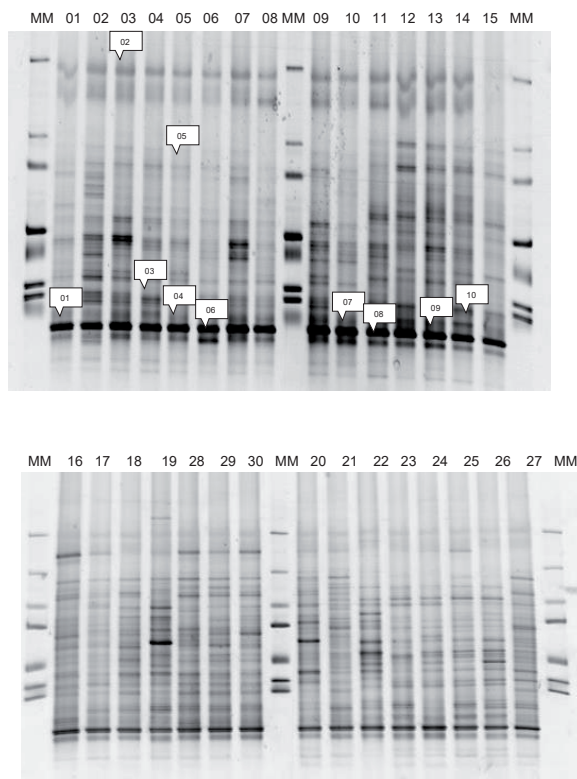


Figura 1. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de fragmentos amplificados da região 16S rDNA de bactérias endofíticas. Amostras 01 a 05: linhagem L3 cultivada em baixo P; 06 a 10: L3 em alto P; 11 a 15: L22 em baixo P; 16 a 20: L22 em baixo P; 21 a 25: híbrido L3xL22 em baixo P; 26 a 30: L3xL22 em alto P. MM: marcador molecular 1 kb Plus DNA ladder. As setas indicam as bandas que foram removidas para sequenciamento de DNA.

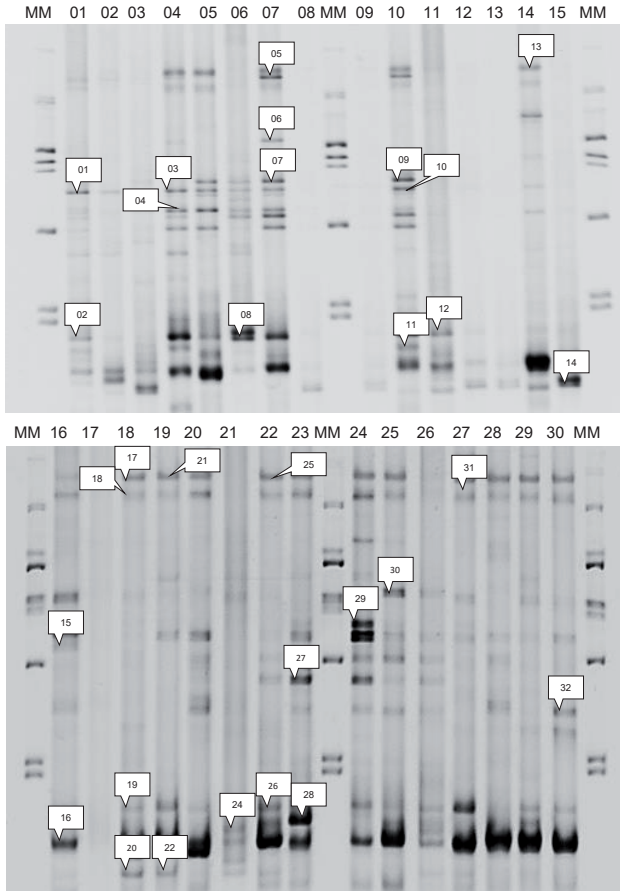


Figura 2. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de fragmentos amplificados da região 18S rDNA de fungos endofíticos. Amostras 01 a 05: linhagem L3 cultivada em baixo P; 07 a 11: L22 em baixo P; 12 a 15 e 06: L3 em alto P; 16 a 20: L22 em alto P; 21 a 25: híbrido L3xL22 em baixo P; 26 a 30: L3xL22 em alto P. MM: marcador molecular 1 kb Plus DNA ladder. As setas indicam as bandas que foram removidas para sequenciamento de DNA.

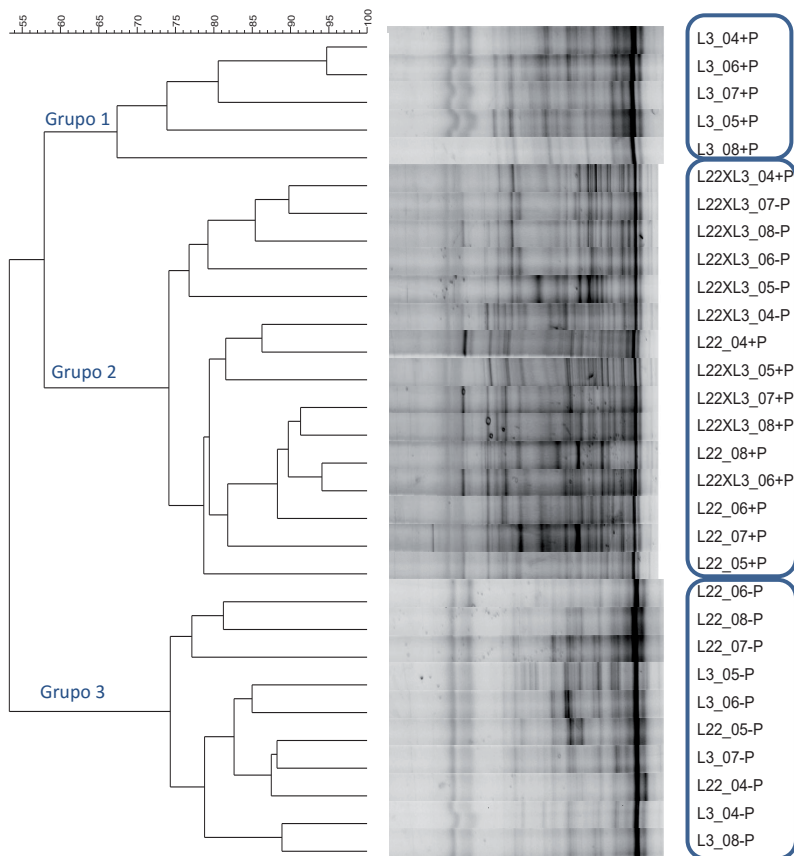


Figura 3. Dendrograma da comunidade bacteriana presente em raízes de genótipos de milho contrastantes quanto ao uso de P cultivados em solo com alto P (+P) e baixo P (-P).

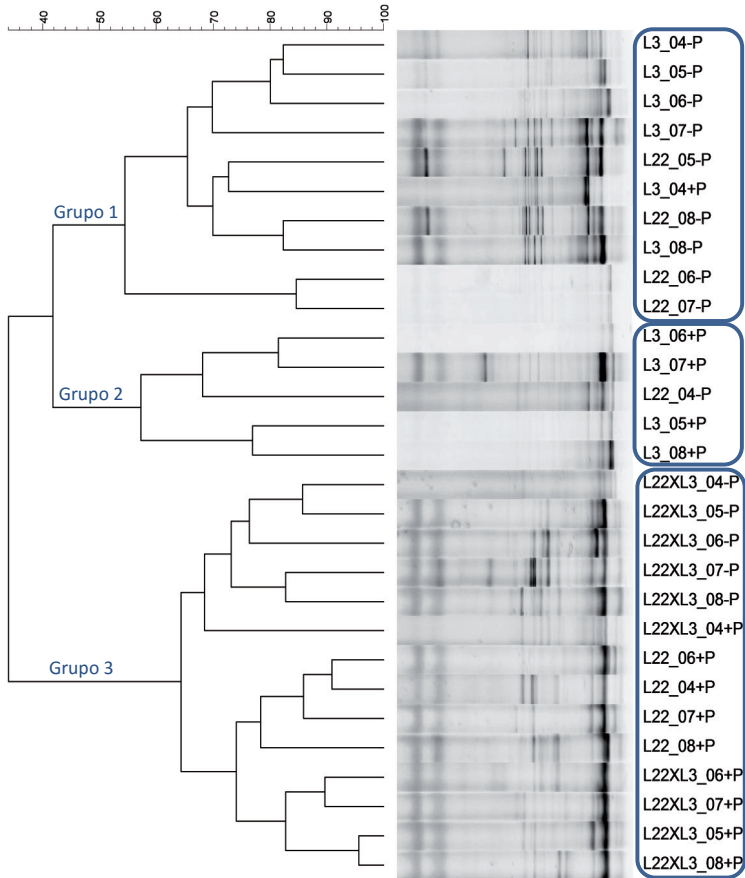


Figura 4. Dendrograma da comunidade de fungos presente em raízes de genótipos de milho contrastantes quanto ao uso de P cultivados em solo com alto P (+P) e baixo P (-P).

O agrupamento da linhagem L3 cultivada em alto fósforo reforça os resultados de Marriel et al. (2005), que consideraram que a morfologia do sistema radicular é influenciada pelo genótipo, e esse conjunto influencia a rizodeposição de

fotoassimilados e, conseqüentemente, a comunidade microbiana. O maior volume de raízes da linhagem L3 (SOUSA et al., 2010) associado à taxa de liberação de exsudatos pelas raízes favorece o aumento da densidade populacional de microrganismos, especialmente de bactérias (MARSCHNER et al., 2001), e, em parte, justifica esse perfil distinto de colonização observado.

Embora alguns trabalhos demonstrem que os genótipos hospedeiros influenciam a comunidade microbiana da rizosfera em razão da diferença existente na sinalização emitida pelas raízes (MARSCHNER et al., 2006; AIRA et al., 2010), a maioria dos estudos disponíveis consubstancia os resultados que demonstram predominância do efeito de disponibilidade de P sobre o de genótipo na seleção de microrganismos associados às plantas de milho (GOMES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009).

A análise do dendrograma obtido a partir das imagens dos géis com as amostras de DNA amplificadas com primers para fungos revela uma tendência de agrupamentos da comunidade fúngica em três grupos, sendo influenciada principalmente pelos níveis de P no solo, seguido pelos genótipos, considerando um índice de similaridade de 50%. Porém, neste caso, de forma menos acentuada do que a detectada para bactérias (Figura 4).

Observa-se que a comunidade fúngica endofítica da linhagem L3 foi agrupada com a linhagem L22, ambas na condição de baixo P. Pode-se especular que mesmo tratando-se de linhagens com características contrastantes, a limitação de P induz algum mecanismo que favorece a seleção de uma comunidade fúngica semelhante.

Um segundo grupo foi formado pela linhagem L3 em alto P. A linhagem L3 apresenta uma característica particular com maior volume de raízes e pelos radiculares que permitem a este genótipo uma melhor exploração do solo (BRASIL, 2003; SOUSA et al., 2012). Essa condição pode ter favorecido uma colonização diferenciada separando esse grupo das demais amostras avaliadas. Oliveira et al. (2009) sugeriram que os genótipos de milho eficientes apresentam maior taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em comparação com os genótipos ineficientes para ambos os níveis de P no solo, e indicaram que alguns grupos de FMA podem ser favorecidos por genótipos de milho eficientes.

O híbrido cultivado em alto e baixo P e a linhagem L22 cultivada em alto P formaram o último grupo. Dois subgrupos foram observados: um formado pela linhagem L22 e pelo híbrido L22xL3 ambos em alto P e outro pelo híbrido L22xL3 em baixo P. Brasil (2003) observou maiores diversidades microbianas de híbridos de milho quando cultivados em baixo P. De modo similar, Gomes et al. (2010) constataram tendência de redução da diversidade das comunidades de FMA em função do aumento da disponibilidade de P.

Identificação Molecular de Bactérias e Fungos Endofíticos

Para a identificação dos microrganismos presentes nas amostras, foram sequenciadas 10 bandas removidas do gel de DGGE para bactérias (Figura 1) e 31 bandas removidas dos géis de DGGE para fungos (Figura 2). Das 41 sequências obtidas, vinte e sete apresentaram similaridade igual ou superior a 95% com sequências depositadas no GenBank.

A comparação das sequências de bactérias indicou que 50% delas foram de bactérias não cultiváveis (Tabela 1). Como já exposto, a técnica de PCR-DGGE permite uma análise da diversidade ambiental, sendo essa uma de suas vantagens sobre técnicas que dependem de cultivo de microrganismos. Dentre as bactérias identificadas como não cultiváveis, uma foi obtida a partir de amostra da linhagem L3 em alto P e quatro foram obtidas de L22 em baixo P. É importante salientar que algumas bandas sequenciadas indicaram a presença de DNA de cloroplastos, sugerindo que os primers utilizados também amplificaram genes de rRNA mitocondrial e plastidial.

Tabela 1. Identificação molecular a partir de ampliações da região 16S rDNA das bactérias endofíticas presentes nas raízes de genótipos de milho cultivados em condições de alto (+P) e baixo P (-P).

Identificação da banda no DGGE	Tratamento	Descrição	E-value	Identidade (%)	Acesso GenBank
01	L3_04-P	Chloroplast	5e ⁻¹¹¹	93	HQ731441.1
02	L3_06-P	Chloroplast	2e ⁻¹⁵⁵	95	KT281157.1
03	L3_07-P	Chloroplast	0.0	99	KT281157.1
04	L3_08-P	Chloroplast	6e ⁻¹⁶⁶	97	KT281157.1
05	L3_08-P	Chloroplast	3e ⁻¹³³	95	KT281157.1
06	L3_04+P	Uncultured bacterium	0.0	99	KM277709.1
07	L03_08+P	Uncultured bacterium	0.0	99	KM277709.1
08	L22_04-P	Uncultured bacterium	2e ⁻¹²⁵	90	KF101526.1
09	L22_06-P	Uncultured bacterium	0.0	99	KM277709.1
10	L22_07-P	Uncultured bacterium	7e ⁻¹⁵¹	89	KM277709.1

Em razão da grande quantidade de bactérias não cultiváveis encontrada, sugere-se uma maior exploração desse grupo para ampliar o conhecimento sobre a composição, interação e a abundância da comunidade bacteriana nestes tipos de amostras. Estes aspectos são requisitos indispensáveis para futuras aplicações microbiológicas relacionadas à qualidade

biológica do solo, fitossanidade, fitorremediação e tolerância das plantas a estresses abióticos (CHAUHAN et al., 2011).

Do total de 31 amostras sequenciadas de fungos, nove foram identificadas como pertencentes ao filo Ascomycota, distribuídos entre os gêneros *Microdochium* e *Acremonium* e as classes *Eurotiomycetes* e *Dothideomycete*; doze como pertencentes ao filo Glomeromycota, distribuídos entre os gêneros *Scutellospora*, *Glomeromycota*, *Cetraspora*, ordem Archaeosporales; três como fungos micorrízicos não cultiváveis; e seis amostras de fungos não cultiváveis. Houve ainda representantes de Basidiomycota (uncultured *Tomentella*), Blastocladiomycota (*Urophlyctis pulposa*) e Mucoromycotina (*Mucoromycotina* sp.) e um eucarioto não cultivado (Tabela 2).

A classe de fungos predominante, *Dothideomycete*, foi encontrada em associação com a linhagem L3 em ambos os níveis de P, e com a linhagem L22, em baixo P. Esta classe de fungos apresenta alta diversidade biológica incluindo patógenos de plantas que infectam uma ampla gama de hospedeiros (OHM et al., 2012). Podem também ser encontrados como endófitos ou epífitas de plantas vivas e também como saprófitos que utilizam celulose e outros carboidratos complexos em tecidos mortos ou matéria vegetal. Segundo Baker et al. (2009), esta classe de fungos é comum em ambientes ácidos, indicando que eles apresentam tolerância a esse tipo de solo.

Tabela 2. Identificação molecular a partir de ampliações da região 18S rDNA dos fungos endofíticos presentes nas raízes de genótipos de milho cultivados em condições de alto (+P) e baixo P (-P).

Identificação da banda no DGGE	Tratamento	Descrição	E-value	Identidade (%)	Acesso GenBank
01	L3_04-P	<i>Dothideomycete</i> sp.	0.0	99	AY275186.1
02	L3_04-P	<i>Dothideomycete</i> sp.	0.0	98	AY275186.1
03	L3_07-P	Uncultured <i>Tomentella</i>	2e ⁻⁴¹	96	FJ554280.1
04	L3_07-P	Uncultured eukaryote	2e ⁻¹⁷⁶	99	DQ430734.1
05	L22_04-P	<i>Eurotiomycetes</i> sp.	5e ⁻¹⁵⁶	98	KP115824.1
06	L22_04-P	<i>Acremonium</i> sp.	2e ⁻⁶⁶	99	KC987184.1
07	L22_04-P	<i>Dothideomycete</i> sp.	2e ⁻¹⁷⁵	97	AY275186.1
08	L3_04+P	<i>Microdochium</i> sp.	4e ⁻²⁸	88	AB255215.1
09	L22_07-P	<i>Urophlyctis pulposa</i>	1e ⁻¹⁰⁷	90	HQ888719.1
10	L22_07-P	Uncultured mycorrhizal fungus	4e ⁻¹²⁷	95	AB594911.1
11	L22_07-P	Uncultured fungus	6e ⁻¹⁰⁴	98	AB534513.1
12	L22_08-P	<i>Dothideomycete</i> sp.	0.0	99	AY275186.1
13	L3_07+P	<i>Dothideomycete</i> sp.	1e ⁻¹²⁷	93	AY275186.1
14	L3_08+P	<i>Dothideomycete</i> sp.	5e ⁻¹⁴⁷	94	AY275186.1
15	L22_04+P	Uncultured mycorrhizal fungus	8e ⁻¹⁰⁴	92	AB594914.1
16	L22_04+P	Uncultured mycorrhizal fungus	8e ⁻¹²⁴	94	AB594911.1
17	L22_06+P	Uncultured mycorrhizal fungus	5e ⁻¹⁴¹	97	AB594911.1
18	L22_06+P	Uncultured fungus	2e ⁻¹⁰⁴	92	FM202452.1
19	L22_06+P	Uncultured fungus	8e ⁻⁶⁹	87	EF628933.1
20	L22_06+P	<i>Scutellospora reticulata</i>	7e ⁻¹⁰⁰	90	AJ871270.1
21	L22_07+P	<i>S. savannicola</i>	2e ⁻¹³⁹	97	HE962472.1
22	L22_07+P	<i>Glomeromycota</i> sp.	6e ⁻¹²⁰	96	KJ952240.1
23	L3xL22_04-P	<i>Cetranspora gilmorei</i>	1e ⁻¹⁷³	99	FR773143.1
24	L3xL22_05-P	Uncultured fungus	2e ⁻¹¹⁵	92	KC672550.1
25	L3xL22_05-P	Uncultured <i>Archaeosporales</i>	1e ⁻¹¹¹	97	HE775352.1
26	L3xL22_06-P	<i>Glomeromycota</i> sp.	1e ⁻¹⁶²	98	KJ952237.1
27	L3xL22_06-P	<i>Glomeromycota</i> sp.	9e ⁻¹¹⁴	87	KJ952240.1
28	L3xL22_07-P	<i>Glomeromycota</i> sp.	5e ⁻⁹⁵	95	KJ952240.1
29	L3xL22_08-P	<i>Mucoromycotina</i> sp.	2e ⁻¹²⁹	97	KJ921774.1
30	L3xL22_05+P	Uncultured fungus	0.0	100	KC670714.1
31	L3xL22_08+P	Uncultured fungus	2e ⁻¹⁷¹	98	KC672750.1

Na linhagem L22 em alto P e no híbrido (L3xL22) em baixo P, foram detectados os fungos micorrízicos arbusculares do filo Glomeromycota: *Glomeromycota*, *Cetraspora gilmorei*, *Scutellospora reticulata*, *S. savannicola* e *Uncultured Archaeosporales*. Glomeromycota é um filo onde estão classificados os fungos micorrízicos arbusculares, endossimbiontes obrigatórios que colonizam as raízes das plantas e formam arbúsculos (SOUZA et al., 2008) e vesículas, que são estruturas responsáveis pela troca de nutrientes e reserva, respectivamente (SIQUEIRA et al., 2002). Essa distribuição observada reforça os resultados encontrados por GOMES et al. (2010), que ao utilizar primers específicos para Glomeromycetos observaram a existência de mudança na estrutura das comunidades de FMA em função do aumento da disponibilidade de P.

Os resultados mostram que mais de 60% dos representantes micorrízicos encontrados foram identificados em plantas cultivadas em baixa disponibilidade de P, incluindo os não cultiváveis. Gomes et al. (2010) encontraram alta diversidade de FMA colonizando as raízes de genótipos de milho, inclusive com bandas exclusivas em linhagens eficientes cultivadas sob baixo teor de P.

Diversos autores têm enfatizado a necessidade de avaliações de longa duração na análise da dinâmica das comunidades microbianas no solo (MUYZER; SMALLA, 1998; SZOBOSZLAY et al., 2015). Com isso, consideramos que os resultados encontrados nesse trabalho são parciais, sendo importante a avaliação de experimentos a longo prazo para um maior entendimento da dinâmica da população de microrganismos endofíticos associado às plantas de milho.

Conclusões

A disponibilidade de P no solo, seguida pelo genótipo, constitui o fator mais importante em modular a estrutura da comunidade de bactérias e de fungos que colonizam as raízes do milho.

As bactérias e os fungos endofíticos não cultiváveis estão presentes e fazem parte das comunidades colonizadoras de raízes de plantas de milho.

No grupo dos fungos, os filos *Actinomycota* e *Glomeromycota* são predominantes nas raízes dos genótipos de milho analisados.

Referências

AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓNA, M.; LAZCANOA, C.; BÅÅTHB, C.; DOMÍNGUEZA, J. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 2276-2281, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BAKER, B. J.; TYSON, G. W.; GOOSHERST, L.; BANFIELD, J. F. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2192-2199, 2009.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K.; HE, Z. L. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.

BRASIL, E. C. **Mecanismos envolvidos na eficiência de aquisição de fósforo em genótipos de milho**. 2003. 161 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento.

Acompanhamento safra brasileira de grãos: safra 2015/16: décimo segundo levantamento. Brasília, DF, 2016. 180 p.

GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; PAIVA, C. A. O.; NODA, R. W.; ZHANG, B.; TIEDJE, J. Metagenoma das comunidades microbianas presentes na rizosfera e raízes de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPDÓPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA E ALGODÃO, 1., 2014, Salvador. **Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global: resumos expandidos**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014. 1 CD-ROM.

GOMES, E. A.; SOARES, F. A. de O.; LANA, U. G. de P.; SOUZA, F. A. de. Caracterização molecular de fungos micorrízicos arbusculares associados a genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.;

REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: anais.** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. FertBio 2010.

MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A. de; RAPOSEIRAS, R.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P. **Aplicação da técnica eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) na caracterização de microrganismos dominantes na rizosfera de plantas cultivadas em solo ácido.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 72).

MARSCHNER, P.; YANG, C.-H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. R. Rhizosphere properties of poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 11-24, 2006.

MEI, C.; FLINN, B. S. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 4, p. 81-95, 2010.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 127-141, 1998.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

OHM, R. A.; FEAU, N.; HENRISSAT, B.; SCHOCH, C. L.; HORWITZ, B. A. et al. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. **PLoS Pathogens**, v. 8, e1003037, 2012.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C. **Análise da diversidade micorrízica na rizosfera de genótipos de milho (*Zea mays* L.) contrastantes para eficiência no uso de P utilizando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 29 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16).

PARENTONI, S. N.; MENDES F. F.; GUIMARAES, L. J. M. Melhoramento para eficiência no uso de fósforo. In: FRITSCHENETO, R.; BORÉM, A. (Org.). **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 101-126.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 12-21, 2002.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; ELSAS, J. D. van; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2614-2621, 1999.

SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

SOUSA, S. M. de; PARENTONI, S. N.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. de; VASCONCELOS, M. J. V. de. **Análise do sistema radicular para seleção de genótipos de milho mais eficientes na aquisição de fósforo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 24).

SOUZA, F. A.; KOWALCHUK, G. A.; LEEFLANG, P.; VAN VEEN, J. A.; SMIT, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1413-1424, 2004.

SOUZA, F. A.; SILVA, I. C. L.; BERBARA, R. L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.;

BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. p. 483-536.

SZOBOSZLAY, M.; LAMBERS, J.; CHAPPELL, J.; KUPPER, J. V.; MOE, L. A.; MCNEAR JR., D. H. Comparison of root system architecture and rhizosphere microbial communities of Balsas teosinte and domesticated corn cultivars. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 80, p. 34-44, 2015.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 927-936, 2000.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

