

MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS A RAÍZES DE GENÓTIPOS DE MILHO CONTRASTANTES NA EFICÊNCIA DE AQUISIÇÃO DE FÓSFORO¹

Carla Cristina de Avelar Oliveira², Ubiraci Gomes de P. Lana³, Eliane Aparecida Gomes⁴

¹ Trabalho financiado pela Fapemig/Embrapa

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

³ Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM

⁴ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial, com uma produção de 79 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2015). Sua utilização é abrangente a diversos setores, com destaque para a indústria de rações, que consome cerca de 70% a 80% da produção mundial (PAES, 2006; GARCIA et al., 2008).

Buscando uma maior produtividade da lavoura, os produtores comerciais de grãos investem em tecnologias que propiciem um menor custo com manejo de solo e utilização de fertilizantes (SOUZA; PIRES, 2013). Uma alternativa para reduzir esses custos consiste na utilização de microrganismos associados às plantas para potencializarem a absorção de nutrientes do solo (OLIVEIRA et al., 2009), diminuindo a necessidade de repetidas aplicações de fertilizantes.

Além dos benefícios causados pela interação da planta com os microrganismos do solo, existe ainda a variação entre os genótipos das plantas que atuam diretamente tanto no processo de colonização quanto de absorção de nutrientes do solo. Genótipos que emitem maior número de raízes são considerados mais eficientes na aquisição de P pelo seu maior poder de exploração do solo. Além disso, é importante considerar a resposta metabólica de cada genótipo quando submetido à situação de estresse (SOUSA et al., 2010).

O objetivo desse trabalho foi identificar as comunidades de bactérias e fungos endofíticos e aqueles associados às raízes de genótipos de milho contrastantes na eficiência de aquisição de P cultivado em diferentes níveis de P do solo por meio das técnicas de DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) e sequenciamento de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e Extração de DNA

Foram utilizadas as linhagens de milho L3 – eficiente na aquisição de P, e L22 – ineficiente na aquisição de P, conforme caracterização definida por Sousa et al. (2012) e ainda um híbrido F₁ (L3xL22), resultante do cruzamento dessas duas linhagens.

Os genótipos foram cultivados em solos com baixo (4 mg P.dm⁻³) e alto nível de P (30 mg P.dm⁻³) em um delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Na fase de florescimento, 60 dias após o plantio, amostras de raízes de milho foram coletadas e lavadas em uma solução de 0,1% (m/v) de pirofosfato de sódio. O DNA foi extraído das raízes utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

Amplificação por PCR

As amostras de DNA foram amplificadas com primers universais de bactérias e fungos. Para a amplificação parcial da região 16S rDNA de bactérias, foram utilizados os primers 1401R e 968F_CG (NÜBEL et al., 1996). Na amplificação parcial da região 18S

rDNA de fungos, foram utilizados os primers NS1 (WHITE et al., 1990) e EF3 (SMIT et al., 1999). Para a segunda reação da região 18S rDNA foram utilizados os primers FF390 e FR1_CG (VAINIO; HANTULA, 2000).

Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os gradientes de desnaturação foram de 40 - 65% para bactérias e 35 - 55% para fungos. Os fragmentos foram separados por eletroforese a 70 V por 16 horas na temperatura constante de 60 °C. Os géis foram corados com solução de gel red (30 µl de gel red estoque, 2 ml de NaCl 5 M, 98 ml de água). 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

As bandas de interesse foram removidas do gel de DGGE e eluídas em 50 µl de água deionizada, em geladeira a 4 °C por, aproximadamente, 20 horas. O DNA eluído foi utilizado em uma nova reação de PCR nas mesmas condições descritas na PCR para bactérias e para os fungos com os primers FF390 e FR1_CG.

A reação de purificação da PCR foi realizada com as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare, UK) e a reação de sequenciamento utilizando o kit “Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado no equipamento 3500xL Genetic Analyzer RUO (HITACHI, Japan), conforme recomendações do fabricante. Para análise das sequências foi utilizado software Sequencer 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 BLAST “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 de bactérias endofíticas com os primers universais para a região 16S rDNA gerou fragmentos únicos com aproximadamente 450 pb. A amplificação do DNA de fungos endofíticos com os primers para a região 18S rDNA – NS1 x EF3 não gerou fragmentos visíveis, mesmo assim, procedeu-se a segunda reação, com os primers FF390 x FR1_GC, em que foram observados fragmentos com aproximadamente 390 pb.

A amostra em branco utilizada como controle tanto nas reações de amplificação de bactérias como de fungos não apresentou amplificação, indicando ausência de contaminação.

Diversidade Genética da Comunidade Endofítica por Análise de DGGE

De uma maneira geral, as amostras analisadas apresentaram comunidades microbianas com alta diversidade genotípica. Entretanto linhagens cultivadas em baixo P apresentaram menor diversidade genética (padrão com menor número de bandas) diferenciando-se dos híbridos submetidos a esse mesmo tratamento que apresentaram um padrão de bandas mais intenso tanto em alto quanto em baixo P. Considerando uma similaridade de 65%, o dendrograma da comunidade bacteriana permitiu a separação de três grupos, baseados nos genótipos e níveis de P no solo (FIG.1). O primeiro grupo foi representado pela linhagem L3 em alto P.

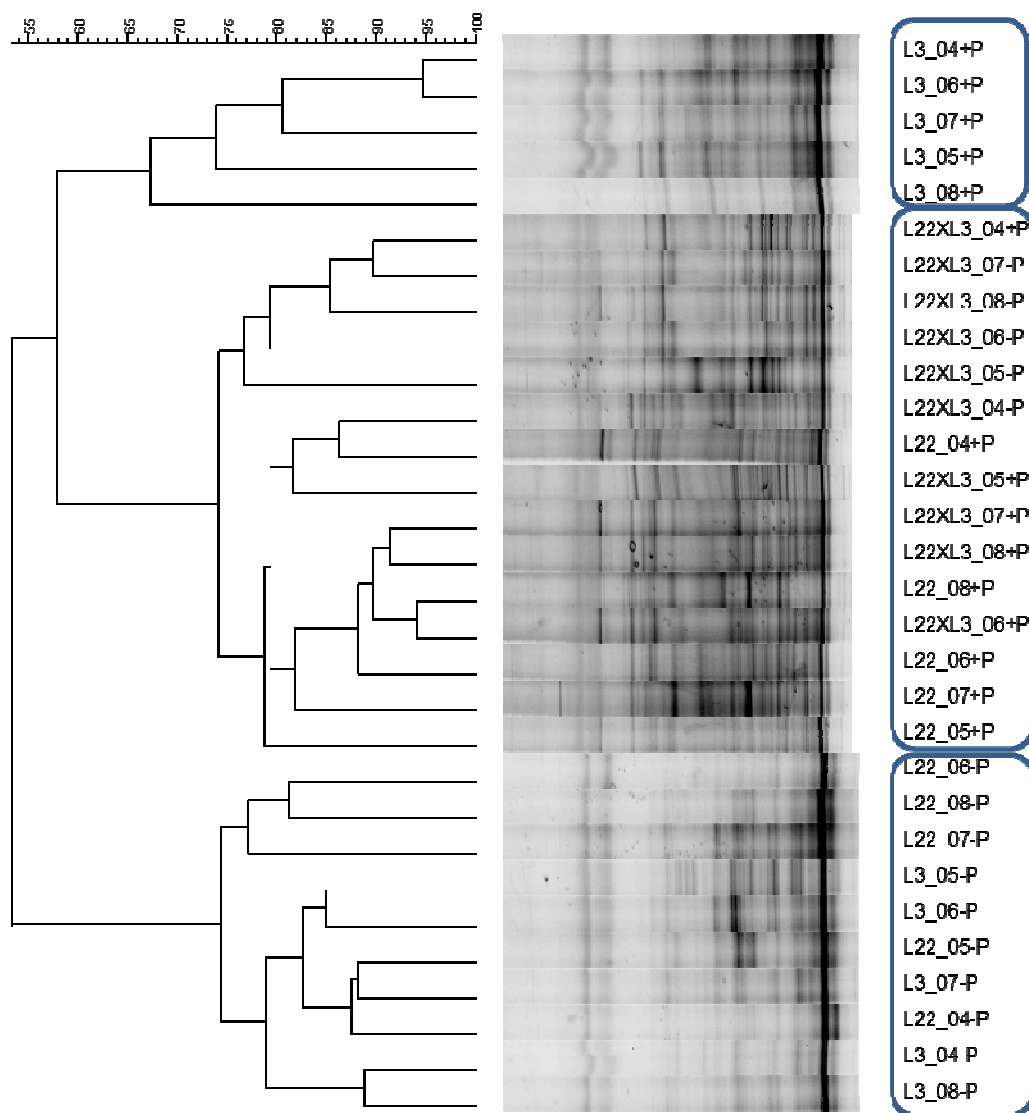


Figura 1 – Dendrograma da comunidade bacteriana presente em raízes de genótipos de milho contrastantes quanto ao uso de P cultivados em solo com alto P (+P) e baixo P (-P).

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 dessa linhagem (SOUSA et al., 2010) e o fato de a taxa de liberação de carbono orgânico pelas raízes favorecer o aumento da densidade populacional de microrganismos, especialmente de bactérias (MARSCHNER et al., 2001), podem justificar esse perfil distinto de colonização.

O segundo grupo foi formado pelos híbridos cultivados tanto em alto quanto em baixo P, na região central do dendrograma, indicando a presença de colonização similar em ambos, independentemente do tratamento ao qual foi submetido, indicando, nesse caso, que o P não afetou a diversidade de microrganismos.

A linhagem L22 em baixo P formou o terceiro grupo juntamente com a linhagem L3 também em baixo P, indicando que os níveis de P no solo tiveram maior influência que o genótipo na seleção das bactérias que colonizaram as raízes das linhagens. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que genótipos diferentes influenciam a comunidade microbiana da rizosfera devido a diferença existente na sinalização emitida pelas raízes (MARSCHNER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), a maioria dos estudos reforça a ideia de que o teor de P no solo tem maior efeito que o genótipo na seleção de microrganismos associados a genótipos de milho (GOMES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Avaliando o dendrograma obtido a partir da análise das imagens dos géis de fungos observa-se uma tendência de agrupamento influenciada principalmente pelos tratamentos de alto e baixos níveis de P no solo em comparação com os genótipos, porém de forma menos acentuada do que para bactérias. Considerando uma similaridade de 50%, o dendrograma da comunidade fúngica associada à raiz permitiu a separação de três grupos, baseados nos genótipos e níveis de P no solo (FIG. 2).

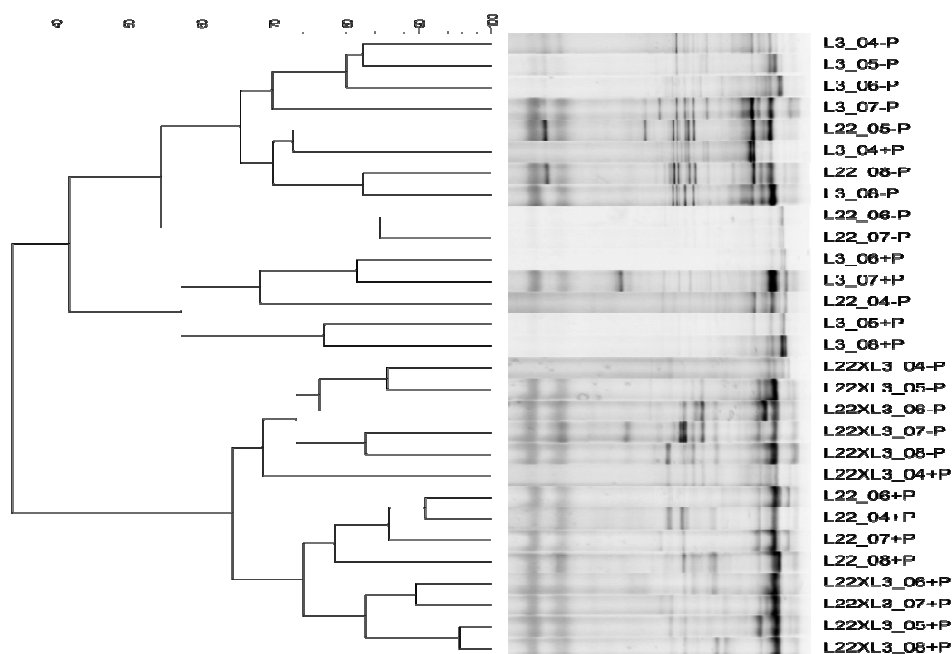


Figura 2 – Dendrograma da comunidade de fungos presente em raízes de genótipos de milho contrastantes quanto ao uso de P cultivados em solo com alto e baixo P.

A comunidade fúngica endofítica da linhagem L3 foi agrupada com a linhagem L22, ambas na condição de baixo P. Mesmo se tratando de linhagens com características contrastantes, a limitação de P parece ter induzido algum mecanismo nesses genótipos que favoreceu a seleção de uma comunidade fúngica semelhante. Isso reforça os resultados reportados por Gomes et al. (2008, 2010) de que o nível de P no solo foi mais importante na distribuição das comunidades microbianas do que os genótipos avaliados. No entanto, Oliveira et al. (2009) encontraram um aumento na infecção por fungos micorrízicos de cerca de 20% na linhagem L3 em situação de estresse de P quando comparado com o solo com alto P.

Um segundo grupo foi formado pela linhagem L3 em alto P. Como já citado, 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

isolando 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 em comparação com os genótipos ineficientes para ambos os níveis de P no solo e indicam que alguns grupos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem ser favorecidos por genótipos de milho eficientes. Os híbridos cultivados em alto e baixo P e a linhagem L22 cultivada em alto P formaram o último grupo assim como observado no dendrograma para bactérias. 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 em certos híbridos de milho quando cultivados em baixo P. 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 bactérias e 31 bandas removidas dos géis de fungos.

O sequenciamento das amostras dos géis de bactérias indicou que 50% foram de bactérias não cultivadas (dados não mostrados). Considerando a grande quantidade de bactérias não cultivadas é indicada uma maior exploração desse grupo para o conhecimento sobre a composição, interação e a abundância da comunidade bacteriana, aspectos esses que são requisitos indispensáveis para futuras aplicações microbiológicas em áreas como a saúde do solo, promoção da saúde da planta, fitorremediação e tolerância a estresses abióticos (CHAUHAN et al., 2011).

Algumas bandas sequenciadas mostraram a presença de DNA de cloroplastos, indicando que o primer não foi específico para a região 16S rDNA de bactérias. Esse fato pode ser atribuído à teoria da endossimbiose descrita por Griffiths et al. (2013). Contudo, a seleção de primers que não amplificam o DNA de cloroplasto foi utilizada com sucesso por Ramond et al. (2013), em um estudo de variabilidade de comunidades bacterianas endofíticas e rizosféricas em sorgo sacarino realizado com o uso de DGGE.

Dentre as 31 amostras de fungos sequenciadas (Tabela 1), a classe prevalente foi a Dothideomycete que foi identificada na linhagem L3 em ambos os tratamentos e na linhagem L22 em baixo P. Trata-se de fungos do filo Ascomycota, o mais numeroso dentro do Reino Fungi. Essa classe apresenta um alto nível de diversidade ecológica, incluindo muitos patógenos de plantas que infectam uma ampla gama de hospedeiros (OHM et al., 2012). São frequentemente encontrados como agentes patogênicos, endófitos ou epífitas de plantas vivas e também como saprófitos que utilizam de celulose e outros carboidratos complexos em tecidos mortos ou matéria vegetal. Segundo Baker et al. (2009), estes são fungos comuns de ambientes ácidos, indicando que eles apresentam tolerância a esse tipo de solo.

Na linhagem L22 em alto P e no híbrido (L3xL22) em baixo P, foram identificados os fungos do filo Glomeromycota: *Glomeromycota.*, *Cetraspora gilmorei*, *Scutellospora reticulata*, *S. savannicola*, uncultured *Archaeosporales* e unclassified Glomeromycota. Glomeromycota é um filo onde estão classificados os fungos micorrízicos arbusculares, endossimbiontes obrigatórios que colonizam as raízes das plantas, formando arbúsculos (SOUZA et al., 2008) e vesículas que são estruturas responsáveis pela troca de nutrientes e reserva, respectivamente (SIQUEIRA et al., 2002).

Tabela 1 - Identificação molecular a partir de ampliações da região 18S rDNA dos microrganismos endofíticos presentes nas raízes de linhagens e de um híbrido de milho cultivados em condições de alto e baixo P.

Identificação	Descrição	E value	Identidade	Acesso GenBank
01 L3_04-P	Unclassified Dothideomycete	0.0	99%	AY275186.1
02 L3_04-P	Unclassified Dothideomycete	0.0	98%	AY275186.1

03	L3_07-P	Uncultured Tomentella	2E-41	96%	FJ554280.1
04	L3_07-P	Uncultured eukaryote	2E-176	99%	DQ430734.1
05	L22_04-P	Unclassified Eurotiomycetes	5E-156	98%	KP115824.1
06	L22_04-P	<i>Acremonium</i> sp.	2E-66	99%	KC987184.1
07	L22_04-P	Unclassified Dothideomycete	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	Unclassified Dothideomycete	0.0	99%	AY275186.1
13	L3_07+P	Unclassified Dothideomycete	1E-127	93%	AY275186.1
14	L3_08+P	Unclassified Dothideomycete	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>Scutellospora savannicola</i>	2E-139	97%	HE962472.1
22	L22_07+P	Unclassified Glomeromycota	6E-120	96%	KJ952240.1
24	L3xL22_04-P	<i>Cetranspora gilmorei</i>	1E-173	99%	FR773143.1
25	L3xL22_05-P	Uncultured fungus	2E-115	92%	KC672550.1
26	L3xL22_05-P	Uncultured Archaeosporales	1E-111	97%	HE775352.1
27	L3xL22_06-P	Unclassified Glomeromycota	1E-162	98%	KJ952237.1
28	L3xL22_06-P	Unclassified Glomeromycota	9E-114	87%	KJ952240.1
29	L3xL22_07-P	Unclassified Glomeromycota	5E-95	95%	KJ952240.1
30	L3xL22_08-P	Unclassified Mucoromycotina	2E-129	97%	KJ921774.1
31	L3xL22_05+P	Uncultured fungus	0.0	100%	KC670714.1
32	L3xL22_08+P	Uncultured fungus	2E-171	98%	KC672750.1

Essa distribuição reforça resultados encontrados por Gomes et al. (2010) que, ao utilizar primers específicos para Glomeromycetos, observaram existência de mudança na estrutura das comunidades FMA em função do aumento da disponibilidade de P.

Neste trabalho, fungos micorrízicos não cultivados foram encontrados na linhagem L22 em ambos os tratamentos. Outros fungos não cultivados foram encontrados nos dois tratamentos tanto da linhagem ineficiente L22 quanto nos híbridos eficientes.

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 aqui são parciais, sendo necessário elaborar um trabalho mais extenso em amostragem e com repetições de coleta das amostras em períodos variados para maiores esclarecimentos das interações endofíticas.

Conclusão

No grupo dos fungos, os filos Actinomycota e Glomeromycota são prevalentes nas raízes das linhagens de milho contrastantes na aquisição de P cultivadas em solos com baixo e alto nível desse nutriente, sendo o nível de P no solo mais importante que o genótipo na estruturação da comunidade de bactérias e fungos que colonizam as raízes do milho.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, 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, n. 7, p. 2192-2199, 2009.
- 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, n. 1, p. 15-32, 2011.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: quarto levantamento janeiro/2015: monitoramento agrícola cultivos de verão: safra 2014/15**. Brasília, DF, 2015. 90 p.
- GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. de O.; CRUZ, J. C.; PADRÃO, G. de A. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 1, p. 21-46.
- GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; OLIVEIRA, F. A. S.; TINOCO, C. F. S.; OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E. Análise da comunidade de fungos micorrízicos associada a genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 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.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, A. **Introdução à genética**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.
- 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. R. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, n. 11, 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.

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, n. 1, p. 127-141, 1998.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKA, 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, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OHM, R. A.; FEAU, N.; HENRISSAT, B.; SCHOCH, C. L.; HORWITZ, B. A.; BARRY, K. W.; CONDON, B. J.; COPELAND, A. C.; DHILLON, B.; GLASER, F.; HESSE, C. N.; KOSTI, I.; LABUTTI, K.; GRIGORIEV, I. V. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. **Plos Pathogens**, v. 8, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003037>> Acesso em: 1 out. 2015.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; GUIMARÃES, 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).

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 75).

RAMOND, J.-B.; TSHABUSE, F.; BOPDA, C. W.; COWAN, D. A.; TUFFIN, M. I. Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Plant and Soil**, The Hague, v. 372, n. 1/2, p. 265-278, 2013.

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, n. 6, p. 2614-2621, 1999.

SOUSA, S. M. de; 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.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, 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, A. W. A. de; PIRES, G. A. **Revisão de literatura:** milho. Rio Branco: [s.n.], 2013. 21 p.

SOUZA, F. A. de; SILVA, I. C. L. da; BERBARA, R. L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. **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**, Elmsford, 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, n. 8, 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.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications.** London: Academic Press, 1990. p. 315-322.