



Christiane Abreu de Oliveira Paiva

**Microrganismos componentes da rizosfera de cultivares
de milho contrastantes na eficiência de uso do fósforo**

ORIENTADORA: DRA. NADJA MARIA HORTA DE SÁ,
DEPTO. DE BOTÂNICA, UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS

CO-ORIENTADORES: DRA. VERA MARIA CARVALHO
ALVES, EMBRAPA MILHO E SORGO, DR.
IVANILDO E. MARRIEL, EMBRAPA MILHO E
SORGO

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS, INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS, PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM BIOLOGIA VEGETAL.

BELO HORIZONTE

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFMG

043 Paiva, Christiane Abreu de Oliveira

P645d Microorganismos componentes da rizosfera de cultivantes de milho contrastantes na eficiência de uso do fósforo / Christiane Abreu de Oliveira. – Belo Horizonte : UFMG/ICB, 2007.

112p. : il.; graf.; tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microorganismos solubilizadores de fósforo. 2. Fungos micorrízicos – Teses. 3. Diversidade – Teses. 4. Milho – Teses. 5. Cerrado – Teses.

I. Título. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Universidade Federal de Minas Gerais

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Microrganismos componentes da rizosfera de cultivares de milho contrastantes na
eficiência de uso do fósforo

Tese desenvolvida no Laboratório de Interação Microrganismo-Planta (Depto.
Botânica/ICB-UFMG) e na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), sob
orientação da Dra. Nadja Maria Horta de Sá e co-orientação de Dra Vera Maria
Carvalho Alves e Dr. Ivanildo E. Marriel.

Belo Horizonte
2007



UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

Tese defendida e aprovada em 17 de abril de 2007, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Dra. Nadja Maria Horta de Sá Carneiro Nadja MHL

Dra. Eliane Aparecida Gomes Eliane A. Gomes

Dra. Flávia Toledo Ramos Flávia Toledo Ramos

Dr. Ivanildo Evócio Marriel Ivanildo Evócio Marriel

Dra. Maria Aparecida Resende Maria Aparecida de Resende

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal/ICB/UFMG
Bloco I-2 – Sala 316
Av. Antônio Carlos, 6627 - Cidade Universitária - Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte - MG
<http://www.icb.ufmg.br/bot/pgbot/> e-mail: colposbio-veg@icb.ufmg.br
Fone/Fax: 31 3499-2684



Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
ICB - Departamento de Botânica
Av. Antônio Carlos, 6627 - Cidade Universitária - Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: colposbio-veg@icb.ufmg.br- Fone/Fax: 31 3499-2684

UFMG

ATA DE DEFESA DE TESE
CHRISTIANE ABREU DE OLIVEIRA PAIVA

Data: 17/04/2007
Entrada: 03/2003
Mat.: 2003208598
CPF: 980429396-04
No. Páginas:

Às quatorze horas do dia dezessete de abril de 2007, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho de autoria da doutoranda Christiane Abreu de Oliveira Paiva, intitulado "Microorganismos componentes da rizosfera de cultivares de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo" requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal, área de concentração Botânica Aplicada. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Nadja Maria Horta de Sá Carneiro, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da doutoranda. Logo após, a Comissão reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Banca Examinadora	Instituição	Indicação	Conceito
Dra. Nadja Maria Horta de Sá Carneiro	UFMG / Botânica	Aprovada	A
Dra. Eliane Aparecida Gomes	EMBRAPA / Sete Lagoas	APROVADA	A
Dra. Flávia Toledo Ramos	FEAM/ MG	APROVADA	A
Dr. Ivanildo Evódio Marriel	EMBRAPA / Sete Lagoas	Aprovada	A
Dra. Maria Aparecida Resende	UFMG / Microbiologia	APROVADA	A

Pelas indicações, a candidata foi considerada: _____

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de abril de 2007.

Dra. Nadja Maria Horta de Sá Carneiro Nadja M Horta de Sá Carneiro

Dra. Eliane Aparecida Gomes Eliane Aparecida Gomes

Dra. Flávia Toledo Ramos Flávia Toledo Ramos

Dr. Ivanildo Evódio Marriel Ivanildo Evódio Marriel

Dra. Maria Aparecida Resende Maria Aparecida de Resende

A Deus, doutor dos doutores

Aos meus pais, pelo exemplo e incentivo

*Ao meu marido Alexandre, pelo apoio
imprescindível e carinho*

*Aos meus filhos André e Ana Clara, meus pequenos
doutores em amor*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Nadja Maria Horta de Sá, pelo incentivo, compreensão e pela importante orientação durante todas as fases deste estudo. O seu profissionalismo e objetividade foram essenciais para concretização deste trabalho e para meu crescimento profissional.

À professora Maria Rita S. Muzzi pelos ensinamentos, pelas sugestões e pelo apoio e atenção durante toda a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores da Pós-Graduação em Biologia Vegetal e do departamento de Botânica, pelo apoio na realização deste trabalho.

A todos colegas e funcionários do laboratório de Interação Microrganismo-Planta: Paulo, Renato, Marcela, Patrícia, Raul, Márcia Solange. Agradeço pelos favores e também pela boa vontade.

À professora do departamento de Microbiologia da UFMG, Maria Aparecida Rezende, pela eficiente identificação taxonômica dos fungos e pela generosidade

À chefe-geral e pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Dra Vera Maria Carvalho, pela idealização deste projeto, pelo convite em trabalhar com este tema, pela co-orientação e por ter um dia me iniciado na pesquisa com seu grande exemplo de eficiência. Agradeço também pelo carinho e dedicação no fornecimento de meios para a realização deste trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Dr Ivanildo Evodio Marriel, pela co-orientação, pelo auxílio imprescindível e integral nos trabalhos de campo e laboratório, pelas sugestões e por ter disponibilizado equipamentos e seu laboratório com tanta confiança.

À pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Dra Eliane A. Gomes, pela amizade, sugestões valiosas e pela ajuda técnica eficiente nos trabalhos de laboratório. Obrigada por ter sido minha conselheira em todas as fases.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, nas pessoas dos pesquisadores Dr. Robert E. Schaffert, Dra Claudia T. Guimarães, Dr Newton P. Carneiro, Dra Andréa A. Carneiro, Dr Antonio Carlos e Dr Antonio Marcos pela colaboração em várias fases deste trabalho.

Aos funcionários da Embrapa, Ubiraci, Miguel, Branco, Sr Ademar, Gislene, Heloísa, Clóvis, Maria Tereza, Conceição e Vânia, pelo apoio técnico e pela constante boa vontade.

Aos bolsistas e estagiários da Embrapa Milho e Sorgo que foram de grande importância para o desenvolvimento técnico desse trabalho: Giselle, pela eficiência, Rui pelas inúmeras "ajudas", Jaciara pela generosidade, Lú, Amanda e Miriam pelo apoio técnico. Agradeço pela disponibilidade e solidariedade.

Aos meus pais, pela generosidade, por terem me ajudado durante a realização deste trabalho. Às minhas irmãs, Alessandra e Danielle, minhas cunhadas, cunhado e concunhados. Obrigado pelo apoio e incentivo.

À minha sogra Celina, cujo auxílio foi essencial para a realização desse trabalho, agradeço por tanta generosidade e carinho.

Ao meu marido, Alexandre, pelo companheirismo e por ter sido tão fundamental em todos os momentos de alegrias e dificuldades.

Ao André e Ana Clara, por terem sido tão pacientes em minhas ausências e pela alegria.

A Deus, meu Pastor, que cuidou de mim com toda sabedoria e me permitiu concretizar, por sua graça, este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	1
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
Interação planta-solo-microrganismos	2
Solubilização de fósforo inorgânico por microrganismos	4
Mineralização de fósforo orgânico por microrganismos	6
Fungos Micorrízicos arbusculares (FMA)	8
Diversidade metabólica da comunidade bacteriana no solo	12
Diversidade genética microbiana	13
HIPÓTESES DE TRABALHO	18
OBJETIVOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 1 - Microrganismos solubilizadores de fósforo em rizosfera de milho em plantio convencional e direto no cerrado	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUCTION	32
MATERIALS AND METHODS.....	33
Soil samples	33
Isolation of P solubilizing microorganisms	34
Second evaluation for phosphate solubilization, pH and phosphatase activity	35
P-Melich solubilizing activity - Phosphorus incorporated into the organic matrix of polysaccharides	35
Identification of isolates.....	36

RESULTS AND DISCUSSION	37
Isolation of P solubilizing microorganisms and solubilization assay for inorganic and organic P sources.....	37
Identification and evaluation of isolates for P-solubilizing activity, pH and phosphatase activity	38
Quantification of P-solubilization by P-Mehlich-1 method.....	43
CONCLUSIONS.....	44
REFERENCES.....	45
APÊNDICE.....	55
CAPÍTULO 2 - Diversidade de fungos micorrízicos na rizosfera de genótipos de milho (<i>Zea mays</i>) contrastantes para eficiência no uso de fósforo, analisada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
INTRODUCTION	59
MATERIAL AND METHODS	60
Field experimental design and sampling.....	60
Spore isolation and spore counts.....	61
AMF staining and root examination	61
Spores and total community DNA extraction	62
Total AMF-specific PCR conditions.....	62
Acaulosporaceae, Glomaceae, Gigasporaceae-specific PCR conditions.....	62
Analysis of PCR products by DGGE	63
Sequencing purified fragments from DGGE gels and sequence alignment.....	63
RESULTS	64
Mycorrhizal colonization and AMF spores	64

DGGE analysis of AM fungal rhizosphere colonization	65
Acaulosporaceae-specific DGGE and sequence analysis of amplified bands	65
Glomaceae-specific DGGE and sequence analysis of excised DGGE bands.....	66
Gigasporaceae-specific DGGE and Sequence analysis of excised DGGE bands.....	67
DISCUSSION	68
CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	79
 CAPÍTULO 3 - Diversidade metabólica e genética de bactérias em rizosfera de genótipos de milho contrastantes para fósforo	 84
RESUMO	85
ABSTRACT.....	86
INTRODUÇÃO	87
MATERIAL E MÉTODOS	88
Diversidade metabólica.....	89
Diversidade genética da população de bactérias pelo DGGE.....	90
Identificação das bandas de DGGE	91
RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS.....	105
CONCLUSÃO GERAL.....	108
ANEXOS	109
RESUMO GERAL.....	6

Índice de Figuras

Figuras

Página

Capítulo 1

Figure 1 - Percent soluble phosphate of isolates from the maize rhizosphere of produced in culture solution, at 10 days, containing the following insoluble P-forms: (A) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$ (P-Ca) and (B) AlPO_4 (P-Al) (C) Sodium phytate (P-phytate); (D) Soybean lecithin (P-lecithin). Each symbol represents an isolate of bacteria (◆), actinomycetes (□) or fungi (▲) 50

Capítulo 2

Figure 1. Schematic representation of ribosomal RNA genes with annealing sites of primers. Diagram is not to scale..... 74

Figure 2. Colonization of indigenous mycorrhizal fungi of maize roots growing under low P fertilization of soil, $3\text{mgP}\cdot\text{dm}^{-3}$ (low P soil) and $29\text{mgP}\cdot\text{dm}^{-3}$ (high P soil). The hybrids (A and C) were: H1-E, H2-E and H3-E P efficient, and H4-I and H5-I P inefficient. The maize inbred lines (B and D)..... 74

Figure 3. Dendrogram showing the distance tree and the Acaulosporaceae specific PCR-DGGE banding patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The dendrogram was obtained by unweighted pair group method with mathematical averages (UPGMA). The P efficiency (E)..... 75

Figure 4. Dendrogram showing the distance tree and the Glomaceae specific PCR-DGGE banding patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The dendrogram was obtained by unweighted pair group method with mathematical averages (UPGMA). The P efficiency (E) or inefficiency (I) and levels of P on the soil, low P (P1) and high P (P2) are indicated to each sample. The numbers indicate different bands among samples identified in Table 1. Bootstrap analyses were performed with 10000 repetitions and values higher that 40 are shown..... 76

Figure 5. Gigasporaceae specific PCR-DGGE patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The P efficiency (E) or inefficiency (I) and levels of P on the soil, low P (P1) and high P (P2) are indicated to each sample. The numbers indicate different bands among samples identified in Table 1..... 77

Capítulo 3

Figura 1. Soma da atividade total de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico em alto teor de fósforo no solo (alto P) e baixo teor de P (baixo P) dos genótipos eficientes (E) e ineficientes (I) e testemunhas. Os Híbridos (A): HT (E) ◆, HS1 (E) ■, HS2 (E) ▲, HS3 (I) X, HS4 (I) □, NRP (solo não rizosférico em alto P) ● e NR (solo rizosférico em baixo P) ○. As Linhagens (B): L3 (E) ◆, L228 (E) ■, L22 (I) ▲, e testemunhas NRP e NR, X..... 99

<p>Figura 2. Análise de agrupamento (UPGMA) com o coeficiente de distancia euclidiana, conforme a utilização de substratos em cada tratamento (72h de incubação). *A letra “E” após o nome simbolizando eficiência ou “I” ineficiência dos híbridos e linhagens e a letra “P” para os do nível alto de P. Utilizou-se a regra de combinação UPGMA e distancia Euclidiana.....</p>	100
<p>Figura 3. Análise bidimensional dos híbridos (A) e análise tridimensional das linhagens (B) por componentes principais (PCA) conforme a utilização de substratos após 72 horas de incubação. A letra “P” após o nome do genótipo indica o nível alto de P e a letra “E” indica os genótipos que são eficientes para P.....</p>	102
<p>Figura 4. Perfis de DGGEs das comunidades bacterianas do solo não rizosférico e de solo rizosférico de linhagens (I) e híbridos (II) de milho, cultivadas sob condições de estresse por fósforo e não estressante indicada pela letra P após a identificação. O dendrograma foi construído pelo coeficiente de distância euclidiana e o método de UPGMA. As fileiras C contêm os controles do DGGE com DNA puro de bactérias, Mata contém amostras de solo de uma mata virgem de cerrado, NR e NRP, solo não rizosférico em parcelas de baixa e alta concentração de fósforo no solo. As bandas relacionadas nos géis de DGGE foram seqüenciadas e suas identificações são apresentadas na Tabela 2.....</p>	103

Índice de Tabelas

Tabelas	Página
---------------	--------

Capítulo 1

Table 1. Description of maize rhizosphere samples, type of soil, type of production system, number of microorganisms (fungi, bacteria, actinomycetes) isolated from soil samples, and source of insoluble P, tricalcium phosphate (P-Ca), aluminum phosphate (P-Al), sodium phytate (P-phytate), and soybean lecithin (P-lecithin).....	49
---	----

Table 2. Closest relatives using rDNA fragments, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Tricalcium Phosphate (TCP) - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$ (P-Ca).....	51
---	----

Table 3. Closest relatives using rDNA fragments, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Aluminum Phosphate, AlPO_4 (P-Al).....	52
---	----

Table 4. Closest relatives, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Sodium phytate – Phytic Acid (P-phytate).....	53
--	----

Table 5. Closest relatives, P solubilized, pH, and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, soybean lecithin (P-lecithin).....	54
--	----

Capítulo 2

Table 1. Closest relatives of the mycorrhiza associated with maize rhizosphere that were recovered from DGGE bands (valid sequences).....	78
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Diversidade metabólica (Índice de Shannon - H) em 72 horas de incubação para amostras de solo rizosférico de 5 híbridos de milho (H) e 3 linhagens (L), solo não rizosférico da área de baixo fósforo (NR), de alto P (NRP) e mata.....	101
---	-----

Tabela 2. Identificação das bandas reamplificadas das amostras de DGGE obtidas de linhagens (bandas A até E) e de híbridos (bandas G até L) de milho contrastantes no uso de fósforo pelos softwares SeqMatch com o banco RDP (Ordem) e BlastN com o banco NCBI (primeiro hit).....	104
---	-----

RESUMO GERAL

Microrganismos componentes da rizosfera de cultivares de milho contrastantes na eficiência de uso do fósforo

Diferenças genótípicas na tolerância ao estresse de fósforo no solo por plantas têm sido relacionadas com vários mecanismos de eficiência na aquisição de P, entre estes a interação das plantas com microrganismos do solo. A diversidade da população nativa de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) e bactérias foi avaliado na rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de aquisição de fósforo (P) em plantio direto e convencional pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), Biolog e isolamento. Foram coletadas amostras de solo rizosférico de híbridos e linhagens eficientes e não eficientes para fósforo, cultivados em um latossolo vermelho-escuro fase cerrado com baixo e alto teor de P. Os isolados foram identificados utilizando-se a seqüência do DNA ribossomal (rDNA) da subunidade 16S para bactérias e actinomicetos e a região ITS rDNA para os fungos. Com relação aos MSP, as estirpes B17 e B5, identificadas como *Bacillus* sp e *Burkholderia* sp, respectivamente, foram provenientes da rizosfera da linhagem L3, eficiente para absorção de fósforo e liberaram 67% e 58,5% do fósforo total após 10 dias. Os genótipos de milho tiveram maior influência na comunidade micorrízica que o teor de fósforo no solo, onde estes genótipos foram crescidos. O teor de P no solo influenciou mais fortemente que a eficiência a fósforo a estrutura populacional genética e metabólica de bactérias da rizosfera de cultivares de milho contrastantes no uso de P. A maior diversidade de FMA, MSP e bactérias foi encontrada no plantio direto e na rizosfera de genótipos de milho eficientes para absorção fósforo. A eficiência dos cultivares estudados na aquisição de fósforo pode ser explicada, em parte, pela interação com estes microrganismos.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O ecossistema “cerrado” ocupa cerca de 205 milhões de hectares no Brasil, sendo 12 milhões responsáveis pela produção de milho, soja, arroz, feijão e café. Dentre as principais culturas produtoras de grãos, a do milho possui destaque no cenário nacional e internacional, sendo que o Brasil encontra-se em terceiro lugar, atrás da China e EUA (FAO, 2006). Atualmente, 30% da produção brasileira de milho se concentra no Cerrado, ocupando uma área de cerca de 3,5 milhões de hectares (IBGE, 2006).

Um dos fatores limitantes da expansão agrícola no bioma cerrado são os solos ácidos, caracterizados por possuir baixa fertilidade, toxidez de alumínio, baixa biodiversidade e principalmente baixa disponibilidade de fósforo. Comparado aos outros macronutrientes, o fósforo é o nutriente menos móvel no solo, sendo que a sua deficiência no solo de cerrado, tem sido um fator limitante para o crescimento das plantas. Devido à alta sorção de fósforo no solo, a aplicação de fertilizantes fosfatados em grande quantidade para resolver o problema tem sido cada vez mais inviável. Quase a totalidade do fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo é rapidamente imobilizada, devido a sua alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, tornando-se indisponível para as plantas (Marschner, 1995; Hinsinger, 2001, Wright et al., 2005). O segundo maior componente do P no solo é de origem orgânica, contribuindo com 30 a 50% na composição do P total no solo (Richardson et al., 2005). O fósforo orgânico está principalmente na forma indisponível de fosfato inositol (fitato) e outras como fosfomonoésteres, fosfolipídios, ácidos nucléicos e fosfoésteres (Nahas, 1991; Gyaneshwar et al., 2002). As características desse nutriente têm levado a cultivos agrícolas cada vez mais dependentes do uso de insumos fosfatados, concorrendo para contaminação e degradação do bioma cerrado e para aumentos nos gastos do produtor rural.

O conhecimento dos mecanismos que influenciam a aquisição de P pode favorecer a identificação de características desejáveis a serem transferidas geneticamente para as plantas, em programas de melhoramento, como também contribuir para o estabelecimento de metodologias de seleção rápida que possibilitem maior ganho de tempo para o desenvolvimento de novas cultivares em milho (Silva & Gaberman, 1992; Alves et al., 1999). Os principais mecanismos que influenciam a eficiência de aquisição de P no solo podem ser agrupados em: modificações de atributos morfológicos da raiz, modificações de características químicas na rizosfera, alterações de características fisiológicas de cinética de absorção, alterações em processos bioquímicos e interações com microrganismos (Baligar & Fageria, 1999).

Interação planta-solo-microrganismos

Os microrganismos do solo exercem um importante papel na aquisição de nutrientes pelas plantas. Com o aumento da ênfase nas práticas agrícolas de baixos insumos, tem havido crescente interesse no manejo das comunidades microbianas do solo para promover aumento do crescimento das plantas. A disponibilidade de fósforo para as plantas, dentre outros fatores, depende da atividade de microrganismos presentes na rizosfera (Abbot & Robson, 1991; Richardson, 1994; Marschner, 1995; Morgan et al., 2005) e da estratégia desenvolvida pelas plantas para adquirir o fósforo (Tarafdar & Gharu, 2006). A eficiência do uso de nutrientes pelas plantas envolve a integração de fatores como solo, planta, microrganismos. A capacidade das plantas em absorver e utilizar nutrientes, sob condições ambientais e ecológicas variadas, sofre grande influência de seus componentes morfológicos, genéticos, fisiológicos e bioquímicos (Baligar & Fageria, 1999). Alguns estudos demonstram que a tolerância de alguns cultivares aos diversos estresses nos solos agricultáveis, principalmente o de fósforo, pode estar relacionada com a presença dos microrganismos na rizosfera, região do solo sob influência das raízes (Lynch & Whipps, 1990; Hinsinger, 2001; Richardson, 2001, Richardson et al., 2005). Quando as plantas crescem em um meio deficiente em fósforo, as raízes podem excretar substâncias funcionais, tais como ácidos orgânicos e fosfatase ácida, que constituem um importante mecanismo adaptativo, pois a planta

pode alterar seu microambiente, afetando a disponibilidade do fósforo na rizosfera (Li et al., 1997; Marschner, 1998).

A composição dos exsudatos das raízes das plantas e a microflora da rizosfera diferem entre espécies e genótipos de uma mesma espécie de planta (Neal et al., 1973; Miller et al., 1989). A quantidade e composição de carbono liberado pelas raízes (rizodeposição) se alteram com a idade da planta (Lynch & Whipps, 1990), resultando em mudanças na estrutura das comunidades microbianas na rizosfera. As raízes das plantas representam uma das principais fontes de introdução de carbono no solo (Van Elsas et al., 1997). Estes compostos liberados pelas raízes podem ser classificados em quatro grupos: a) exsudatos solúveis em água, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, hormônios e vitaminas; b) secreções, ou seja, enzimas e polímeros de carboidratos; c) lisados, liberados pela autólise de células; d) gases como etileno e CO₂. Os microrganismos presentes na rizosfera utilizam como fonte principal de carbono, estes quatro grupos de compostos liberados pelas plantas, utilizando muitos destes compostos imediatamente após a sua liberação pelas raízes (Lynch & Whipps, 1990). Na maioria dos casos, os tipos destes materiais depositados pelas raízes estimulam grupos específicos de microrganismos na rizosfera que, de alguma forma, trazem algum benefício para as plantas (Lynch & Whipps, 1990). Tarafdar & Gharu (2006) evidenciaram a máxima atividade microbiana de produção da enzima fosfatase entre a quinta e oitava semana após a germinação. Isto coincidia com a taxa máxima de secreção de exsudatos radiculares. Cerca de 10 a 20% do total de fotossintatos liberados pelas raízes de plantas é usado para criar e manter o ambiente da rizosfera (Goodman et al., 1997).

O potencial para manipulação da estrutura de comunidade microbiana na rizosfera, visando promover o crescimento da planta, tem estimulado o interesse nesse tipo de estudo. A diversidade microbiana pode variar em função do genótipo da planta e condições ambientais, como por exemplo, teor de fósforo no solo e tipo de ambiente. A eficiência no uso de fósforo pode ocasionar um aumento na diversidade microbiana ou a formação de um perfil microbiológico distinto dos cultivares ineficientes, ou seja, pode ocasionar o enriquecimento de espécies particulares

relacionadas à absorção deste nutriente em condições de estresse (Atlas, 1984, Richardson, 2001). A existência de vida microbiana na rizosfera, e de suas interações com as plantas, têm sido tema de vários estudos sobre o papel desta interação no desenvolvimento da planta (Goodman et al., 1997).

O solo rizosférico tem características bem diferentes do restante do solo distante das raízes, já que a rizosfera é um microambiente caracterizado por mudanças dinâmicas e continuamente renovado ou afetado pelo crescimento das raízes e pela liberação de substâncias pelas raízes. A maioria dos microrganismos da rizosfera são representados por fungos, bactérias, actinomicetos, protozoários e microalgas. Alguns elementos da microfauna, como nematóides também são encontrados (Lynch & Whipps, 1990; Cardoso & Freitas, 1992).

Além de atuar como dreno de nutrientes e água, nessa região da raiz ainda podem ocorrer diversos outros processos cruciais para a nutrição mineral das plantas, tais como: a) alterações no pH, causadas pela liberação de H^+ , HCO_3^- e CO_2 ; b) modificações no potencial redox, pelo consumo ou liberação de O_2 ; c) liberação de exsudatos radiculares de baixo peso molecular, favorecendo diretamente a mobilização de nutrientes minerais e fornecendo indiretamente energia para a atividade microbiana na rizosfera, como fonte de carbono (Marschner, 1995).

Solubilização de fósforo inorgânico por microrganismos

Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) são abundantes no solo, podem ser facilmente isolados na rizosfera e têm um papel central no ciclo deste nutrientes (Whitelaw et al., 1999; Goldstein et al., 2003). Em adição ao estímulo da simbiose fungos micorrízicos-planta, algumas espécies de microrganismos solubilizam fosfatos precipitados no solo, fosfatos de rocha e ainda mineralizam formas orgânicas de fósforo encontradas nos solos (Alexander, 1977; Toro et al.; 1996; Richardson, 1994, 2001; Richardson et al., 2005). Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar fósforo inorgânico como, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Rodriguez & Fraga, 1999; Whitelaw, 2000; Wakelin et al., 2004).

O fósforo no solo, na forma inorgânica, está frequentemente ligado com cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al) (Whitelaw, 2000). Determinados grupos de microrganismos podem solubilizar apenas fósforo ligado a Ca (P-Ca), enquanto outros solubilizam fósforo ligado a Al (P-Al) e a ferro, devendo-se levar em consideração que os microrganismos podem solubilizar esses fosfatos em diferentes intensidades (Doyle et al., 1990). Segundo Chabot et al. (1998), a fertilização dos solos por adubos fosfatados também pode influenciar a colonização de raízes por estes microrganismos. Estes mesmos autores verificaram um efeito de doses de P na composição da população de fungos solubilizadores de P em rizosfera de milho consorciado com feijão.

A capacidade destes microrganismos em solubilizar o fósforo inorgânico do solo está relacionada com o potencial de produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e ou pela diminuição do pH, disponibilizando o fósforo para ser adsorvido pelas plantas. A atividade dos ácidos orgânicos liberados pelos microrganismos tem sido apontada como o mais importante mecanismo de solubilização de P-Ca (Whitelaw, 2000, Goldstein et al., 2003). A produção de ácidos orgânicos resulta na acidificação das células microbianas e regiões adjacentes. Conseqüentemente, o fósforo inorgânico (P_i) pode ser liberado pela substituição de prótons por Ca^{2+} . Outras hipóteses baseiam-se na correlação existente entre o pH e a quantidade de P solubilizado (Illmer & Schinner, 1992; Rodrigues & Fraga, 1999; Whitelaw, 2000). A redução do pH pode ser uma conseqüência da liberação de ácidos orgânicos (Whitelaw et al., 1999), no entanto, o decréscimo do pH na solução de cultura pode ser também o resultado de uma absorção seletiva pelos microrganismos de alguns nutrientes do meio de cultura e não pela produção de ácidos (Barroso & Nahas, 2005). Além disso, outros mecanismos têm sido considerados, como a produção de substâncias quelantes por microrganismos e produção direta de ácidos inorgânicos, como ácido sulfídrico, nítrico e ácido carbônico. Em relação à solubilização de $AlPO_4$, o principal mecanismo de solubilização é a produção de ácidos orgânicos e excreção de prótons, indicada pela queda do pH (Illmer et al 1995; Whitelaw et al., 1999). Portanto, o estudo desses mecanismos e a interação da planta com os

solubilizadores é uma ferramenta importante para o avanço nos processos de bioinoculação e também estudos dos genes de interesse nesses microrganismos.

Apesar de MSP ocorrerem no solo, freqüentemente seu número não é suficiente para competir com outros microrganismos estabelecidos na rizosfera. Então, a quantidade de P liberado por eles não é suficiente para um aumento substancial do crescimento vegetal. Portanto, o uso de MSP como inoculantes é uma alternativa desejada para a promoção do crescimento das plantas (Illmer et al., 1995; Kim et al., 1998; Whitelaw et al., 1999) e uso em biofábricas (Goldstein et al., 2003). Estes processos não somente compensam pelos altos custos da fabricação de fertilizantes como também contribuem para o aumento do fósforo solúvel no solo (Rodriguez & Fraga, 1999).

No entanto, o desenvolvimento dessas tecnologias e de processos que maximizem a solubilização do P, requer melhor conhecimento não só das condições que influem no crescimento, mas também da dinâmica das populações solubilizadoras do solo (Richardson, 2001).

Em ambientes pobres em matéria orgânica, como os sistemas agrícolas convencionais, os microrganismos solubilizadores de fosfato desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos, concorrendo para o aumento do teor de fósforo na solução do solo, propiciando assim melhor crescimento e rendimento das culturas (Ralston & McBride, 1976; Silva-Filho & Vidor, 2000). Portanto, a capacidade de MSP em solubilizar o fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse para a cultura do milho, pois esta ferramenta representa diminuição de custos e impactos ambientais.

Mineralização de fósforo orgânico por microrganismos

A degradação dos restos vegetais e animais incorporados ao solo, realizada principalmente por microrganismos, até seus constituintes minerais, é chamada de mineralização. Sendo um processo biológico, está sujeito às condições do ambiente que favoreçam a atividade dos microrganismos (Nahas, 1991). Alguns microrganismos do solo desempenham um papel crucial na ciclagem de nutrientes como decompositores de resíduos vegetais, mineralizando compostos

orgânicos e liberando fósforo inorgânico (Nahas et al., 1994; López-Hernandez et al., 1998). Se, por um lado, o principal mecanismo para solubilizar o P inorgânico é a produção de ácidos orgânicos, por outro lado, o principal mecanismo para a mineralização do P orgânico de fontes insolúveis por microrganismos é a produção de enzimas fosfatases. Os microrganismos têm sido considerados como a principal fonte destas enzimas no solo (Richardson, 2001; Gyaneshwar et al., 2002; Richardson et al, 2005; Siqueira et al., 2004; Tarafdar & Gharu, 2006), mais que raízes de plantas (Tarafdar et al., 2001). Richardson (2001) destacou o potencial de microrganismos do solo em aumentar a disponibilidade de P a partir de fitato pela produção de fitase. Entretanto, estes microrganismos mineralizadores de P orgânico têm sido pouco estudados e pouco se conhece sobre estes processos e mecanismos.

No Brasil, os avanços relacionados à prática do plantio direto têm proporcionado solos agricultáveis cada vez mais ricos em matéria orgânica, principalmente devido ao processo de decomposição da cobertura vegetal deixada sob o solo neste tipo de plantio (Bayer et al., 2004). Em plantio convencional, ocorre uma maior manipulação do solo e revolvimento de resíduos de plantas para o interior do solo. Por outro lado, em plantio direto, pouco é revolvido ou misturado. Os resíduos das plantas permanecem na superfície do solo e não são mecanicamente introduzidos no solo. As raízes das plantas tendem a se concentrar próximas à superfície do solo. Normalmente, a parte superficial do solo do plantio direto possui temperaturas mais baixas, maior acidez, maior oxidação e maior umidade que a superfície do solo de plantio convencional. Estas condições em plantio direto tendem a causar um maior acúmulo da matéria orgânica no solo e menores taxas de decomposição que em plantio convencional.

Está bem evidenciado que solos ricos em matéria orgânica contêm maior quantidade de fósforo orgânico, que se encontra em forma indisponível para absorção pelas raízes das plantas (Bayer et al., 2004; Wakelin et al., 2004). A quantidade de P orgânico nestes materiais é constituída por 30 a 50% de fosfatos de inositol (fitatos), 3 a 5 % de ácidos nucléicos e nucleotídeos, 1% de fosfolipídeos e outros compostos em quantidades mínimas e outros ainda não definidos (Nahas,

1991). Nesse sistema de plantio torna-se de grande importância a investigação de microrganismos capazes de mineralizar o fósforo indisponível para uma maior eficiência na absorção de nutrientes pelas plantas.

No Brasil, 22 milhões de hectares são anualmente plantados sob plantio direto (FEBRAPDP, 2007). Como a cultura do milho no Cerrado brasileiro vem sendo em grande parte manejada sob plantio direto, microrganismos mineralizadores de fósforo são no entanto, um potencial a ser explorado como possíveis inoculantes de sementes de milho em plantio direto.

Poucos estudos têm investigado grupos específicos de microrganismos mineralizadores de P a partir de fosfolípidios (Richardson, 2001). A fonte mais comum de fosfolípidios é a lecitina. O fitato é uma boa fonte de fósforo orgânico e está presente em maior quantidade no solo (Richardson, 2001; Wakelin et al., 2004, Richardson et al., 2005), mas sua decomposição pode ser muito limitada porque ele pode facilmente ser adsorvido e precipitado com metais, formando moléculas insolúveis (Nahas 1991; Siqueira et al., 2004). A degradabilidade dos compostos de fósforo orgânico depende principalmente das propriedades físico-químicas e bioquímicas de suas moléculas; por exemplo, fosfatos de ácidos nucleicos, fosfolípidios e carboidratos são facilmente quebrados, mas ácidos fítics, poli-fosfatos e fosfonatos são decompostos mais vagorosamente (Rodriguez & Fraga, 1999). No entanto, a habilidade dos microrganismos em solubilizar o fósforo de várias fontes de P insolúveis, orgânicas e inorgânicas, tem sido considerada como uma desejável característica para uso diversos (Richardson et al., 2005), o que torna também importante a investigação desta habilidade em várias fontes de P para os microrganismos da rizosfera de milho.

Fungos Micorrízicos arbusculares (FMA)

A absorção de fósforo inorgânico pelas plantas, em geral, é considerada como uma consequência direta da retirada do nutriente do solo, por meio das células das raízes. Entretanto, a grande maioria das plantas cultivadas apresenta associações simbióticas com fungos micorrízicos, as quais exercem um papel fundamental na aquisição de fósforo para as plantas (Smith & Smith, 1990; Bolan, 1991). Os fungos micorrízicos formam uma extensa malha de hifas que se estendem a

partir das raízes, permitindo à planta explorar um grande volume de solo, superando limitações impostas pela baixa difusão de fósforo inorgânico no solo (Schachtman et al., 1998). Estudos têm demonstrado que a zona de exaustão ao redor das raízes das plantas, que é causada pela absorção e natureza imóvel do fósforo, é muito menor em plantas micorrizadas que naquelas não micorrizadas (Bolan, 1991). Além disso, os fungos micorrízicos podem também ser capazes de adquirir fósforo de fontes orgânicas, não disponíveis para a planta, como por exemplo, ácido fítico e ácidos nucleicos (Jayachandran et al., 1992). Segundo Abbot & Robson (1991), a adaptabilidade das plantas aos diversos estresses nos solos agricultáveis pode estar relacionada com a existência da simbiose micorriza-planta, constituindo um mecanismo para absorção de P.

Os FMA constituem um grupo monofilético (Glomeromycota), no qual todos os fungos são simbiontes obrigatórios (Schuβler et al., 2001). Eles formam uma das simbioses mais comuns com plantas (Smith & Read, 1997; Barea et al., 2005) e a importância desta simbiose para a diversidade e produtividade de ecossistemas terrestres naturais e antrópicos está bem estabelecida (Mosse, 1973; Smith & Read, 1997; Van Der Heijden et al., 1998). Segundo Chapin III (1980), devido às características desta simbiose, ela consiste num mecanismo adaptativo que permite maximizar a aquisição de P com menor gasto de energia, do que a própria formação de raízes.

Diversos trabalhos com cereais relatam os efeitos positivos da associação micorrízica, sob condições de baixos teores de P, na melhoria do desenvolvimento e da produção de plantas de sorgo (Raju et al., 1990), trigo (Azcón & Ocampo, 1981), aveia (Plenchette et al., 1983), cevada (Baon et al., 1992) e milho (Hall, 1978; Toth et al., 1984; Siqueira et al. 2002). A planta de milho possui elevada taxa de crescimento e grande demanda por nutrientes, possuindo frequentemente interação micotrófica e se beneficiando dos fungos micorrízicos arbusculares, principalmente em solos pouco férteis (Kothari et al., 1990; Clark & Zeto, 1996). O efeito biofertilizante vai variar para cada planta dependendo da capacidade de formar uma simbiose eficiente com o fungo (Siqueira et al., 2002).

As interações entre fungos e plantas são, contudo, complexas, e em ambos, o desenvolvimento e fisiologia estão sob controle genético, mas sendo afetados também pelo

ambiente. Características do genótipo da planta, que influenciam o tipo e a morfologia do sistema radicular, têm sido apontadas como responsáveis por diferenças na dependência micorrízica e respostas à inoculação de várias espécies vegetais (Smith et al., 1993). Além disso, o tipo de cultivo pode também influenciar a densidade e diversidade de FMA. O cultivo intensivo e revolvimento do solo têm efeito negativo sobre as hifas e esporos dos fungos micorrízicos. Sistemas agrícolas com menor perturbação do solo, como o de plantio direto, favorecem o acúmulo de maiores teores de P na biomassa microbiana de FMA (Kabir, 2005).

Tem sido sugerido que a colonização intrarradicular por FMAs depende da capacidade do fungo em evitar a ativação ou mesmo em suprimir o sistema de defesa vegetal. Por outro lado, a não ativação do sistema de defesa vegetal pode estar associada à maior atividade de enzimas anti-oxidantes (catalase, por exemplo) em raízes micorrizadas em condições de baixo P (Lambais, 2000). No caso de micorrizas arbusculares, vários estudos mostram que a infecção das raízes por estes fungos está diretamente relacionada com a liberação de açúcares e alguns aminoácidos pelas plantas (Azcon & Ocampo, 1981, Lambais, 2000) e de outras substâncias sinalizadoras para a penetração das hifas e estabelecimento da simbiose, como os metabólitos secundários, formometina e biocaninaA, flavonóides (Lambais, 2000) e ácido jasmônico (Hause et al., 2002). A regulação da síntese destes compostos pode estar determinada pelo nível de fósforo na planta, sendo o estresse de fósforo um sinalizador para a produção de compostos aromáticos (Marschner, 1995, Siqueira et al., 1991, 2002). A formação de apressórios depende do genoma da planta, sugerindo a existência de fatores essenciais para a completa diferenciação das hifas em apressórios funcionais (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). Segundo Siqueira et al. (2002), alguns autores verificaram que a produção de enzimas hidrolíticas como pectinases, celulasas e hemicelulasas por FMAs tem sido documentada e pode ser essencial para o desenvolvimento da simbiose. No hospedeiro, a expressão diferencial de vários genes envolvidos na defesa vegetal contra o ataque de patógenos, avaliada com base em atividades enzimáticas, acúmulo de proteínas e/ou de mRNAs, tem sido observada durante o desenvolvimento das micorrizas, podendo ter papel fundamental no controle da colonização

intrarradicular (Lambais, 2000). Portanto, para um estudo preliminar destes mecanismos e ou da interação entre genótipos de plantas e FMA, é necessário pesquisar a colonização micorrízica dessas plantas por populações nativas de fungos micorrízicos e, posteriormente, testá-los quanto ao potencial de micorrização.

Estudos sobre a ecologia das micorrizas devem ser incentivados para obter-se um inventário mais completo de sua diversidade taxonômica, fisiológica e genética. Essas informações poderiam ser utilizadas para a seleção de isolados eficientes para a aplicação em processos biotecnológicos de interesse agrícola e ambiental ou para a detecção de determinados genes de interesse que poderão ser introduzidos em microrganismos os quais seriam liberados no ambiente (Van Elsas et al., 1997). Sua exploração é viabilizada pelo aumento da taxa de micorrização das plantas, que pode ser conseguido por meio de: a) inoculação com isolados fúngicos selecionados; b) práticas de manejo seletivo da população fúngica indígena dos solos agrícolas e mais recentemente, c), por aplicação de compostos estimulantes da micorrização (Siqueira et al., 2002).

Estudos com relação à população nativa de FMA da rizosfera de milho poderão contribuir para a obtenção de informações úteis ao manejo destas populações na cultura do milho, que por ser uma cultura anual de ciclo normalmente curto, necessita de técnicas que incluam o estímulo aos FMA existentes no solo. A inoculação com FMAs não é muitas vezes viável para as culturas anuais como o milho, devido ao grande volume de inoculantes necessário para culturas de ciclo curto a cada ano (Siqueira et al., 2002). O manejo para este tipo de cultura vai ocorrer a partir do estímulo por substâncias isoladas no estudo da interação AMF-hospedeiro de determinadas espécies consideradas importantes da população nativa total do milho. Estas substâncias, como já relatado anteriormente, podem contribuir para uma maior efetividade da colonização micorrízica. Este tipo de manejo pode reduzir em até 56% o requerimento externo de fertilizante fosfatado (Siqueira et al., 1994). Essa redução representa um efeito biofertilizante equivalente estimado de 60kg de P_2O_5 aplicado ao solo para essa cultura, representando uma economia de US\$ 125 milhões, visto que a área de milho plantada no Brasil já alcançou 14 milhões ha (IBGE, 2006, Siqueira et al., 2002).

Diversidade metabólica da comunidade bacteriana no solo

O potencial para manipulação da estrutura de comunidade microbiana na rizosfera, visando promover o crescimento da planta, tem estimulado o interesse nesse tipo de estudo. Para Garland (1996) a quantificação da estrutura da comunidade microbiana metabolicamente ativa na rizosfera é um importante componente para o sucesso no desenvolvimento de métodos efetivos de controle da rizosfera. Este autor observou distintos padrões de utilização de fontes de carbono na rizosfera de plantas de soja, trigo, batata doce e batata branca. Também Grayston et al. (1998), avaliando o solo rizosférico de raízes de trigo, trevo e centeio, verificaram que houve uma clara discriminação entre as fontes de carbono utilizadas pelas comunidades microbianas da rizosfera de diferentes plantas. Carboidratos, ácidos carboxílicos e aminoácidos foram os principais substratos responsáveis por essa discriminação, sugerindo que as plantas podem diferir na exsudação desses compostos, principalmente sob estresse nutricional.

O conhecimento sobre a estrutura e função dos microrganismos sob sistemas agrícolas tropicais ainda é incipiente. Essa limitação, em parte, seria em razão de dificuldades metodológicas de identificação de microrganismos e da incapacidade de se isolarem populações representativas. Em vista disso, torna-se de grande importância a avaliação funcional para caracterização de comunidades microbianas metabolicamente ativas (Garland & Mills, 1991; Zak et al., 1994).

O sistema "Biolog", que utiliza 95 diferentes fontes de carbono para produzir um padrão metabólico dos microrganismos, tem sido empregado para avaliar a diversidade metabólica de comunidades microbianas em diferentes condições (Garland & Mills, 1991; Grayston & Campbell, 1996). Esta técnica, originalmente destinada à identificação de isolados, foi aprimorada por Garland e Mills (1991) a fim de estimar a diversidade de comunidades a partir do padrão de utilização de diferentes fontes de carbono. Desde então, esta técnica vem sendo utilizada no estudo de comunidades microbianas de diversos habitats (Li et al., 1997, 2004; Garland, 1996). A natureza rápida dessa avaliação aumenta o potencial para a amostragem temporal e espacial em relação ao método de isolamento das amostras. No entanto, esse procedimento não inclui comunidades de

fungos, em razão de sua baixa taxa de crescimento. Em milho, a capacidade metabólica de comunidades microbianas extraídas de compartimentos rizosféricos e não rizosféricos foi avaliada por Baudoin et al. (2001), utilizando o sistema Biolog. O perfil metabólico comparativo revelou clara mudança entre as populações microbianas do rizoplano e do solo controle, tendo como principais substratos discriminantes carboidratos, aminoácidos e amidas.

Embora sejam evidentes os resultados mostrando diferenças nos padrões de utilização de fontes de carbono por microrganismos da rizosfera de diferentes plantas, ainda se dispõem de poucas informações sobre variações intraespecíficas em plantas de milho sob condições de estresse de fósforo. Em vista disso, torna-se de grande importância a avaliação funcional para caracterização de comunidades microbianas metabolicamente ativas (Gallard & Mills, 1991; Zak et al., 1994).

Diversidade genética microbiana

O conhecimento sobre a composição e função dos microrganismos e sua interação na rizosfera de algumas plantas sob estresse nutricional ainda é insuficiente. Algumas metodologias convencionais apresentam limitações com relação à sensibilidade e à especificidade. Através das técnicas tradicionais de plaqueamento em meios de cultura específicos, nem sempre é possível se isolar determinadas populações, uma vez que a maioria dos microrganismos presentes no solo não é cultivável em meios artificiais ou, muitas vezes não podem ser distinguidos de outros membros da comunidade (Torsvik et al., 1990). Somente uma pequena porcentagem (0,1%) dos microrganismos do solo pode ser cultivada em laboratório (Torsvik et al., 1990), com exceção dos fungos micorrízicos que não crescem em meio de cultura. Além disso, os microrganismos que conseguem crescer em meios de cultura não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados (Muyzer & Ramsing, 1995). Os principais obstáculos, à pesquisa com FMA, são a incapacidade de se conseguir culturas axênicas e a dificuldade na identificação de espécies, principalmente quando elas estão presentes somente na fase vegetativa (micelial). A maior parte do conhecimento sobre fungos micorrízicos no ambiente baseia-se em

contagens de esporos e hifas, porém, a população de esporos no solo pode não refletir a composição de espécies presentes na rizosfera (Husband et al., 2002).

Atualmente, para a avaliação da população microbiana, existem diversas técnicas para extração do DNA total de microrganismos a partir de amostras ambientais complexas como o solo e sedimentos (Akkermans et al., 1995; Trevors & Van Elsas, 1995; Van Elsas et al., 1997), permitindo a avaliação da variabilidade genética em populações naturais de microrganismos, a identificação de espécies e isolados utilizando polimorfismo de DNA e monitoramento dos microrganismos introduzidos no ambiente para determinar sua sobrevivência, seu crescimento e sua disseminação no solo (Rosado & Duarte, 2002). Estas técnicas de genética de microrganismos podem ser úteis tanto para a introdução de novos genes em microrganismos que serão liberados no ambiente como bioinoculantes, como para a detecção desses microrganismos por identificação taxonômica molecular (Van Elsas et al., 1997).

Análise por seqüenciamento de algumas regiões do rDNA (DNA ribossômico) estão entre as técnicas moleculares atualmente em uso para se estudar as variações intra e inter-específicas e as relações filogenéticas entre microrganismos tendo como objetivo a identificação taxonômica. Algumas seqüências de DNA são características de um isolado, algumas de uma espécie e outras de grupos maiores, tais como gênero ou mesmo classe. Isso permite a avaliação da variabilidade genética em populações naturais de microrganismos, a identificação de espécies e isolados utilizando polimorfismo de DNA (Akkermans et al., 1995).

O potencial de comparação de informações genotípicas, ou seja, de seqüências de moléculas de DNA de espécies procariontes tem sido utilizado com as seqüências do rDNA (Rosado & Duarte, 2002). Dentre essas, as seqüências dos rDNA 16S/23S têm sido preferencialmente escolhidas porque estão presentes em todos os organismos, derivam de um ancestral comum e são geneticamente estáveis. De acordo com Rosado & Duarte (2002), as moléculas de rDNA apresentam regiões altamente conservadas entre todos os organismos que compartilham aquela

espécie de rDNA e regiões altamente variáveis, sendo que o grau de variação nestas regiões específicas pode variar de um táxon a outro, permitindo a identificação de algumas espécies.

Com relação aos eucariotos, os genes de RNA ribossômicos da maioria são organizados em famílias de genes repetidos em “tandem”, compreendendo as regiões organizadoras do nucléolo dos cromossomos. O rRNA é sintetizado como um único RNA precursor, subseqüentemente processado nos rRNAs 17S, 5,8S e 25S (Trevors & Van Elsas, 1995). Cada unidade de repetição consiste de três genes, 17S, 5,8S e 25S (ou seus equivalentes) com dois espaçadores internos transcritos (ITS) flanqueando o gene 5,8S e um espaçador intergênico (IGS) que separa uma unidade de transcrição da unidade adjacente. Este arranjo espaçador-gene-espaçador explica porque o rDNA é freqüentemente utilizado em estudos filogenéticos e taxonômicos, uma vez que ele contém tanto regiões conservadas, quanto regiões variáveis, permitindo a discriminação de gêneros, espécies ou isolados. Em fungos, assim como em outros organismos, as regiões espaçadoras (ITS e IGS) são variáveis, ou seja, pouco conservadas, enquanto que as regiões que codificam o rDNA 17S e o rDNA 25S são conservadas entre os organismos. As seqüências de bases da região ITS do rDNA têm sido utilizadas em estudos filogenéticos, na categoria de espécie e níveis intraespecíficos, porque sofrem pouca pressão evolutiva, podendo-se assim esperar que evoluam a uma velocidade diferente das outras seqüências (Akkermans et al., 1995).

A técnica de seqüenciamento aliada a métodos moleculares, baseados na amplificação do DNA de amostras de solo pela reação de polimerização em cadeia (PCR) e a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) têm sido empregadas na caracterização de comunidades microbianas do solo, em estudos de ecologia microbiana (Muyzer et al., 1993). Essa última técnica permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não somente em diferenças de tamanho dos produtos de PCR, através da utilização de iniciadores (“primers”) específicos adicionados de uma seqüência de bases CG denominada seqüência grampo (clamp) (Muyzer et al., 1993; Rosado et al., 1998). A técnica de DGGE utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes, uréia e formamida. A seqüência de nucleotídeos de

um fragmento de DNA definirá o momento em que o DNA que estava em fita dupla passará para uma estrutura em fita simples, parando de migrar no gel. O comportamento de migração do fragmento de DNA no DGGE é governado não apenas pela composição de nucleotídeos (conteúdo de G+C), mas também pelas interações entre estes dentro da molécula. Moléculas de DNA com seqüências diferentes apresentam taxas de migração diferentes em géis desnaturantes, formando bandas distintas no gel (Rosado et al., 1998). Dessa forma, o DGGE permite a determinação da diversidade genética de comunidades microbianas naturais e também a identificação filogenética dos membros da comunidade pela purificação e sequenciamento de bandas do gel (Muyzer et al., 1993).

A técnica do PCR-DGGE, inicialmente desenvolvida para estudar mutações, tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para análise direta da estrutura de comunidades de microrganismos (Muyzer et al., 1993). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada para caracterização de comunidades bacterianas, fúngicas e de actinomicetos. Entretanto, pouco se conhece sobre a sua aplicação ao estudo da estrutura populacional de fungos micorrízicos arbusculares no solo (de Souza et al., 2004).

Dados sobre alterações da diversidade genética dos microrganismos em solos rizosférico de cultivares de milho contrastantes no uso de P em condições de deficiência deste nutriente, podem ser úteis para avaliar a estrutura das comunidades microbianas que poderiam estar associadas à eficiência na absorção de fósforo e também a influência do estresse de fósforo na composição destas populações. O conhecimento de alguns microrganismos presentes somente em rizosfera de genótipos eficientes poderia indicar que estes microrganismos são “colaboradores” do processo de absorção de fósforo. Este conhecimento torna-se importante para a identificação de espécies de microrganismos úteis no processo de bioinoculação e também para estudos da interação destes microrganismos com as plantas, ou seja, processos de simbiose, sinalização e colonização para obtenção de informações importantes para a utilização de substâncias estimulantes da micorrização.

A partir destas informações, pretende-se otimizar a interação dos microrganismos relacionados com a absorção de P na rizosfera de milho, garantindo o crescimento da planta em níveis reduzidos de fertilização química, garantindo retorno econômico. Uma combinação de práticas de manejo do solo e da sua biologia, associadas ao uso de cultivares eficientes, tem sido de grande valor para a produção de uma agricultura sustentável, minimizando o uso de fertilizantes químicos.

O objetivo deste trabalho foi estudar as variações da diversidade microbiana da rizosfera com relação à eficiência de genótipos de milho para uso de fósforo e o papel dos microrganismos solubilizadores de P e fungos micorrízicos neste processo.

HIPÓTESES DE TRABALHO

1. Genótipos de milho contrastantes eficiência no uso de fósforo possuem microflora específica de solubilizadores de fosfato.
2. Genótipos de milho contrastantes na eficiência do uso de fósforo podem apresentar densidade e diversidade de fungos micorrízicos diferenciada, quando submetidos a condições de estresse de fósforo.
3. Genótipos de milho contrastantes na eficiência do uso de fósforo podem apresentar atividade e perfil genético de microrganismos rizosféricos diferenciado, quando submetidos a condições de estresse de fósforo.
4. O tipo de cultivo, convencional ou plantio direto, influencia a estrutura populacional de microrganismos solubilizadores de fosfato, micorrizas e bactérias em milho.

OBJETIVOS

1. Isolar, selecionar e conservar em coleção de germoplasma a população microbiana solubilizadora e mineralizadora de fosfato da rizosfera de milho cultivado em plantios convencional e direto.
2. Testar a eficiência em solubilizar e mineralizar fósforo dos isolados pertencentes à coleção de microrganismos.
3. Avaliar a colonização da população nativa de fungos micorrízicos em rizosfera de híbridos e linhagens contrastantes para eficiência no uso de fósforo.
4. Avaliar a diversidade genética de fungos micorrízicos da rizosfera de cultivares de milho contrastantes para a eficiência a fósforo, em solos com diferentes disponibilidades deste elemento e em solos sob plantio direto.
5. Avaliar a diversidade metabólica e genética de bactérias da rizosfera de cultivares de milho contrastantes para a eficiência a fósforo, em solos com diferentes disponibilidades deste elemento e em solos sob plantio direto.
6. Identificar os microrganismos solubilizadores de fosfato, bactérias e fungos micorrízicos selecionados, utilizando métodos moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOT , ROBSON ,AD. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems and environment*, v.35, p 121-150 ;1991.
2. AKKERMANS, A.D.L., VAN ELSAS, J.D.; BRUIJN, F.J. (eds.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
3. ALEXANDER, M., 1977. **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley and Sons, New York.
4. ALVES,. V.M.C.; MAGALHÃES, J.V.; NOVAIS, R.F; BAHIA FO A.F.C., OLIVEIRA, C.A., FRANÇA, C.C.M. Acúmulo de nitrogênio e de fósforo em plantas de milho afetado pelo suprimento parcial de fósforo às raízes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p. 299-305, 1999.
5. ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: LUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 540-545, 1984.
6. AZCÓN, R.; OCAMPO, J.A. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. **New Phytologist**, v.87, p.677-685, 1981.
7. BALIGAR, V.C.; FAGERIA, N.K. **Plant nutrient efficiency: Towards the second paradigm**. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. de. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras, MG: UFLA/DCS-SBCS, 1999. p. 183-204.
8. BAON, J.B.; SMITH, S.E.; ALSTON, A.M.; WHEELER, R.D. Phosphorus efficiency of three cereals as related to indigenous mycorrhizal infection. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.43, p.479-491, 1992.
9. BAREA, J.-M., POZO, M. J., AZCO'N, R. AND AGUILAR, C. A.-. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 56, No. 417, pp. 1761–1778, July 2005.
10. BARROSO, C.B., NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v.29, p. 73–83, 2005.
11. BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere comportaments. **European Journal of Soil Biology**, v.37, p.85-93, 2001.

12. BAYER, C., MARTIN-NETO, MIELNICZUK, J., PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p. 677-683, jul. 2004.
13. BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake phosphorus by plant. **Plant and Soil**, v.134, p. 189-207, 1991.
14. BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C.A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.509-517, 2002.
15. CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. **A rizosfera**. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., coord. Microbiologia do solo. Campinas:SBCS, 1992. p.41-58.
16. CHABOT, R; BEAUCHAMP CJ XKLOEPPER, JW; ANTOWN, H effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate solubilizin *Rhizobium leguminosarm* biovar phaseoli. **Soil Biology Biochemistry**, v30 ,n12 p.1615 –1618, 1998.
17. CHAPIN III, F.S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual review of ecology and systematics**, v.11, p. 233-260, 1980.
18. CLARK, R.B.; ZETO, S.K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.28, n.10/11, p. 1505-1511, 1996.
19. DE SOUZA F A., KOWALCHUK G A., LEEFLANG P, VAN VEEN J A., AND 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**, Mar. 2004, p. 1413–1424
20. DOYLE, L.M.G.; SCHARF, R.; SILVA FILHO, G.N. Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados em fruteiras temperadas em Santa Catarina. **Biotemas**, v.2, p.59-76, 1990.
21. FAO. FAOSTAT. Database gateway; <http://www.fao.org>, Acesso em 20/11/2006.
22. FEBRAPDP. Database gateway, <http://www.febrapdp.org.br>. Acesso em 28/02/2007.

23. GARLAND, J.L. Patterns of potencial C source utilization by rhizosphere communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.223-230, 1996.
24. GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-solo-carbon-source-utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 2351-2359, 1991.
25. GIANINAZZI S, SCHU"EPPE H, BAREA JM, HASELWANDTER K. **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Basel, Switzerland: Birkha"user Verlag, 2002.
26. GIOVANNETTI M, GIANINAZZI-PEARSON V Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 98, p. 705-715, 1994.
27. GOLDSTEIN A., LESTER, T., BROWN J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1647 (2003) 266–271
28. GOODMAN, R.M.; BINTRIM, J.H.; QUIRINO, B.F.; ROSAS, J.C.; SIMON, H.M.; SMITH, K. A dirty look: Soil Microflora and Rhizosphere Microbiology. In: FLORES, H.E.; LYNCH, J.P.; EISSENSTAT, D. (eds.). **Radical Biology: Advances and Perspectives on the function of Plant Roots: American Society of Plant physiologists**, p.219-231, 1997.
29. GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Tree Physiology**, 16: 1031-1038, 1996.
30. GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, 30: 369-378, 1998.
31. GYANESHWAR G. NARESH KUMAR, L. J. PAREKH AND P. S. POOLE. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Volume 245, Number 1, Pages: 83 – 93, August 2002

32. HALL, I.R. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on two varieties of maize and one of sweetcorn. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.21, p. 517-519, 1978.
33. HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of Jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. **Plant Physiology**, v.130, p.1213-1220, 2002.
34. HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rizhosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and soil**, v.237, p.173-195, 2001.
35. HUSBAND, R.; HERRE, E.A.; YOUNG, P.W. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, p.131-136, 2002.
36. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em 20/11/2006.
37. ILLMER P, BARBATO A, SCHINNER F. Solubilization of hardlysoluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biol Biochem**, 27:265–270, 1995.
38. ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol Biochem**, v.24, p. 389–395, 1992.
39. JAYACHANDRAN, K.; SCHWAB, A.P.; HETRICK, B.A.D. Mineralization of organic phosphorus by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p. 897-903, 1992.
40. KABIR, Z. 2005. **Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae**. Can. J. Plant Sci. 85: 23–29. Journal Article Abstracts.
41. KIM, K.Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacterai and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, p.79-87, 1998.
42. KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VAM fungi and rizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytologist**, v.116, p. 637-645, 1990.
43. LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St.Paul: American Phytopathological Society Press. P.46-60, 2000.

44. LI, M.; SHINANO, T.; TADANO, T. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.43, p. 237-245, 1997.
45. LI, O., ALLEN, H.L., WOLLUM, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control **Soil Biol. Biochem.**, V. 36, Issue 4, Pages 571-579, April 2004.
46. LÓPEZ-HERNANDEZ, BROSSARD, D.; FROSSARD, B. P-isotopic exchangeable values in relation to Po mineralization in soils with very low P-sorbing capacities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1663-1670, 1998.
47. LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v.129, p.1-10, 1990.
48. MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of hight plants**. Academic Press, San Diego, C.A. 889p. 1995.
49. MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, v.56, p.203-207, 1998.
50. MILLER, H.J.; HENDEN, G.; VAN VEEN, J.A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p. 656-660, 1989.
51. MORGAN, J. A. W., BENDING G. D. AND WHITE, P. J.. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 56, No. 417, pp. 1729–1739, July 2005.
52. MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza :IV. In soil given additional phosphate. **New Phytology**, v.72, 127-139, 1973.
53. MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.
54. MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science Technology**, v.32, p.1-9, 1995.

55. NAHAS, E. **Ciclo do fósforo: transformações microbianas**. Jaboticabal, FUNEP, 1991. 67p.
56. NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.49-53, 1994.
57. NEAL, J.L.; LARSON, R.I.; ATKINSON, T.G. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. **Plant and Soil**, v.39, p.209-212, 1973.
58. PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A.; FURLAN, V. Growth responses of several plant species to mycorrhizal in a soil of moderate P – fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. **Plant and Soil**, v.70, p. 199-209, 1983.
59. RAJU, P.S.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R.; DUNCAN, R.R.; MARANVILLE, J.W. Benefic and cost analysis and phosphorus efficiency of VA mycorrhizal fungi colonizations with sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes grown at varied phosphorus levels. **Plant and Soil**, v.124, p.199-204, 1990.
60. RALSTON, D.B.; Mc BRIDE, R.P. Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant and Soil**, v. 45, p. 493-507, 1976.
61. RICHARDSON A.E., GEORGE T.S., HENS M., SIMPSON R.J. **Utilization of soil organic phosphorus by higher plants**. In: Turner B.L., Frossard E., Baldwin D.S. (eds) *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing Wallingford, pp 165-184, 2005.
62. RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, p.897-906, 2001.
63. RICHARDSON, A.E.. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst, C.E., Doulsen, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota Management in Sustainable Farming System*. CSIRO, Australia, pp. 50–62, 1994.
64. RODRIGUEZ H, FRAGA R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advance**, v.17, p. 319–339, 1999.
65. ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. **Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana**. In: . *Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos*, p.98-128, 2002.

66. ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of nifH sequences in Paenibacillus azotofixans strains ad soil samples anlysed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770-2779, 1998.
67. SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. **Plant Physiology**, v.116, p. 447-453, 1998.
68. SCHUßLER A, SCHWARZOTT D,WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota, phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v.105, p. 1413–1421, 2001.
69. SILVA, A.E. da; GABERMAN, W.H. Screening maize inbred lines for tolerance to low P stress conditions. **Plant and Soil**, v.146, p. 181-187, 1992.
70. SILVA-FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p. 311-319, 2000.
71. SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soilmicrobial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Knoxville, v.10, n.1, p.63-121, 1991.
72. SIQUEIRA, J.O.; ANDRADE, A.T.; FAQUIN, V. **O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas**. In: Fósforo na Agricultura Brasileira. Eds: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R. Editora Potafós, 726p, 2004.
73. SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STURMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.12-21, 2002.
74. SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 1997. 603 p.
75. SMITH, S.E.; ROBSON, A.D. ABBOTT, L.K. The involvement of mycorrhizas in assesment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. In: RANDALL, P.J.; DELHAIZE, E.; RICHARDS, R.A.; MUNNS, R., eds. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.221-231. (Developments in Plant and Soil science, 50).
76. SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. **New Phytologist**, v.114, n. 1, p. 1-38, 1990.

77. TARAFDAR, J.C., GHARU, AMITA. Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. **Applied Soil Ecology**, v.32, p. 273–283, 2006.
78. TARAFDAR, J.C., YADAV, R.S., MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.164, p. 279–282, 2001.
79. TORO, M.; AZCÓN, R.; HERRERA, R. Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. **Bio. Fertil. Soils**, v.21, p.23-29, 1996.
80. TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L.. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.78-787, 1990.
81. TOTH, R.; PAGE, T.; CASTLEBERRY, R. Differences in mycorrhizal colonization of maize selections for high and low ear leaf phosphorus. **Crop Science**, v.24, p. 994-996, 1984.
82. TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. **Nucleic acids in the Environment: Methods and Applications**. Springer-Verlag, Heidelberg, 1995.
83. VAN DER HEIJDEN, M. G. A., J. N. KLIRONOMOS, M. URSIC, P. MOUTOGLIS, R. STREITWOLF-ENGEL, T. BOLLER, A. WIEMKEN, AND I. R. SANDERS. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, v.396, p. 69–72, 1998.
84. VAN ELSAS, J.D.; MANTYNEN, V.; WOLTERS, A.C. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. **Biology and Fertility of soils**, v.24, p.188-195, 1997.
85. WAKELIN, S.A., WARREN, R.A., HARVEY, P.R., RYDER, M.H. P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. Closely associated with wheat roots. **Biology of Soils and Fertility**, v.40, p. 36-43, 2004.
86. WHITELAW, M.A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v.69, p.99-151, 2000.
87. WHITELAW MA, HARDEN TJ, HELYAR KR. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biol Biochem**, v. 31, p.655–665, 1999.

88. WRIGHT, D P., JULIE D. SCHOLES, DAVID J. READ AND STEPHEN A. Rolfe European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v. 167, p. 881–896, 2005.
89. ZAK, J.C.; WILLING, M.R.; MOOREHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, 26: 1101-1108, 1994.

**CAPÍTULO 1 - Microrganismos solubilizadores de fósforo em rizosfera de milho em plantio
convencional e direto no cerrado**

Microrganismos Solubilizadores de Fósforo em Rizosfera de Milho em Plantio Convencional e Direto no Cerrado

RESUMO

Alguns microrganismos do solo são capazes de solubilizar o fósforo de fontes indisponíveis no solo liberando formas disponíveis para as plantas, contribuindo para sua nutrição como microrganismos promotores do crescimento das plantas (MPCP). Este trabalho teve como objetivo, isolar, selecionar e avaliar a atividade solubilizadora de microrganismos da rizosfera de milho para o uso destes isolados em futuras aplicações como bioinoculantes. Foram isoladas 371 colônias da rizosfera de milho e destas, algumas foram selecionadas com base no maior potencial de solubilização em meio de cultura líquido (Pikovskaya) contendo fontes inorgânicas de P, AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e orgânicas, fitato de sódio e lecitina de soja. Os isolados foram identificados utilizando-se a seqüência do DNA ribossomal (rDNA) da subunidade 16S para bactérias e actinomicetos e a região ITS rDNA para os fungos. A maior solubilização de P foi encontrada entre as bactérias em meio de tricálcio fosfato. As estirpes B17 e B5, identificadas como *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp., respectivamente, foram provenientes da rizosfera da linhagem L3, eficiente para absorção de fósforo e liberaram 67% e 58,5% do fósforo total ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), após 10 dias. Os microrganismos destes gêneros de bactéria têm sido citados na literatura como importantes MPCP. Nas outras fontes de P, os fungos se destacaram, sendo os maiores solubilizadores em meio de fosfato de alumínio, fitato e lecitina. A maior diversidade de MSP foi encontrada no plantio direto e na rizosfera de genótipos de milho eficientes para absorção fósforo. A eficiência destes cultivares pode ser explicada, em parte, pela interação com estes microrganismos.

Palavras-chave: MSP-microrganismos solubilizadores de P, mineralização e solubilização de fósforo, *Zea mays*

Phosphate Solubilizing Microorganisms Associated with Maize Rhizosphere in Brazilian acid
Savanna Soils

ABSTRACT

Many soil microorganisms are able to transform insoluble forms of phosphorus to a accessible soluble form, contributing to plant nutrition as a plant growth-promoting microorganisms (PGPM). The objective of this work was to isolate, screen and investigate the phosphate solubilization activity of microorganisms in maize rhizosphere soil to manage soil microbial communities and to select potential microbial inoculants. Forty-five of the best isolates from 371 colonies isolated from rhizosphere soil of maize grown in an oxisol with P stress were selected based on the solubilization of inorganic and organic phosphates in a modified Pikovskaya's liquid medium culture containing sodium phytate (Phytic Acid), soybean lecithin, AlPO_4 , and tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). The isolates were identified based on nucleotide sequence data from the 16S rDNA sequences for bacteria and actinomycetes and ITS rDNA sequences for fungi. Bacteria produced the greatest solubilization in medium containing tricalcium phosphate. The strains B17 and B5, identified as *Bacillus* sp and *Burkholderia* sp, respectively, were the most effective, mobilizing 67% and 58.5% of the total P ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) after 10 days, and were isolated from the rhizosphere of the P efficient maize genotype, L3 under P stress. These genera of bacteria have been reported in the literature as important PGPM. The fungal population was the most effective in solubilizing P in the aluminum, phytate, and lecithin forms of phosphorus. A greater diversity of P solubilizing microorganisms was observed in the rhizosphere of the P efficient maize genotypes in the no-till planting system. The P efficiency in these cultivars may be related to the potential to enhance microbial development interactions of P solubilizing microorganisms.

Key words: P-solubilizing microorganisms (PSM), phosphorus mineralization and solubilization, *Zea mays*

INTRODUCTION

The Brazilian savanna ecosystem known as the “Cerrado” can be characterized by low soil pH, low phosphorus (P) content and high P fixation capacity. Much of the P present in these soils is insoluble and unavailable to plants (Marschner, 1995; Novais and Smyth, 1999; Hinsinger, 2001; Wakelin et al., 2004). The accumulated insoluble P, like total soil P, occurs in either organic or inorganic forms. Phosphate anions may be immobilized through precipitation with cations such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} and Al^{3+} , or adsorbed to Fe-oxides and Al-oxides, Al-silicates, and Ca-carbonates, depending on the particular properties of a soil. Organic P in the soil generally accounts for around 50% of total insoluble soil P in soils with high organic matter content, such as the no-tillage management systems (Gyaneshwar et al., 2002, Bayer et al, 2001, 2004). A large proportion of the organic P (about 50% to 80% of total organic P) is represented by inositol phosphates and their various metal-ion derivatives, soil phytates and lesser amounts of other phosphate esters as phospholipids, nucleic acids and sugar phosphates (Richardson, 2001; Wakelin et al., 2004, Richardson et al., 2005). The strategy of eliminating the low P fertility production constraint in acid soils with corrective applications of P is limited economically and environmentally due to the high rates of P fertilizer required and the high P fixing capacity of these soils (Hinsinger, 2001).

Microbial populations are key components of the soil-plant continuum where they are immersed in a framework of interactions affecting plant development (Wakelin et al., 2004, Barea et al., 2005, Vassilev et al., 2006). Bacterial, actinomycetes and fungi can solubilize and mineralize P from inorganic and organic pools of total soil P respectively (Kucey et al., 1989; Richardson, 1994, 2001; Whitelaw et al., 1999; Wakelin et al., 2004). P-solubilizing microorganisms (PSM) are abundant in the soil and may be readily isolated from the rhizosphere (Freitas et al., 1997) and used as inoculants to increase P-availability to plants (Illmer et al., 1995; Whitelaw et al., 1999) as a rock phosphate solubilizer (Goldstein et al., 2003). These phosphate-solubilizing microorganisms transform insoluble phosphate into a soluble form through the process of acidification, chelation

and exchange reactions. This process has the potential to reduce the cost of manufacturing fertilizers as well as remobilizing the fixed P fertilizers added to soil by the development of more effective microbial inoculants (biofertilizers) (Rodrigues and Fraga, 1999). Therefore, many researchers have tried to increase the plant-available phosphate fraction by means of using PSMS such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Aspergillus* and *Penicillium* (Wakelin et al., 2004).

New technologies available for studying microbial interactions and their genetic control in the rhizosphere are beneficial in understanding these processes. These technologies may also be useful in the industrial bioprocess of rock phosphate or through the genetic manipulation of specific PSMS and/or plant species, being both economically and environmentally beneficial for agriculture (Whitelaw, 2000; Richardson, 2001; Goldstein et al., 2003; Barea et al., 2005). The knowledge of P-organic mineralization processes, are also useful in understanding seasonal P-cycling and fertility in the acid savannas where the no-till system is used.

The objective of this research was to investigate both the occurrence and levels of phosphate solubilization activity of rhizosphere microorganisms of maize produced in Brazilian "Cerrado" under conventional tillage and no-tillage management systems. This work will contribute in developing soil microbial community management schemes based on specific functions (P solubilization and mineralization), and selection of microorganisms as potential microbial inoculants (biofertilizers) especially under maize no-till planting systems and as potential use for industrial bioprocessing.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples

Soil samples were taken from the rhizosphere of four maize cultivars contrasting in P efficiency; HT3060 - P efficient hybrid, HS26x1113 - P inefficient hybrid, L3 - P efficient inbred line, and L22 - P inefficient inbred line of the Maize Breeding Program of Embrapa Maize and Sorghum (National Maize and Sorghum Research Center) at Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

These genotypes were growing in a conventionally managed low P (3mg P. dm^{-3}) red latosol (oxisol). Additional samples were collected from maize rhizosphere at eight locations with 13 -15 years of no-till management also under oxisol soils. Descriptions of each sample are provided in Table 1, including the type of crops in rotation with maize. Samples were taken from each genotype and plot at 60 days after sowing, during the flowering stage. Each of three replicated samples were composed of the soil adhering to five maize plants. The roots were shaken vigorously to separate soil from to the roots.

Isolation of P solubilizing microorganisms

The soil samples from the rhizosphere were serially diluted and inoculated on modified Pikovskaya's agar medium (Pikovskaya, 1948) containing insoluble inorganic forms of P, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ or tricalcium phosphate (P-Ca), AlPO_4 or aluminum phosphate (P-Al) and organic forms of P, phytic acid or sodium phytate (P-phytate) and soybean lecithin (P-lecithin). P-Ca, P-Al, P-phytate and P-lecithin were added in Pikovskaya'agar medium at 5, 3.5, 10 and 15 g.L^{-1} , respectively. Petri plates were incubated at room temperature for 10 days. Morphologically distinct colonies, both with and without halos were purified by repeated subculturing, maintained on PDA (potato dextrose agar) and incubated at room temperature. The isolates were grouped into filamentous fungi, actinomycetes or bacteria based on macro and microscopic observations.

Screening and phosphate evaluation

A preliminary experiment was conducted to test the ability to produce soluble phosphate in liquid cultures by the isolates. Three replicate flasks containing modified Pikovskaya's liquid medium were inoculated with isolates using 8 mm mycelia discs of fungal and actinomycetes cultures, and bacterial suspension ($10^8 \text{ cell.mL}^{-1}$) taken from 10-days-old cultures. Insoluble sources of P; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , sodium phytate, and soybean lecithin, were added to the liquid medium at 1.5g.L^{-1} (300 mgP.L^{-1}), 1 g.L^{-1} (250 mgP.L^{-1}), 1g L^{-1} (280 mgP.L^{-1}), 15g L^{-1} (101.1 mgP.L^{-1}), respectively. Three replicates control treatments were included in the experiment, containing only each P-insoluble source. The initial pH was adjusted to 6.0. The cultures were centrifuged (7000g,

10min) after 10 days of incubation, at 27⁰C, with gentle shaking and 5mL supernatant aliquots were passed through Whatman N^o42 filter paper to remove thick polysaccharide-like exudates. The filtrates were assayed for soluble P, using the Murphy and Riley (1962) colorimetric method. The amount of P solubilized was obtained by subtracting the soluble P concentration of the uninoculated control (i.e. P released by autoclaving of the P suspension) from that of the corresponding inoculated culture.

Second evaluation for phosphate solubilization, pH and phosphatase activity

The 45 best isolates from preliminary experiments were select based on amount of P solubilized in each medium and were again assayed for P solubilization as described above. Additional pH, phosphatase production and P-Melich1 solubilizing activity were also assayed. The pH solution was measured after 10 days and 150 μ L aliquots centrifuged and filtrated were used for the assay of isolates phosphatase activity, by Freitas et al. (1997) modified protocols. Aliquots of each sample were added of 0.48mL Universal Buffer 0.1M pH 6.5 or pH 11 (for assay of acid and alkaline phosphatase respectively), 0.12mL p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) solution 0.05M, and incubated at 37⁰C during 1 hour. Control treatments containing only liquid medium were included in the experiment with PNP added after incubation. The yellow color was measured at 410nm (Tabatai and Bremmer, 1969).

The effects of treatments were analyzed by ANOVA and means were compared using Tukeys's test, with a significant difference of 5% among treatments.

P-Melich solubilizing activity - Phosphorus incorporated into the organic matrix of polysaccharides

A simultaneous test was carried out using the same samples from the four experiments cited above, to determine the amount of phosphorus incorporated into the organic matrix of polysaccharides formed during culture growth. Ten mL aliquot cultures following 10 days of incubation were incubated for 24h with 100mL of Mehlich-1 P extractor solution (HCl 0.05M + H₂SO₄ 0.0125M), referred to as "double acid" extracting (Mehlich, 1978). Following incubation,

5mL supernatant aliquot were centrifuged, filtered, and assayed for soluble P using the same Murphy and Riley (1962) conventional method. The amount of P solubilized (P-Melich1) was obtained by subtracting the soluble P concentration of the uninoculated control from that of the corresponding inoculated culture.

The effects of treatments and effects of phosphorus determination methods were analyzed by factorial ANOVA and means were compared using the Tukey's test at 5% significance.

Identification of isolates

The 45 most efficient isolates solubilizing P-phytate, P-lecithin, P-Ca, and P-Al were identified based on nucleotide sequence data from the rDNA - ITS for fungal and 16S rDNA for bacterial and actinomycetes. The DNA was extracted using BIO 101 kit protocols (FastDNA SPIN Kit, Bio 101 Inc., USA) from cultures recovered in a Potato-Dextrose liquid medium (0.2 g of sample, fresh weight of fungi and actinomycetes mycelium filtrated and 200 μ L of bacterial suspension, 10^8 cell .mL⁻¹), growth for 10 days, at room temperature, without shaking. The rDNA fragments were amplified using fungal universal primers, ITS1 and ITS4 or ITS5 and ITS2 (White et al., 1990) and the 16S rDNA bacterial and actinomycetes fragments were amplified using the F968 and R1401 primers (Nubel et al., 1996).

DNA (20 ng) was amplified with 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 μ M of each dNTP, 2.5 mM of MgCl₂, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl and 0.2 μ M of each primer in a final reaction volume of 50 μ l. PCR amplifications were performed in a Perkin-Elmer 9700 thermocycler using the following cycles: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min for bacterial and actinomycetes and 95°C for 4 min, followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, 46°C for 60 s, 72°C for 30s and primer extension at 72°C for 10min for fungal isolates. PCR products were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide (1 μ g ml⁻¹), and visualized under UV Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA) transillumination. PCR products were removed from the gel and purified using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and

sequenced using the “Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing”(Applied Biosystems, Foster City, CA) kit in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nucleotide sequence data were compared with those on GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BlastN search (Altschul et al., 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of P solubilizing microorganisms and solubilization assay for inorganic and organic P sources

Three hundred seventy one morphotypes (116 fungi, 129 bacterial and 126 actinomycetes) were recovered from the rhizosphere of maize plants grown in oxisol soils from both conventional and no-till management systems (Table 1). Twenty-seven percent of the isolates had high P-solubilizing activity and may be able to affect P availability and acquisition by maize plants. These microorganisms, in a liquid medium, were able to solubilize more than 80 mgP from P-Ca, 10 mgP from P-Al, 10 mgP from P-phytate and 15 mgP from P-lecithin in ten days (Table 1). Different isolates of bacteria, fungi and actinomycetes showed variation in P solubilization (Figure 1). The highest level of inorganic P solubilization was found in the isolates from the P-Ca medium, mainly the actinomycetes and bacterial, and the lowest level occurred with P-Al solubilizing microorganisms (Figure 1A, 1B). P-phytate supported the highest solubilizing activity for the fungi isolates examined as well as having the highest number (Figure 1C). Only a few actinomycetes was found using the P-phytate medium. The number of actinomycetes isolates found in P-lecithin medium was greater than the number of fungi, but the highest solubilization was observed within the fungi (Figure 1D).

The isolation of the organic P solubilizing microorganisms from no-till maize was also influenced by the sites, type of associated crop rotation and use of swine waste (Table 1). Barea et al. (2005), Tarafdar and Gharu (2006), considering that two types of interactions in the rhizosphere are recognized, those based on dead plant material (the detritus-based interactions) which affect energy and nutrient flows, and those based on living plant roots. According to Bayer et al., (2001),

the type of litter from the previous crop and root exudates influence microbial community structure, most likely a result of a greater release of different sources of carbon and signals by litter decomposition. In this study, sixty-three colonies from the P-phytate medium were tested for solubilization of P-phytate and 19 colonies solubilized more than $10\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ in 10 days, and of these colonies, 10 (53%) were from the SCRGO sample (maize no-tillage rhizosphere in consortia with sugar cane). Of these same sample, 71% of the isolates had greater solubilization in liquid medium (Table 1). The number of P-lecithin-solubilizing isolates vary among samples, however, the microorganism isolated from MGO samples (maize rhizosphere with no-till soybeans) was the most effective, with 32% solubilizing more than $15\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ (Table 1).

The frequency of isolates varied between the maize genotypes evaluated (Table 1). A greater number of microorganisms was isolated from the rhizosphere of the maize genotypes L3 and HT3060, both considered P efficient by the Maize and Sorghum Research Center Breeding Program. The percent of P solubilization by these microorganisms in a liquid medium varied between the rhizosphere soils for each maize genotype and sources of P tested (Table 1). A total of 36 isolates from P-Ca medium solubilized more than $80\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ (30% of total P), in 10 days, and of these, 14 (39%) were isolated from the maize genotype L3.

Identification and evaluation of isolates for P-solubilizing activity, pH and phosphatase activity

A total of forty five microorganisms screened for phosphate solubilizing efficiency in specific liquid medium were genetically identified. The molecular characterization showed that close matches were found for all 45 isolates (Tables 2,3,4 and 5) and existing entries in the BLASTN GenBank database, permitting identify to the species for a majority of the isolates. The majority of the sequences aligned closely with high similarity, with the exception of B17, B46, B53 and B122.

The strains of bacteria, fungi and most of the identified (Tables 2,3,4 and 5) actinomycetes was confirmed as PSM with high P solubilization rates. These results permitted genetic

identification of the actinomycetes genera, *Kitasastospora*, (Table 5) like as PSM. Among the isolates screened, B17 and B5, were significantly the two most efficient strains to mobilize P from the P-Ca source culture solution (Table 2), solubilizing 67% and 58.5%, of the total P into culture solution respectively. These strains, identified as *Bacillus* sp (B17) and *Burkholderia* sp (B5) were isolated from the rhizosphere of L3 maize, a P efficient genotype. The isolated B5 also had the largest reduction in pH in the growth solution to 4.46. Among the actinomycetes the most efficient in solubilizing P (source P-Ca), was A4 identified as *Streptomyces platensis*. This actinomycetes was also isolated from the L3 rhizosphere.

The largest solubilization rates, with respect to the specific sources of phosphorus, were observed in P-Ca (Table 2). In this culture medium, the majority of PSM produced low amounts P of the enzyme phosphatase, with the exception of B48. Freitas et al. (1997), testing 7 bacteria, also found low levels of acid and alkaline phosphatases in culture solutions containing insoluble P from calcium phosphate sources. In this case, the activity of the organic acids liberated by the microorganisms has been indicated as the most important mechanisms of P-Ca solubilizing (Whitelaw, 2000, Goldstein et al., 2003). Production of organic acids results in acidification of the microbial cell and its surroundings and the release of P from mineral phosphate by proton substitution for Ca^{2+} . Alternative possibilities other than organic acids for mineral phosphate solubilization have been proposed based on the lack of a linear correlation between pH and the amount of solubilized P (Illmer and Schinner, 1992; Rodrigues and Fraga, 1999, Whitelaw et al., 1999; Whitelaw, 2000). These authors affirm that the reduction of the pH is a consequence of the liberation of organic acids. However, the decrease in pH of the culture medium can be the result of selective ion absorption by the microorganism and not a direct effect of acid production (Barroso and Nahas, 2005). In this study, was not found correlation between pH and amount of P mobilized ($R = -0.21$, $p < 0.001$) indicating that the decline of the concentration of phosphorus might have been influenced by others factors. Other mechanisms, such as the production of chelating substances by microorganisms as well as the production of inorganic acids have also been considered. However,

the effectiveness of these processes has been questioned and their contribution to P release in soil appears to be negligible (Rodrigues and Fraga, 1999).

The data of aluminum phosphate solubilization by the isolates tested (Table 3) showed lower rates of P mobilized than the P-Ca solubilizing microorganisms, as also indicated in the preliminary experiment (Figure 1). These results are in accord with Narsian *et al.* (1994), that found lower rates of solubilizing from P-Al than P-Ca among 8 microorganisms tested in tricalcium phosphate and aluminum. Similar results were also found by Whitelaw *et al.* (1999) and Barroso and Nahas (2005) that described this phenomenon probably due to the higher solubility of the Ca phosphates in culture solutions. The greatest decrease of pH was in the P-Al source with *Penicillium pimiteouiense*, to 2.82. The bacteria isolates from P-Al medium produced the high levels of alkaline phosphatase, however, the fungi produced high levels of acid phosphatase. Illmer *et al.* (1995), in studies with species of fungi and bacteria, affirmed that the principal mechanisms of $AlPO_4$ solubilizing was organic acid production and proton excretion, indicated by a decrease in pH. In contrast, in this study, a low correlation was observed between pH reduction and an increase of soluble P in the liquid culture after ten days of growth ($R = -0.001$; $P < 0.001$) indicating that the decline of the concentration of insoluble phosphorus might have been influenced by other factors. Similar data were obtained in a liquid medium of P-Al and P-Ca by Whitelaw *et al.* (1999) for *Penicillium radicum* and by Barroso and Nahas (2005) with various soil fungi.

As indicated above, the source of P-Ca favored the isolation of the largest number effective PSM from the efficient maize genotypes, L3 and HT3060 (Table 2). On the other hand, the most efficient isolates, B58, F39 and F50 recovered in the medium with aluminum phosphate were isolated from the inefficient maize genotypes, L22 and HS26x1113 (Table 3). Some authors have pointed out that the phosphorus liberated from clay minerals with $AlPO_4$ can increase the levels of toxic Al^{3+} in solution (Illmer *et al.*, 1995). Considering that Al phosphates are less soluble than Ca phosphates and that the plants can favor certain microorganisms in its rhizosphere (Lynch and Whipps, 1990; Richardson, 1994; Morgan *et al.*, 2005), is it probably that PSM more efficient in

solubilizing tricalcium phosphate in this study were enhanced in the rhizosphere of the efficient maize genotypes L3 and HT3060. This study supports that these microorganisms are contributing to the efficiency of these genotypes in acquiring P from the soil P. Several rhizosphere investigations of microbial communities have indicated that the presence of different plant species or genotypes influence the microbial community due to the differential response of these organisms to different root exudation patterns, especially when plants are under environmental stress (Lynch and Whipps, 1990; Richardson, 1994; Morgan et al., 2005) for example the phosphorus (Hinsinger, 2001). Knowledge of these interactions and of the composition of species in the maize rhizosphere involved in the process of P cycling are fundamental to understand the biological processes in the soil and for the development of biotechnological applications.

The mineralization data of organic P from acid phytic (P-phytate) is shown in Table 4. In general, reduction in pH was not observed. The species *Talaromyces rotundus* (F80, F102 and F105), *Aspergillus terreus* (F79) and *B. cepacia* (B116) were the most efficient in mineralizing P, without significantly different. The fungi were the most efficient in the liberation of P from P-phytate. Other authors found similar results, affirming that the fungi of the genus *Aspergillus* are the most efficient in solubilizing phytate (Yadav and Tarafdar, 2003). The strain of *T. rotundus*, F102 isolated in this study produced high levels of acid phosphatase. This species, has not been reported in the literature as an organism with potential to mineralize P-phytate. The majority of the bacteria isolated in phytate medium, with the exception of *Bacillus megaterium*, produced alkaline fosfatase, while the fungi produced both acid and alkaline phosphatase. Tarafdar and Marschner (1995) highlighted the potential of soil microorganisms to increase the availability of P from phytate through phytase activity increases, who showed that P nutrition of wheat grown in a soil supplied with phytate was increased when the plants were co-inoculated with a mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and *Aspergillus fumigatus*, fungi with known phytase activity. The ability of soil microorganisms to solubilizing various forms of inorganic P is well documented (Kucey et al., 1989; Richardson, 1994; Whitelaw et al., 1999, Goldstein et al., 2003), nevertheless, the potential of

soil microorganisms to mediate the availability of P from phytin to plants is uncertain. The results of this work clearly demonstrate the efficiency of microorganisms in releasing P from phytate (P-phytin) and other organic P sources.

The bacteria, *Pantoea agglomerans* and *Burkholderia* sp identified in this study produced phosphatase and mineralized phytate (Table 4). *P. agglomerans* also solubilized P-Al (Table 3). This bacterium, has been cited in the literature as a PGPM, fixing N₂ in maize (Riggs et al., 2001) and solubilizing inorganic phosphates in soybean (Son et al., 2006). The strains of *Burkholderia* spp., also solubilized P-Ca confirming the results of other authors. This species has been cited also as PGPM by Bevivino et al. (2000). According to Nacamulli et al. (1997), among the microorganisms occurring in the rhizosphere of *Zea mays*, *B. cepacia* probably represents one of the predominant bacterial species. Several studies have shown that *B. cepacia* is able to compete with the indigenous microflora, survive, colonize roots of various maize cultivars (Nacamulli et al. 1997; Bevivino et al. 2000) enhance the yield of several crop plants (Rodrigues and Fraga, 1999; Baldani et al., 2001), antagonize and repress the major soilborne fungal pathogens of maize, such as those belonging to the genus *Fusarium* (Bevivino et al. 2000) and is currently being used as a commercial biofertilizers (Rodrigues and Fraga, 1999). This bacterium has also been reported as endosymbiotic of some mycorrhiza (Barea et al., 2005) having interesting metabolic genes that may influence mycorrhiza functions. These results corroborated the interactions between mycorrhiza fungi and PSM in a cooperative fundamental role for P-cycling, stimulating considerable interest in their application to sustainable agro-ecosystems (Barea et al., 2005).

The microorganisms identified in this study with the ability to mineralize P-lecithin are listed in Table 5. *Penicillium citrinum* (F95) and *Aspergillus terreus* (F93) were the most efficient solubilizing 44% and 42% of total P, respectively and were among the three best producers of acid phosphatase. *A. terreus* has been cited in the literature as an important phytase producing fungus (Mitchell et al., 1997). In this study, *A. terreus* was also able to solubilizing P from aluminum phosphate, phytate and lecithin (Tables 3 - 5). *Talaromyces rotundus* was one of the highest

phosphatase producers in the phytate (Table 4) and lecithin (Table 5) medium, indicating that this fungus represents an important species of phytase and phospholipases producers. This ability of microorganisms to solubilize various sources of P has been highlighted by many authors as an important characteristic to enhance P nutrition of plants as inoculants.

Ko and Hour (1970) and Siqueira et al. (2004) have reported that actinomycetes are a principal microorganism responsible for decomposing phospholipids through phospholipases. However, this study found that fungi and bacteria were the most efficient in mineralizing P from lecithin. The actinomycetes probably, have a different mechanism to mineralize P compared to fungi and bacteria. The actinomycetes only produced acid phosphatase and had the greatest reduction in the pH in the P-lecithin culture medium (Table 5).

Quantification of P-solubilization by P-Mehlich-1 method

The evaluation of P solubilization by microorganisms in the experiments presented above was also conducted employing a method of phosphorus measurement in medium liquid with P-Melich1 extractor (Mehlich, 1978). The amount of P solubilized varied significantly among the methods, with and without extractor, and among the isolated (Tables 2-5). In general, the values of soluble P detected by the method P-Mehlich1 for fungi, actinomycetes and bacteria were larger than for the conventional method of direct reading, without extraction described by Murphy and Riley (1962). This may have occurred because the some of the phosphorus solubilized may have been adsorbed on some microorganisms surface and which was resolubilized by the P-Melich-1 extractor.

A large amount of a thick polysaccharide-like compound was observed in some flasks of bacteria and fungi, that could have functioned as a organic matrix adsorbing the P liberated by the microorganisms in the culture solution. Wakelin et al. (2004), in studies with strains of *Penicillium* isolated from wheat roots, reported a lower P level in the solution when the production of the polysaccharide was high. This phenomenon may also explain why some isolates solubilized different amounts of P in the initial screening (Figure 1) and in the second experiment (Tables 2- 5).

The measurement of P solubilized without the Melich-1 extractor in the present study may have been underestimated and may have lead to the discard of isolates with a good potential for P solubilization. In some cases, the values of P solubilized in P-Melich1 method were lower than P by the conventional method probably due the aliquot size used. More investigation using others P extractants and adjustments will be necessary to refine this methodology. However, we considering the use of the P-Mehlich1 method important for a better measurement of the P mobilized by P-solubilizing microorganisms.

CONCLUSIONS

In these experiments comparing the relative efficiency of phosphate solubilizing microorganisms using different insoluble P sources, was observed that P solubilization and P mobilizing mechanisms depended on the nature of the P source and the type of organism, bacteria, fungi or actinomycetes. The highest solubilization was observed in the medium containing tricalcium phosphate with bacteria. The bacteria strains, B17 and B5, isolated from the rhizosphere of the P efficient maize line L3 were the most effective, and were identified as *Bacillus* sp and *Burkholderia* sp. The fungal population was the most P-solubilizing effective in the aluminum, phytate and lecithin sources of phosphate. In general, the values of P solubilized by the fungi, actinomycetes and bacteria measured using P-Mehlich1 extractor method were the highest. This was most likely due the use of the P-Mehlich1 extractor that was able to detect the phosphorus adsorbed in the organic matrix formed by the microorganisms in solution culture.

These results demonstrate the potential of using species recovered from the maize rhizosphere to improve P acquisition efficiency by plants. Those microorganisms are of interest as potential for inoculants to improve the efficiency of P acquisition from the soil and fertilizer sources, especially rock phosphates. These microorganisms are being maintained in a genetic bank for future researchers and potential biotechnological applications in the development of more sustainable production systems.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA; Zhang, J; Zhang Z; Miller W; Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Reseach* 25: 3389-3402
- Baldani VLD, Baldani JI and Döbereiner J (2001) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp *Biol Fertil Soils* 30: 485–491
- Barea JM, Pozo MJ, Azco'n R, Azco'n-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56: 1761–1778
- Barroso CB, Nahas E (2005) The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl Soil Ecol* 29: 73–83
- Bayer C, Martin-Neto L, Mielniczuk J, Pavinato A (2004) Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. *Pesq Agropec Bras*: 39: 677-683
- Bayer C, Martin-Neto L, Mielniczuk J, Sangoi L (2001) Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. *Soil Sci Soc Amer J* 65: 1473-1478
- Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L (2000) Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol Fertil Soils* 31: 225–231
- Carneiro RG, Mendes IC, Lovato PE, Carvalho AM, Vivaldi LJ (2004) Soil biological indicators associated to the phosphorus cycle in a Cerrado soil under no-till and conventional tillage systems. *Pesq Agropec bras* 39: 661-669
- Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate –solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L). *Biol Fert Soil* 24: 358-364
- Goldstein A, Lester T, Brown J (2003) Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1647: 266–271
- Gyaneshwar G, Naresh Kumar LJ Parekh, PS (2002) Poole Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245: 83 – 93
- Hinsinger, P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173-195

- Illmer P, Barbato A, Schinner F (1995) Solubilization of hardlysoluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem* 27:265–270
- Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils *Soil Biol Biochem* 24:389–395
- Morgan JAW, Bending GD, White PJ (2005) Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56: 1729–1739
- Ko WH, Hora FK (1970) Production of phospholipases by soil microorganisms. *Soil Sci* 110: 355-358
- Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME (1989) Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv Agron* 42: 199–228
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1-10
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of hight plants Academic Press, San Diego, CA 889p
- Mehlich A (1978) New extractant for soil test evaluation of phosphorus, potassium, magnesium, calcium, sodium, manganese, and zinc. *Commun in Soil Sci Plant Anal* 9:477-492
- Mitchell DB, Vogel K, Weimann BJ, Pasamontes L, Van Loon APGM (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, p 245–252, 1997
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27: 31-36
- Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Chiarini L (1997) Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiol Ecol* 23:183–193
- Narsian V, Thakkar J, Patel HH (1994) Isolation and screening of phosphate solubilizing fungi. *Indian J Microbiol* 34: 113-118
- Novais RF, Smyth TJ (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 399p
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178: 5636– 5643

Pikovskaya, RI (1948) Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370

Pierzynski GM (ed.). 2000 Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residuals, and waters. Southern Coop. Series Bulletin No 396, June 2000. 110pp.
http://wwwsoilncsuedu/sera17/publications/sera17-2/pm_coverhtm.

Yadav RS, Tarafdar JC (2003) Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biol Biochem* 35 1–7

Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* 28: 897-906

Richardson AE (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability In: Pankhurst CE, Doulose BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Soil Biota Management in Sustainable Farming System*. CSIRO, Australia, pp 50–62

Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE, O'hara, CP Simpson, RJ (2001) Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant Soil* 229: 47–56

Richardson AE, George TS, Hens M, Simpson RJ (2005) Utilization of soil organic phosphorus by higher plants In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing Wallingford, pp 165-184

Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol* 28: 829–836

Rodrigues H; Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech Adv* 17: 319-339

Siqueira JO, Andrade AT, Faquin V (2004) O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas In: Yamada T; Abdalla SRS (eds) *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Potafós, Piracicaba, v. 01, pp 117-156

Son HJ, Park GTB, Cha MS, Heo MS (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour Technol* 97: 204–210

- Tabatai MA, Bremmer JM (1969) Use of pNitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1: 301-307
- Tarafdar JC, Gharu A (2006) Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum* *Applied Soil Ecology* 32, 273–283
- Tarafdar, JC, Marschner, H (1995) Dual inoculation with *Aspergillus fumigatus* and *Glomus mosseae* enhances biomass production and nutrient uptake in wheat (*Triticum aestivum* L) supplied with organic phosphorus as Na-phytate. *Plant Soil* 173: 97–102
- Tarafdar, JC, Yadav, RS, Meena, SC (2001) Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164: 279–282
- Wakelin, SA, Warren, RA, Harvey, PR, Ryder, MHP (2004) Phosphate solubilization by *Penicillium* spp closely associated with wheat roots. *Biol Fertil Soils* 40: 36-43
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor Jw (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications* Academic Press, San Diego, Calif, pp 315–322
- Whitelaw Ma (2000) Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69:99–151
- Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* *Soil Biol Biochem* 31: 655–665
- Vassilev, N, Vassileva M, Nikolaeva I (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 137–144

Table 1. Description of maize rhizosphere samples, type of soil, type of production system, number of microorganisms (fungi, bacteria, actinomycetes) isolated from soil samples, and source of insoluble P, tricalcium phosphate (P-Ca), aluminum phosphate (P-Al), sodium phytate (P-phytate), and soybean lecithin (P-lecithin)

Sample	Soil ^a	City/State ^b	Manage/ Crop ^c	Total P inorganic- solubilizing isolates ^d		Total P organic- solubilizing isolates ^d	
				P-Ca	P-Al	P- phytate	P- lecithin
L3	Red latosol	Sete Lagoas/MG	CT/Maize	34 (14)	13 (7)	-	-
L22	Red latosol	Sete Lagoas/MG	CT/Maize	23 (6)	18 (4)	-	-
HT3060	Red latosol	Sete Lagoas/MG	CT/Maize	28 (9)	8 (4)	-	-
HS26x1113	Red latosol	Sete Lagoas/MG	CT/Maize	21 (7)	17(6)	-	-
CNPMS	Red latosol	Sete Lagoas/MG	NT/Maize HT3060	-	-	2 (1)	21 (6)
JSP	Dusky latosol	Jardinópolis/SP	NT/Maize	-	-	6 (0)	25 (3)
CNPS	Dusky latosol	Londrina/PR	NT/Maize	-	-	3 (1)	10 (0)
MGO	Red latosol	Morrinhos/GO	NT/Maize (Soybean)	-	-	9 (3)	22 (7)
PGO	Red latosol	Planaltina/GO	NT/Maize (Grassland/ Soybean)	-	-	9 (1)	20 (0)
GRGO	Dusky Latosol	Rio Verde/GO	NT/Maize (Grassland)	-	-	13 (3)	15 (0)
SCRGO	Dusky Latosol	Rio Verde/GO	NT/Maize (Sugar Cane)	-	-	14 (10)	11 (3)
SMRGO	Dusky Latosol	Rio Verde/GO	SM/NT/Maize	-	-	7 (0)	22 (5)
Totals				106	56	63	146

^a The soils of Brazil are classified as Latosol in the Brazilian classification and as Oxisols in the USDA classification

^b States acronym: MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; GO, Goiás

^c Production system: CT, Conventional Tillage; NT, No-Tillage; SM, Swine Manure. In parentheses, the crop grown in rotation with maize.

^d Total number of isolates (number in parentheses represents high level of P solubilization in 10 days, greater than 80mgP.L⁻¹ for P-Ca, 10mg.L⁻¹ for P-Al, 10 mg.L⁻¹ for P-phytate, and 15 mg.L⁻¹ for P-lecithin.

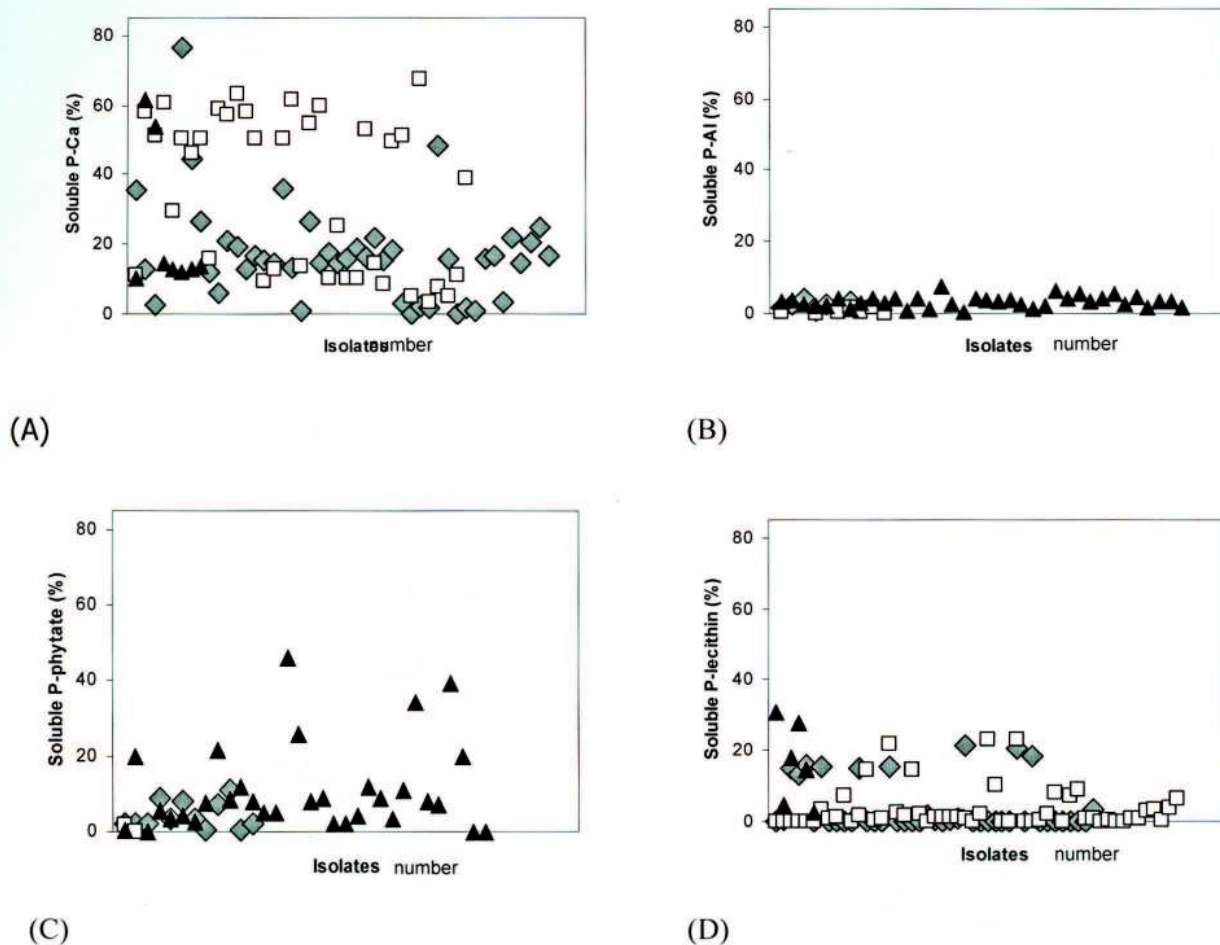


Figure 1 – Percent of soluble phosphate of isolates from the maize rhizosphere produced in culture solution, at 10 days, containing the following insoluble P-forms: (A) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$ (P-Ca) and (B) AlPO_4 (P-Al) (C) Sodium phytate (P-phytate); (D) Soybean lecithin (P-lecithin). Each symbol represents an isolate of bacteria (\blacklozenge), actinomycetes (\square) or fungi (\blacktriangle).

Table 2. Closest relatives using rDNA fragments, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Tricalcium Phosphate (TCP) - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (P-Ca)

Isolate (Sample) ^a	Closest relatives database reference		Amount solubilized phosphate (mg P. L ⁻¹)		Final pH ^d	Phosphatase activity (µg pNP mL ⁻¹ h ⁻¹)		Taxon ^e
	Species (accession number)	Similarity index	Conventional method ^b	P Melich1 method ^c	(Initial pH=6.0)	Acid	Alkaline	
A4 (L3)	<i>Streptomyces platensis</i> (ABI63439.1)	99%	68.0 Aabc	39.8 Aab	4.52 a	1.88 a	0.59 a	Actinomycetes
A14 (L3)	<i>S. tumescens</i> (AF346485.1)	99%	43.1 Aabc	29.6 Aab	4.64 b	0	1.89 a	Actinomycetes
A19 (L22)	<i>S. chartreusis</i> (SCH399468)	99%	23.5 Aabc	37.3 Aab	4.66 b	0	0	Actinomycetes
A20 (L22)	<i>S. griseochromogenes</i> (SGR310923)	98%	4.1 Aab	30.5 Aab	4.82 bc	0	0	Actinomycetes
A26 (HT3060)	<i>S. collinus</i> (SCO306623)	99%	1.8 Aa	9.4 Aa	4.55 a	0	0	Actinomycetes
A29 (HS26x1113)	<i>S. avermitilis</i> (AB078897.2)	98%	3.7 Aab	29.9 Aab	4.78 b	0	0	Actinomycetes
B2 (L3)	<i>Pantoea ananatis</i> (AF364846.1)	99%	81.8 Ac	179.9 Bc	4.79 bc	2.62 a	7.24 a	Bacteria
B5 (L3)	<i>Burkholderia sp</i> (AY224513.1)	97%	175.4 Ad	167.2 Ac	4.46 a	0	0	Bacteria
B7 (L22)	<i>Bacterium H3</i> (AY345547.1)	97%	77.1 Ac	63.0 Aab	4.91 c	0	0	Bacteria
B17 (L3)	<i>Bacillus sp</i> (AF507879)	89%	200.0 Ad	211.1 Ac	4.70 b	0	6.15 a	Bacteria
B46 (HT3060)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY268142.1)	90%	70.6 Abc	54.9 Aab	5.05 c	0	18.71 a	Bacteria
B48 (HS26x1113)	<i>B. cepacia</i> (AY741360.1)	96%	64.3 Aabc	67.9 Ab	4.93 c	0	70.98 b	Bacteria
F14 (HT3060)	<i>Penicillium pinophilum</i> (AF176660)	98%	25.9 Aabc	38.9 Aab	4.84 bc	0	0	Fungi

^a Means followed by the same lower case letter in each column and higher case letter in each line did not differ significantly at 5% probability level - Tukey test

^b Amount of P solubilized by the Murphy and Riley (1962) procedure after 10 days of growth in a liquid medium containing 300 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^c Amount of P solubilized extracted by the Melich-1 procedure (Mehlich, 1978), after 10 days growth in a liquid medium containing 300 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^d The final pH was determined at the end of the experiment. The final pH of controls treatments containing only liquids mediums was 6.09

^e The isolates were grouped into filamentous fungi, actinomycetes or bacteria based on macro and microscopic observations.

Table 3. Closest relatives using rDNA fragments, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Aluminum Phosphate, $AlPO_4$ (P-Al)

Isolate (Sample) ^a	Closest relatives database reference		Amount solubilized phosphate (mg P. L ⁻¹)		Final pH ^d (Initial pH=6.0)	Phosphatase activity (µg pNP mL ⁻¹ h ⁻¹)		Taxon ^e
	Species (accession number)	Similarity index	Conventional method ^b	P Melich1 method ^c		Acid	Alkaline	
B52 (L3)	<i>Pantoea ananatis</i> (AF364846.1)	96%	10.3 Ab	10.8 Aa	3.15 bc	3.57 a	19.5 a	Bacteria
B53 (L3)	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY924376.1)	89%	13.3 Ab	14.6 Aab	3.07 b	0.36 a	50.1 b	Bacteria
B56 (L22)	<i>Paenibacillus elgii</i> (AY090110.1)	98%	0.03 Aa	16.0 Bab	3.09 b	0	53.1 b	Bacteria
B58 (L22)	<i>Burkholderia cepacia</i> (F3AY509957.1)	95%	20.3 Ac	38.4 Bc	3.09 b	0	64.8 b	Bacteria
F39 (HS26x1113, L22)	<i>Aspergillus terreus</i> (AY373871.1)	98%	14.9 Abc	16.3 Aab	3.03 b	48.1 b	0	Fungi
F40 (L22)	<i>Penicillium pimateouiense</i> (AF037436.1)	96%	12.1 Ab	20.8 Bb	2.82 a	57.9 b	0	Fungi
F50 (HS26x1113)	<i>A. terreus</i> (AJ413985.1)	95%	13.7 Abc	18.3 Aab	3.23 c	50.2 b	0	Fungi

^a Means followed by the same lower case letter in each column and higher case letter in each line did not differ significantly at 5% probability level - Tukey test

^b Amount of P solubilized by the Murphy and Riley (1962) procedure after 10 days of growth in a liquid medium containing 250 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^c Amount of P solubilized extracted by the Melich-1 procedure (Mehlich, 1978), after 10 days growth in a liquid medium containing 250 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^d The final pH was determined at the end of the experiment. The final pH of controls treatments containing only liquids mediums was 4.79

^e The isolates were grouped into filamentous fungi, actinomycetes or bacteria based on macro and microscopic observations.

Table 4. Closest relatives, P solubilized, pH and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, Sodium phytate – Phytic Acid (P-phytate)

Isolate (Sample) ^a	Closest relatives database reference		Amount solubilized phosphate (mg P. L ⁻¹)		Final pH	Phosphatase activity (µg PNP mL ⁻¹ h ⁻¹)		Taxon ^e
	Species (accession number)	Similarity index	Conventional method ^b	P Melich1 method ^c	(Initial pH=6.0) ^d	Acid	Alkaline	
B116 (MGO)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY741355.1)	98%	52.7 Ade	92.8 Bf	5.11 a	0	9.7 a	Bacteria
B118 (MGO)	<i>Arthrobacter sp.</i> (AF408967.1)	99%	28.0 Aabc	28.2 Aab	5.94 c	0	23.6 de	Bacteria
B119 (PGO)	<i>Bacillus megaterium</i> (AY167865.1)	98%	19.5 Aab	37.3 Bbc	5.51 b	46.4 bc	21.6 cd	Bacteria
B121 (GRGO)	<i>Uncultured gamma proteocarioto</i> (AJ575715.1)	94%	4.9 Aa	11.5 Aa	5.84 bc	0	20.9 cd	Bacteria
B122 (GRGO)	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY924376.1)	90%	25.5 Aabc	24.9 Aab	5.43 ab	0	31.9 e	Bacteria
B124 (GRGO)	<i>Arthrobacter sp.</i> (AF408952.1)	99%	30.5 Abcd	31.4 Ab	5.88 bc	0	20.7 bcd	Bacteria
F79 (SCRGO)	<i>Aspergillus terreus</i> (ATE413985)	96%	46.5 Acde	49.1 Acd	5.71 b	26.4 ab	10.8 a	Fungi
F80 (SCRGO)	<i>Talaromyces rotundus</i> (AF285115)	96%	57.5 Ae	67.6 Ae	5.27 a	12.4 a	13.4 abc	Fungi
F102 (SCRGO)	<i>T. rotundus</i> (AF285115)	97%	48.6 Acde	54.2 Acde	5.53 b	62.6 c	12.0 a	Fungi
F105 (SCRGO)	<i>T. rotundus</i> (AF285115)	96%	47.4 Acde	60.3 Bde	5.93 c	45.4 bc	12.2 ab	Fungi

^a Means followed by the same lower case letter in each column and higher case letter in each line did not differ significantly at 5% probability level - Tukey test

^b Amount of P solubilized by the Murphy and Riley (1962) procedure after 10 days of growth in a liquid medium containing 280 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^c Amount of P solubilized extracted by the Melich-1 procedure (Mehlich, 1978), after 10 days growth in a liquid medium containing 280 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate

^d The final pH was determined at the end of the experiment. The final pH of controls treatments containing only liquids mediums was 6.02

^e The isolates were grouped into filamentous fungi, actinomycetes or bacteria based on macro and microscopic observations.

Table 5. Closest relatives, P solubilized, pH, and phosphatase activity by microorganisms screened and isolated from samples of maize rhizosphere grown in liquid cultures containing P inorganic insoluble form, soybean lecithin (P-lecithin)

Isolate (Sample) ^a	Closest relatives database reference		Amount solubilized phosphate (mg P. L ⁻¹)		Final pH (Initial pH=6.0) ^d	Phosphatase activity (µg pNP mL ⁻¹ h ⁻¹)		Taxon ^c
	Species (accession number)	Similarity index	Conventional method ^b	P Melich1 method ^c		Acid	Alkaline	
A62 (CNPMS)	<i>Kitasatospora putterlickiae</i> (AY189976.1)	98%	14.9 Aab	13.2 Aab	4.79 ab	76.1 cde	0	Actinomycetes
A65 (CNPMS)	<i>K. paracocheatus</i> (U93328)	99%	17.4 Aab	24.9 Abc	4.80 ab	67.1 cde	0	Actinomycetes
A68 (JSP)	<i>Streptomyces ipomoeae</i> (AY207593.1)	98%	19.0 Aabc	22.4 Abc	4.47 a	53.9 abcd	0	Actinomycetes
A80 (MGO)	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>limoneus</i> (SH16SRR)	98%	2.1 Aa	24.4 Bbc	4.47 a	66.1 bcde	0	Actinomycetes
A83 (MGO)	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>Limoneus</i> (SH16SRR)	98%	3.4 Aa	34.3 Bc	4.50 a	64.6 bcde	0	Actinomycetes
B62 (CNPMS)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967.1)	99%	2.1 a	0	5.75 d	5.1 ab	0.7 a	Bacteria
B65 (JSP)	<i>Methylobacterium</i> sp. (D32232.1)	98%	0	36.5 c	6.03 d	1.1 a	0.7 a	Bacteria
B70 (MGO)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967.1)	99%	0.6 Aa	15.5 Bab	5.88 cd	16.4 abc	8.2 b	Bacteria
B76 (SMRGO)	<i>Uncultured bacterium</i> (<i>Reator de fósforo</i>) (AF527601.1)	96%	0	24.8 bc	5.92 c	0	8.1 b	Bacteria
B86 (JSP)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AY177350.3)	97%	0.9 Aa	24.4 Bbc	5.94 cd	26.0 abc	4.2 ab	Bacteria
B104 (SCRGO)	<i>Uncultured Bacillus</i> sp. (AY242537.1)	93%	6.7 Aab	7.1 Aab	5.75 c	4.9 ab	7.9 b	Bacteria
F87 (MGO)	<i>Acremonium strictum</i> (AY138846.1)	93%	29.8Abcd	23.8 Abc	5.06 b	77.5 cde	19.4 c	Fungi
F93 (SCRGO)	<i>Aspergillus terreus</i> (AF516138.1)	98%	42.9 Bcd	24.7 Abc	5.11 b	0	0	Fungi
F94 (SCRGO)	<i>Talaromyces rotundus</i> (AF285115)	95%	24.0Aabcd	20.3 Abc	5.93 cd	117.6 e	0.8 a	Fungi
F95 (SCRGO)	<i>Penicillium citrinum</i> (AY373904.1)	99%	44.0 Bd	20.2 Abc	5.58 bc	95.8 de	0	Fungi

^a Means followed by the same lower case letter in each column and higher case letter in each line did not differ significantly at 5% probability level - Tukey test. ^b Amount of P solubilized by the Murphy and Riley (1962) procedure after 10 days of growth in a liquid medium containing 101.1 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate. ^c Amount of P solubilized extracted by the Melich-1 procedure (Mehlich, 1978), after 10 days growth in a liquid medium containing 101.1 mgP.L⁻¹ insoluble phosphate. ^d The final pH was determined at the end of the experiment. The final pH of controls treatments containing only liquids mediums was 6.01. ^e The isolates were grouped into filamentous fungi, actinomycetes or bacteria based on macro and microscopic observations.

APÊNDICE

A identificação morfológica referente aos fungos e actinomicetos solubilizadores de fosfato isolados estão em fase de análise e serão incorporados no artigo referente a este capítulo. Esta identificação taxonômica foi realizada por Dra Maria Aparecida Rezende do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais com relação aos fungos e a referente aos actinomicetos por Dra. Janete Magali Araújo, Dept. de Microbiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

CAPÍTULO 2 - Diversidade de fungos micorrízicos na rizosfera de genótipos de milho (*Zea mays*) contrastantes para eficiência no uso de fósforo, analisada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Diversidade de fungos micorrízicos na rizosfera de genótipos de milho (*Zea mays* L.) contrastantes para eficiência no uso de fósforo, analisada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

RESUMO

A diversidade da população nativa de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de aquisição de fósforo (P) foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Para esta análise foram amplificados os fragmentos do DNA ribossomal (rDNA) com iniciadores universais para fungos e específicos das famílias Acaulosporaceae, Glomaceae e Gigasporaceae. Os iniciadores utilizados e o DGGE específico para as famílias Acaulosporaceae e Glomaceae foram eficientes em diferenciar a estrutura da comunidade de FMA. Os genótipos de milho tiveram maior influência na comunidade micorrízica que o teor de fósforo no solo, onde estes genótipos foram crescidos. Os padrões de DGGE revelaram bandas que estavam presentes apenas nos genótipos eficientes para fósforo, principalmente em L3 e H1, em condições estressantes deste elemento no solo, indicando que alguns grupos de FMA foram estimulados em suas rizosferas. As espécies *Acaulospora longula*, *Glomus mosseae*, *A. rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *G. Caledonium* e *G. intraradices* foram encontradas somente na rizosfera de genótipos eficientes em solos com baixo teor de P. Maior diversidade de FMA em todas as famílias estudadas foi encontrada em solos sob plantio direto, em relação ao plantio convencional. A simbiose efetiva do milho com micorrizas pode favorecer a produtividade dessa cultura nos solos ácidos do cerrado brasileiro, possibilitando maior tolerância dos cultivares ao estresse de P no solo.

Palavras-chave: PCR-DGGE, fungos micorrízicos arbusculares (FMA), DGGE de micorrizas

Mycorrhizal diversity analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency

ABSTRACT

Genetic diversity of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities in the rhizosphere of maize genotypes contrasting for phosphorus efficiency was evaluated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Fragments of AMF ribosomal DNA (rDNA) were amplified using nested PCR with fungal universal primers and ITS specific primers for Acaulosporaceae, Glomaceae and Gigasporaceae. ITS-Acaulosporaceae and Glomaceae specific primers and DGGE were efficient in differentiating the dynamics of mycorrhizal communities. Maize genotypes had a greater influence on the rhizosphere mycorrhizal community than the level of P in soil. DGGE profiles of maize roots revealed bands that were present only in P efficient genotypes (L3 and H1), indicating that some mycorrhizal groups were stimulated by P efficient maize genotypes. *Acaulospora longula*, *Glomus mosseae*, *A. rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Gl. caledonium* e *Gl. intraradices* species were only found in the rhizosphere of P efficient maize genotypes of the low P soils. A greater mycorrhizal diversity was found in soil samples from no-till maize compared to conventional tillage. The productivity of maize in Brazilian acid savanna soils depends upon effective mycorrhizal colonization with crop species and consequential improvement in P acquisition by the crop.

Key words: PCR-DGGE, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)

INTRODUCTION

Low phosphorus (P) availability limits plant growth in many acid soils of the tropics such as the Oxisol soils of Brazilian savannas ("Cerrado"). P in these soils is present in pools with a wide range of availability to the plants (Hinsinger, 2001). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have an important function in soil nutrient acquisition and mobilization, principally phosphorus. The role of AMF for nutrient acquisition is due to extending the root system by increasing the surface area for nutrient uptake and enhancing the ability of the plants to scavenge for scarce and immobile nutrients, particularly P (Van der Heijden et al., 1998; Smith et al., 2003; Koide and Mosse, 2004; Gosling et al., 2006). The external mycelium weight can be as much as 3% of root weight and approximately 10-100 meters of mycorrhizal mycelium can be found for each centimeter of root length (Cardoso and Kuyper, 2006). As a symbiotic system, the fungi receive carbon sources from the host plant. AMF also improve the soil aggregate stability, as their extraradical hyphae can bind to soil particles mechanically and chemically through the exudation of glomalin (Van der Heijder et al., 1998; Wright et al., 2005).

AMF root colonization in terms of contribution to nutrient acquisition differs markedly among fungal species, isolates, and host plant genotype (Abbot and Robson, 1991; Koide, 2000; Marschner, 1995; 1998; Siqueira et al. 2002, Wright et al., 2005). Maize plants have a high growth rate and a high demand for nutrients, frequently presenting micotrophic interactions (Clark and Zeto, 1996). However, little information is available regarding the interaction of maize genotypes contrasting for P efficiency with AMF present in the rhizosphere of tropical maize.

According to Gosling et al. (2006) arbuscular mycorrhiza can be used in agriculture to increase crop yields while minimizing the requirements on chemical fertilizers. In spite of numerous studies claiming substantial yield increases, mycorrhizal technology is still far from being routinely applied in agricultural practice. The main reasons for this are the problems in identifying and tracking fungal species in the field, the poor understanding of the basic biology of AMF and the inability to grow these obligatory biotrophic fungi in pure cultures and in trap cultures and as a

result, population distribution in the field may be misinterpreted. Selection of appropriate AMF, production of inocula in quality and quantity, and the ecology of mycorrhiza inoculation are critical issues for the application of AMF technology in agriculture (Simon et al., 1992; Gianinazzi et al., 2002; Barea et al., 2005a; 2005b). Cloning and sequencing of PCR products amplified with AMF-specific primers have allowed the characterization of culture-independent AMF communities (Simon et al., 1992; Helgason et al., 1998; Redecker et al., 2000; Siqueira et al., 2002). Molecular fingerprinting techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of ribosomal DNA (rDNA) fragments amplified from total community DNA have been widely used to evaluate the dynamics of bacterial and fungi communities (Muyzer and Smalla, 1998). Few studies have used this approach to study mycorrhizal fungi communities in the soil and rhizosphere (Kowalchuk et al., 2002; Opik et al., 2003; de Souza et al., 2004; Ma et al., 2005). The combination of DGGE with sequencing of amplified DNA fragments can be applied to analyze phylogenetic relationship of the community members.

The objective of this work was to evaluate the indigenous mycorrhizal population dynamics in the rhizosphere of maize genotypes contrasting for P acquisition efficiency and the effects of maize cultivars on the fungal community structure in “cerrado” soil with high and low P. A set of PCR primers which amplify ribosomal DNA from five genera in the Glomeromycota (Redecker, 2000) was used in order to study a wide portion of fungi diversity. Additional evaluations of AMF infection in maize roots rhizosphere were made by stereomicroscopic visualization.

MATERIAL AND METHODS

Field experimental design and sampling

The field experiment was performed in an Oxisol soil (Brazilian savanna biome – “cerrado”), at Embrapa Maize and Sorghum located in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. Rhizosphere samples were taken from maize plants of eight cultivars, differing in their abilities to utilize phosphorus previously classified by Embrapa Maize and Sorghum breeding program (Parentoni et al., 2000). The maize genotypes were three P efficient hybrids (H1-E, H2-E, H3-E),

two P inefficient hybrids (H4-I, H5-I), one inefficient inbred line (L1-I), and two efficient inbred lines (L2-E and L3-E), which were planted in two conventionally managed plots: high phosphorus (P1), with 29 mg P.dm⁻³ and a low P (P2), with 3 mg P.dm⁻³ in a randomized block design as a part of a larger field trial. The soil was a red oxisol (clay texture -55% clay, 11% silt, 34% sand) with pH 5.2 (soil/water ratio, 1:2.5 [w/v]), organic matter (3%); Al (0.25), Ca (2.29), Mg (0.36) cmolc per kg (dry weight) of soil dm³ in a 1 N KCl extraction and 0.16 mg dm⁻³ of K, in a Mehlich I extraction. Samples were taken from each genotype and plot at 60 days after sowing, during the flowering stage. Each of three replicated samples were composed of the soil adhering to five maize plants. The roots were shaken vigorously to separate soil from to the roots. Samples were taken from the bulk soil of the experiments described above, from the rhizosphere of no-till maize, from no-till bulk soil and soil of native savanna vegetation as a control. Samples used for extraction of DNA were kept in the freezer at -20°C.

Spore isolation and spore counts

Mycorrhiza spores were extracted in triplicate from 100g of the rhizosphere of maize plants by sucrose centrifugation and flotation and collected on 250, 125, 63 and 32 mm mesh wet sieves according to the methodology described by Clapp et al. (1996). Spores were counted and evaluated under a stereomicroscope and separated according to their morphology.

AMF staining and root examination

Individual roots were picked randomly from the root samples collected, and cut into pieces of 1 cm in length. For each sample, 100 root fragments were analyzed for the presence of AMF mycelia after root staining. Before the staining, roots were clarified in 5% (v/v) KOH for 1 h, followed by acidification with 1% HCl (v/v) overnight. The roots were stained with 0.05% Trypan Blue (w/v) for 20 min in lactoglycerol acid and were visualized under stereomicroscope. The percentage of colonization was assessed using the grid line intersect method proposed by Giovannetti and Mosse (1980). Differences between spore recovery data and percentage of

colonization (after standartization) in rhizosphere soil of each maize cultivars were evaluated using Tukey's test (HSD) at 5% of significance.

Spores and total community DNA extraction

DNA was extracted from 500 mg of soil samples using the protocol described in a soil DNA extraction and purification kit (FastDNA SPIN kit for soil, Bio 101 Inc., USA). DNA of AMF was used as a control in all denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): *Acaulospora morrowiae* (grassland isolate), *A. serobienta* (coffee isolate), *Gigaspora margarita* (maize isolate), *Glomus clarum* (grassland isolate), *Glomus etunicatum* (grassland isolate), *Scutellospora* sp (maize isolate). Spores DNA were extracted directly from trap culture of vermiculite containing pure culture of the spores using the FastDNA SPIN kit for soil according to the modified protocol described by Chellius et al. (1999).

Total AMF-specific PCR conditions

PCR amplification of AMF 18S ribosomal genes fragments was performed using a nested PCR with fungal universal primers, NS1 and NS4 (White et al., 1990) for the first step and AMF specific primers, VANS1 with CG clamp (Muyzer and Smalla, 1998) and NS21 (Simon et al., 1992) for the second step (Figure 1). Amplification reactions were performed in a final volume of 50 μ L using 50 μ M of each dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1% (v/v) formamide, 0.2 μ M of each primer, 20 ng of DNA and 1 unit of *Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR conditions were: 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of first step and 25 cycles of second step (nested) at 94 °C for 20s, 55 °C for 35s, 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 5 min. Amplified fragments were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide (1 μ g ml^{-1}), and visualized under UV Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Acaulosporaceae, Glomaceae, Gigasporaceae-specific PCR conditions

To obtain Acaulosporaceae and Glomaceae-specific amplification products from soil, the first step of the nested PCR was performed combining the primers NS5 and ITS4 (White et al.,

1990) (Figure 1). These amplification products were used as template for a second PCR step using the primers ACAU1660, GLOM1310 (Redecker et al., 2000) with GC clamp specific to Acaulosporaceae and Glomaceae, respectively, in combination with the primer ITS2 (White et al., 1990). Fragments Gigasporaceae-specific were obtained after a first step amplification using the primer pair ITS1 and ITS4 and a second step with ITS1 and GIGA5.8R attached with clamp. PCR conditions were the same as described above.

Analysis of PCR products by DGGE

DGGE was performed with the DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A volume of 20 μ L of the PCR reaction was applied directly onto polyacrylamide gel in 1X TAE buffer (20 mM Tris-acetate [pH 7.4], 10 mM sodium acetate, 0.5 mM disodium EDTA). Denaturing gradients varied to each primer combination, which were 35-60% to VANS1/NS21 and ACAU1660/ITS2, 25-50% to GLOM1310/ITS2, 40-70% to ITS1/GIGA5.8R. These gradients were formed with 6% (w/v) acrylamide stock solutions containing 0 and 100% denaturant condition [7 M urea and 40% (v/v) deionised formamide]. Fragments were separated under electrophoresis of 75 V for 16 h in 0.5X TBE (Tris-borate EDTA) buffer at a constant temperature of 60 °C. Gels were silver stained according to Creste et al. (2001) and the images were digitally captured by a Nikon digital camera. DGGE banding patterns were assessed by cluster analysis with a percent disagreement coefficient, and the differences among the profiles of AMF communities were depicted as a dendrogram constructed by the unweighted pair group with mathematical average method (UPGMA) using the software Statistica version 6.0.

Sequencing purified fragments from DGGE gels and sequence alignment

To recover the amplified DNA fragments, a second DGGE gel was performed with the same conditions but stained with ethidium bromide. The most prominent bands were excised, and transferred to a microcentrifuge tube containing 50 μ L of MilliQ water, incubated at room temperature during two hours and frozen overnight. Subsequently, the gel fragment was centrifuged at 11,000 g for 60 s, the supernatant was transferred to a new tube, and 5 μ l of eluted DNA was used

as template for an additional PCR reaction with the same condition. PCR products were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), and visualized under UV Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA) transillumination. PCR products were purified using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using the kit "Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing" (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nucleotide sequence data were compared with those on the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BlastN program (Altschul et al., 1997).

RESULTS

Mycorrhizal colonization and AMF spores

The occurrence of mycorrhizal indigenous infection in maize, based on the microscopic analysis of 1 cm long root pieces, varied among genotypes and P levels in the soil (Figure 2A and 2B). In general, for both levels of P, the P efficient maize hybrids (Figure 2A) and inbred lines (Figure 2B) showed superior mycorrhizal root colonization in comparison with the inefficient ones. Colonization of the P inefficient line, was significantly lower than L3-E and L2-E to the two levels of P in the soil. L3-E once under P stress an increasing of about 20% in AMF-like infection was observed when compared with high P soil.

The recovery of AMF spores from different rhizosphere soils of maize cultivars also varied among genotypes and P levels (Figure 2C and 2D). For the maize hybrids, the number of spores was superior in the low P soils, except for the P inefficient hybrid H5-I (Figure 2C). However, for the P efficient maize inbred line, L3-E, the total number of spores was superior in the high P soils, differently as found for the inefficient P inbred line L1-I (Figure 2D).

In AMF characterization based on spore morphology were identified the genera *Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora* and *Acaulospora*, where the *Scutellospora* and *Gigaspora* were the most frequently found in the P efficient genotypes, L3-E and H3-E.

DGGE analysis of AM fungal rhizosphere colonization

All samples analyzed using the primers VANS1/NS21, ACAU1660/ITS2, GLOM1310/ITS2 and ITS1/GIGA5.8R amplified PCR products with the expected size of 590, 445, 645 and 440 base pairs (bp), respectively. DGGE patterns for VANS1/NS21 fragments from maize rhizosphere cultivated under low P were very similar, indicating that this primer pair was not able to distinguish the AMF populations among the maize genotypes. This result did not reproduce the differences already visualized in the root colonization among the maize genotypes (Figure 2-C, 2-D). As this primer amplifies a wide range of AMF taxon, the differences in roots colonization could be related to specific groups of AM fungi present in the rhizosphere soil.

Thus, DGGE analysis was conducted with fungal specific rDNA primers pair covering three families of Glomeromycota, the Acaulosporaceae, Glomaceae and Gigasporaceae. All different specific AMF primers revealed detectable fragments in the DGGE, of them 104 were excised from the gels, reamplified and sequenced. Out of these, only 38 fragments produced sequences of good quality (Table 1).

Acaulosporaceae-specific DGGE and sequence analysis of amplified bands

PCR-DGGE of the Acaulosporaceae specific primers for the ITS rDNA gene differentiated all rhizosphere samples (Figure 3). Almost all samples yielded multiple bands, indicating the presence of ribotypes variability among the rhizosphere examined. Dendrogram analysis was performed for the rhizosphere of the hybrids (Figure 3-I) and the inbred lines (Figure 3-II). The banding patterns of maize hybrids rhizosphere revealed one major cluster, which grouped most of the P efficient hybrids at 0.26 of genetic distance (Figure 3-I). The two P inefficient hybrids were clustered in different group depending on the P levels in the soil, both of them at 0.21 of genetic distance. It may be considered that P efficiency was the overriding factor separate the Acaulosporaceae species in maize hybrids rhizosphere, followed by the P availability in the soil.

Acaulosporaceae species in maize lines rhizosphere showed a wide genetic diversity, with no clear discriminatory factor of the cluster analysis (Figure 3-II). However, the Bulk (P1), a no-

rhizosphere soil sample, and L1-I (P1) were clustered at 0,06 of genetic distance, supported by a bootstrap of 90%, indicating that this line under low P probably did not influence this AMF community on the soil. A remarkable difference within these mycorrhizal species could be found comparing conventional and no-tillage production system. Regarding to the no-tillage, AMF population was independent from the plant rhizosphere effect, which showed a genetic distance of 0.11 with the profile of no-tillage soil (87% bootstrap). The most distinct DGGE banding pattern was observed in the Acaulosporaceae population of native “Cerrado”, suggesting that the maize cultivation affected mycorrhizal Acaulosporaceae community.

Sequence analysis did not confirm the family specificity of some bands amplified with Acaulosporaceae-specific primers, once species of other families of Ascomycota and Glomeromycota were identified, as *Glomus* sp. and *Archaeospora* sp. (Table 1). Among the 16 fragments sequenced, only five showed the greatest level of sequence identity with the genera *Acaulospora* (Table 1) and no other Acaulosporaceae genus was found. *Acaulospora* species were found in maize P efficient genotypes L3-E (P1) and H1-E (P1), and were not found in P inefficient genotypes. The band correspondent to the number 8 was found in almost all rhizosphere of hybrids and its sequence did not align with any sequence deposited in the Genbank, indicating that this sequence probably belongs to an unknown species. Different bands amplified in some unique DGGE lanes were identified as belonging to the same species, like the bands 3 and 4 that corresponded to *Glomus intraradices* (Figure 3, Table 1).

Glomaceae-specific DGGE and sequence analysis of excised DGGE bands

DGGE patterns of Glomaceae specific PCR yielded different bands among rhizosphere samples of maize genotypes (Figure 4). The dendrogram based on the banding patterns generated a cluster at genetic distance of 0.18 that included all rhizosphere of P efficient and inefficient maize hybrids cultivated in high P soils (Figure 4-I), indicating that different AMF-Glomaceae populations were selected depending on the P availability in the soil. The highest *Glomus* spp diversity in maize hybrids rhizosphere was found in low P soils. AMF population of two different P

efficient maize hybrids under low P (H1-E and H2-E) were grouped at 0.16 of distance supported by a bootstrap of 83% (Figure 4-II) differing of the other inefficient hybrids.

Even though with a clear grouping formation supported by bootstrap analysis, the P availability in the soil seems to be a putative discriminating factor of clustering the Glomaceae population of maize lines rhizosphere under low P grouped at 0.08 of distance supported by a bootstrap of 82% (Figure 4-II). Genetic diversity of mycorrhizal population was reduced when maize lines (L2-E and L3-E) were grown under low P soil in comparison of the same lines cultivated under high P availability when were grouped at 0.23 of genetic distance and 65% of bootstrap. Additionally, rhizosphere profiles obtained under high P soil conditions showed exclusive bands that could not be visualized in low P soils (see bands 32 and 30, Figure 4-II). Probably, the increasing of P on the soil contributed to the colonization of new Glomaceae species in maize rhizosphere.

Sequence analysis (Table 1) confirmed the identity of all fragments as belonging to the genus *Glomus* of Glomaceae family, showing some species exclusively present in P efficient maize genotypes (Figure 4), such as *Glomus caledonium* in H2-E (P1) and *Glomus mosseae* in L3-E (P1) and H3-E (P1). As it was found in Acalosporaceae family, three different bands amplified in the same sample was found to be a single specie (24, 25 and 26 bands, Figure 4-I).

Gigasporaceae-specific DGGE and Sequence analysis of excised DGGE bands

The specific Gigasporaceae PCR-DGGE yielded bands that provided a low level of discrimination of maize rhizosphere (Figure 5). The fingerprints generated showed a lower diversity than Acaulosporaceae and Glomaceae with a lower number of bands. In all maize rhizosphere, a prevalent monomorphic band (bands 38 and 39, Figure 5) was identified as *Gigaspora margarita* (Table 1). However, in L2-E (P2) was found an exclusive band (band 35, Figure 5-II), identified as *Scutellospora cerradensis*. Gigasporaceae population was not influenced neither by the P availability nor by the maize genotypes. Nevertheless, the no-tillage system generated bands that

were absent in the conventional crop management and in the native “Cerrado” (see arrows and band 36, Figure 5-II).

DISCUSSION

The knowledge of the structure and composition of species of the mycorrhizal community in the rhizosphere of plants is important for evaluation of environmental effects, such as phosphorus stress, on these species. Preliminary fingerprints of the rhizosphere mycorrhizal community were generated by DGGE with the use of a universal primers pairs designed by Simon et al. (1992) to assess the diversity of maize rhizosphere indigenous AMF population cultivated under low and high P fertilization of soils. The 18S rDNA region amplified by VANS1/NS21 primer pair provided a low level of discrimination among the samples and the majority of the sequenced bands were not related to the Glomeromycota phylum (date not shown). Recent studies have shown that the VANS1 annealing site is not well conserved within the Glomeromycota phylum (Clapp et al., 1999) and that several newly characterized ancestral lineages of the Glomeromycota do not have this site at all (Redecker et al., 2000). Similar results were observed by Ma et al. (2005) and Opik et al. (2003) using universal primers of the 18S rDNA described by Helgason et al. (1998) and Simon et al. (1992).

Thus, the PCR-DGGE method using specific primers to ITS rDNA fragments designed by Redecker et al. (2000) was very well suited to amplify Acaulosporaceae and Glomaceae species from maize rhizosphere. This data, together with the visual analyses of AMF colonization showed that both maize genotypes and soil P stress influenced total population density (spores number and AMF root colonization) and species diversity (DGGE bands). In general, the highest number of spores was found in low P plots (Figure 2). Similar results have been found by various authors that have related that under high P soil conditions the colonization of AMF is often suppressed (Gosling et al., 2006). The Acaulosporaceae and Glomaceae PCR-DGGE profile showed bands that were observed only in the rhizosphere of maize genotypes under low P and absent in high P soils. Most of this variation in mycorrhiza frequency was to differences in the tolerance to P stress of the maize

genotype. The adverse effect of high soil P levels on AMF formation and colonization is well documented (Abbot and Robson, 1991, Smith et al., 2003; Gosling et al., 2006), nevertheless, the effect of low P on the presence or absence of certain species has not been clearly explained. The effect of low P on AMF population profiles were examined in a population of recombinant inbred maize lines by Kaeppler et al. (2000), who identified three quantitative trait loci (QTL) which reflected improved growth in a low-P soil and an additional QTL was associated with mycorrhizal responsiveness, indicating that considerable scope exists for the development of new maize genotypes adapted for growth in low-nutrient-input systems.

Few differences were found in spore numbers among P efficient and inefficient genotypes evaluated (Figure 2). In contrast, the rhizosphere profiles obtained in the Acaulosporaceae and Glomaceae PCR-DGGE showed exclusive bands, found only in P efficient genotypes, mainly in the L3-E (P1) and H1-E (P1) genotypes, that corresponded to *Acaulospora rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Gomus caledonium* and *Gomus intraradices* species. Interestingly, these species only appear in the rhizosphere of the P efficient maize genotypes in conditions of low P. This difference in the occurrence of mycorrhiza species may depend upon root exudations and/or signaling of the maize genotype under P stress. According to Lynch and Whipps (1990), Marschner (1998), Barea et al. (2005c), root exudations are crucial determinants rhizosphere microorganisms diversity. Plants grown in soils with P deficiency can exudate functional substances, such as organic acids, jasmonic acid, phosphatases and phenolic compounds which can stimulate colonization and growth of the mycorrhiza (Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Siqueira et al. 1991; Marschner, 1998; Lambais, 2000; Hinsinger, 2001; Koide and Mosse, 2004) and influence host-AMF specificity.

Comparison of maize inbred lines L3-E and L1-I under P stress demonstrate maize genotype influence on AMF colonization (Figure 2-B) and Acaulosporaceae and Glomaceae diversity differences (Figure 3 and 4). Variations in colonization of Gigasporaceae species were not observed in DGGE fingerprints (Figure 5). Additionally, a greater number of *Gigaspora* and *Scutellospora* spores were observed in the maize line L3-E (P1) and the species *Gigaspora margarita* was present

in all of the rhizosphere samples (Figure 5, bands 38,39), including the maize genotype L1-I (P1). This suggests that *Scutellospora* species may be responsible for the largest colonization in the roots of L3 as compared to L1 (Figure 2-B). These *Scutellospora* species may be contributing to the improved efficiency of L3-E in the acquisition of the phosphorus. Considering that the same rhizosphere sample was used for the DGGE and spore counts, it is possible that the differences between these two maize lines for species of the Gigasporaceae family may be linked to differences in signaling or root infection.

The variability in mycorrhizal responsiveness among different maize cultivars has also been observed by Kaeppler et al. (2000) and Wright et al. (2005). The ability of plants to grow under P stress and mycorrhiza colonization efficiency are strongly influenced by the host genotype (Marschner et al., 1995, Smith et al, 2003, Wright et al., 2005). Several authors have demonstrated that the maize genotypes used in this study have significant differences in P efficiency (Alves et al., 1999; Parentoni et al., 2000). Other authors have related the increase of maize production by the AMF colonization (Clark and Zeto, 1996; Kaeppler et al., 2000; Wright et al., 2005) and the effect of the genotype and soil in bacteria and fungi community structures (Gomes et al., 2001; Mota et al., 2002; Gomes et al., 2003). No previous studies with these maize genotypes contrasting for P efficiency have described AMF diversity and population structure in the Brazilian savanna soils. The understanding of the mechanisms that increase P acquisition would be very useful in to delineating strategies in plants breeding programs (Alves et al., 1999) and continued research to characteristic AMF population dynamic, including genes controlling host signaling is warranted.

The specific Acaulosporaceae PCR-DGGE was efficient in to differentiate AMF population in the rhizosphere sample evaluated in this study. However, sequence analysis did not confirmed the identity of the some bands, with reference to the characterization of species belong to other groups of fungi and others families of Glomeromycota (Table 1). Continued primer refinement (Redecker et al. 2000) should increase the reliability of PCR-based strategies targeting the identification of AMF.

Out of the DNA sequences described, only 38 were phylogenetically informative, hampering robust phylogenetic analysis. As such, the comparison of specific ITS rDNA fingerprints (Figure 3, 4 and 5) provided a more reliable method of comparison than tree construction based on the sequence variations (data not shown) and consequently trees constructions were not used. Some AMF-like sequences did not match with any sequence deposited in the Genbank (Table 1, bands 8, 36, 37), indicating that these sequences belong to new AMF, still not identified. A double-band pattern of *Glomus* was observed in this study, as also reported by Kowalchuk et al. (2002) and de Souza et al. (2004) for the *Gigaspora* species. Sanders et al., 1995; Clapp et al., 1999; Kowalchuk et al., 2002, and Ma et al., 2005 have suggested that operon heterogeneity may be responsible for these double bands. The presence of variability for some rRNA loci in an AMF community may lead to complex DGGE banding patterns from a single spore. However others phenomena may also explain the doublet feature observed as unspecific primer and chimeric DNA molecule formation recognized as a source of sequence infidelity (Ma et al., 2005).

Mycorrhiza diversity for these three AMF families described above was also affected by the crop production system. Clear differences were found between conventional tillage (CT) and no-tillage management systems (NT). The highest diversity in DGGE analysis was found in NT samples. The profiles obtained from the no-till system had distinct bands (bands 33,36 mainly). Highest mycorrhizal diversity in maize no-till was also found by Jansa et al. (2003). Kabir et al. (2005) evaluated AMF hyphal density and nutrient content in maize cultivated under no-till or conventional tillage for 11 years and found that AMF hyphae length and densities in maize rhizosphere was highest in the no-tillage plots. These changes in communities of AMF colonizing maize roots might be due to (1) differences in hyphae maintenance disruption caused by tillage, (2) changes in organic matter and nutrient content of the soil, (3) changes in microbial activity, and/or (4) changes in weed populations in response to soil tillage. Different AMF species differ in their symbiotic efficiency (Smith et al., 2003), and thus any induced changes in AMF community structure could lead to changes in crop nutrient uptake and/or productivity.

CONCLUSION

DGGE fingerprints based upon ITS rDNA fragments amplified by nested PCR from community DNA, were effective in studying mycorrhiza community structures in the rhizosphere. This analysis was supported by DNA sequencing and by visualization of mycorrhizal colonization and spore counts. These results clearly showed that maize genotype influenced the structure of mycorrhiza (Acaulosporaceae and Glomaceae population) more drastically than P level in the soil, indicating that some mycorrhizal groups are enhanced by efficient maize genotypes cropped under low P.

The species of *Scutellospora* together with *Acaulospora longula*, *Archeospora* and *Glomus* sp. were presents in L3-E (P1) and absents in L1-I (P1). The others species *Glomus mosseae*, *A. rugosa*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Glomus caledonium* and *Glomus intraradices* were present in the P efficient maize genotypes and were absent in inefficient genotypes grown under low P soils. These species may be involved in the P efficiency of the maize genotypes, however more investigations are necessary to confirm this phenomenon and future inoculation trials would be important to test the effectiveness symbiosis and the mechanisms involved in host colonization of these species. In general, the genera *Scutellospora* and *Gigaspora* were the most frequent in maize genotypes.

The highest AMF diversity occurred in the no-till management system rhizosphere and soil samples showing that the specific production system may be selecting specific AMF species. Conventional tillage may have reduced the number of species of AMF that are importance to crops.

Understanding the diversity of the native AM fungi in crop plant root systems is a prerequisite for effective management in sustainable agricultural systems, especially in low P and acid soils such as the soils of the "Cerrado". The productivity of maize will depend upon the symbiotic effectiveness of the colonizing mycorrhiza and the maize cultivar. Genotypes efficient in conditions of P stress may be related with the symbiotic effectiveness. The use and understanding of

the genetic control of the exudation of mycorrhiza signaling substances by the host plant and the use of these substances will be useful in managing useful native AMF populations.

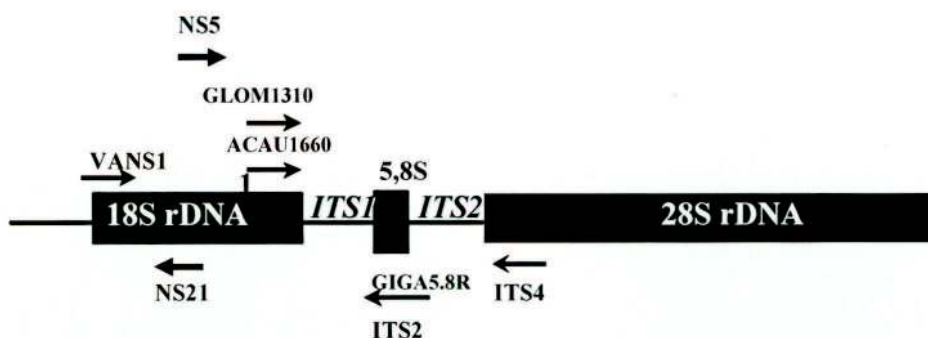


Figure 1. Schematic representation of ribosomal RNA genes with annealing sites of primers. Diagram is not to scale.

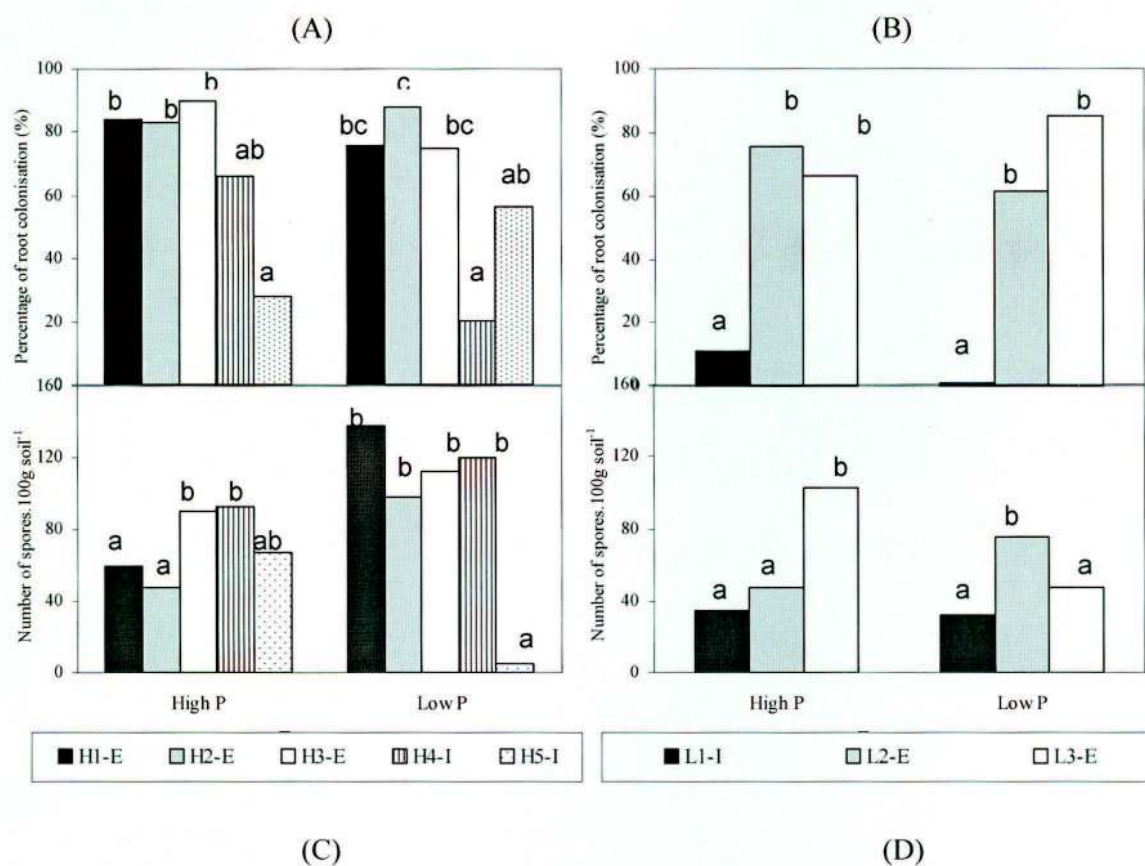


Figure 2. Colonization of indigenous mycorrhizal fungi of maize roots growing under low P fertilization of soil, $3\text{mgP}\cdot\text{dm}^{-3}$ (low P soil) and $29\text{mgP}\cdot\text{dm}^{-3}$ (high P soil). The hybrids (A and C) were: H1-E, H2-E and H3-E P efficient, and H4-I and H5-I P inefficient. The maize inbred lines (B and D) were: L2-E and L3-E, P efficient, L1-I, P inefficient. Means followed by the same letter in each column did not differ significantly at 5% probability level - Tukey test.

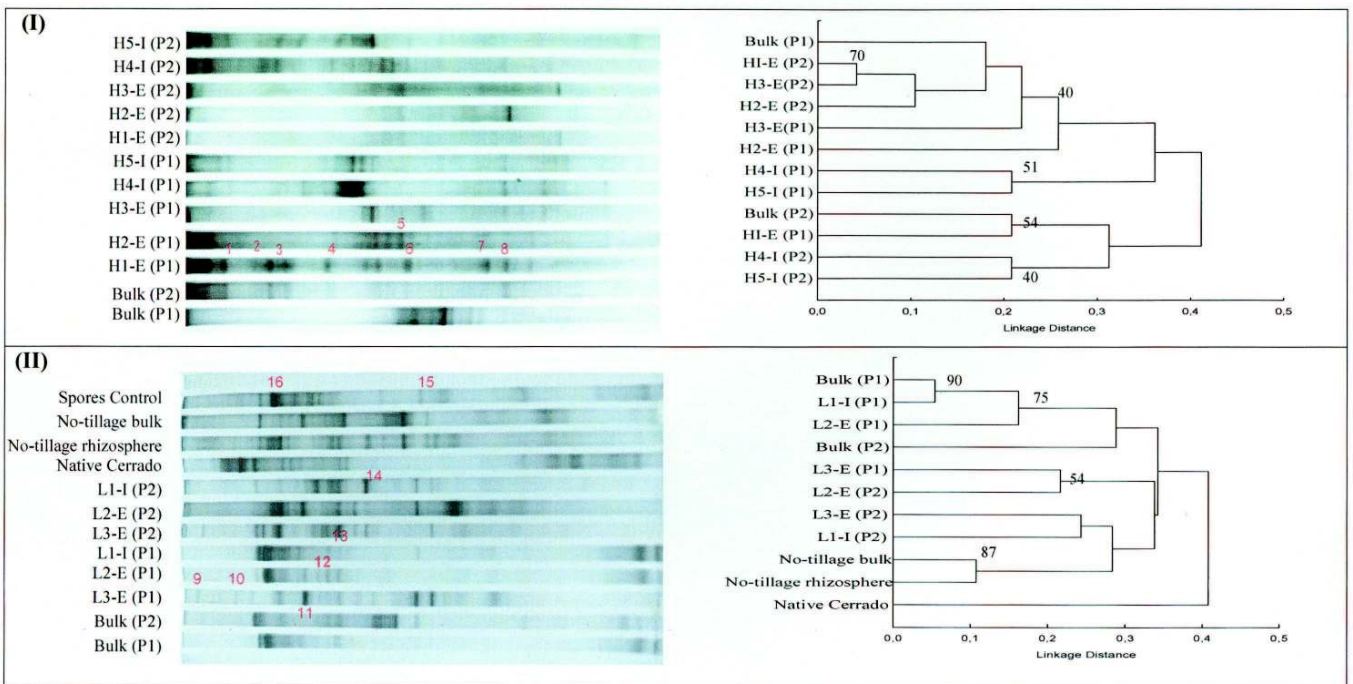


Figure 3. Dendrogram showing the distance tree and the Acaulosporaceae specific PCR-DGGE banding patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The dendrogram was obtained by unweighted pair group method with mathematical averages (UPGMA). The P efficiency (E) or inefficiency (I) and levels of P on the soil, low P (P1) and high P (P2) are indicated to each sample. The numbers indicate different bands among samples identified in Table 1. Bootstrap analyses were performed with 10000 repetitions and values higher than 40 are shown.

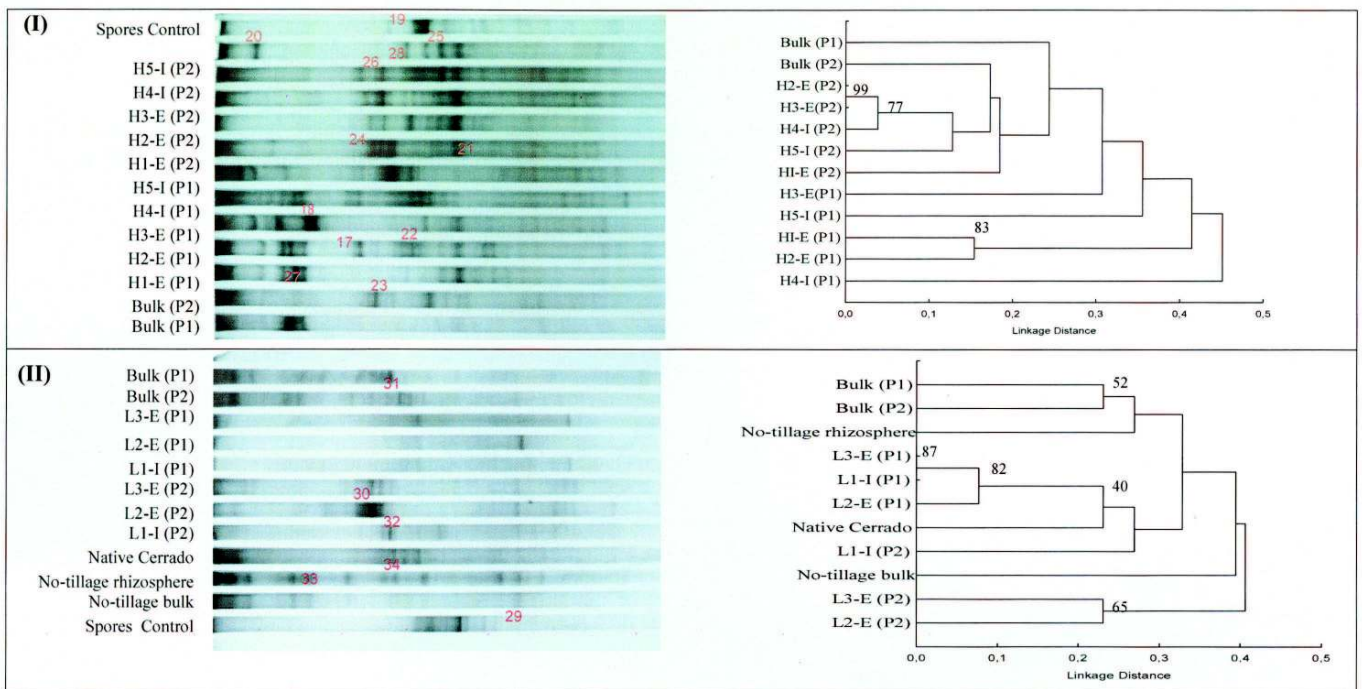


Figure 4. Dendrogram showing the distance tree and the Glomaceae specific PCR-DGGE banding patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The dendrogram was obtained by unweighted pair group method with mathematical averages (UPGMA). The P efficiency (E) or inefficiency (I) and levels of P on the soil, low P (P1) and high P (P2) are indicated to each sample. The numbers indicate different bands among samples identified in Table 1. Bootstrap analyses were performed with 10000 repetitions and values higher than 40 are shown.

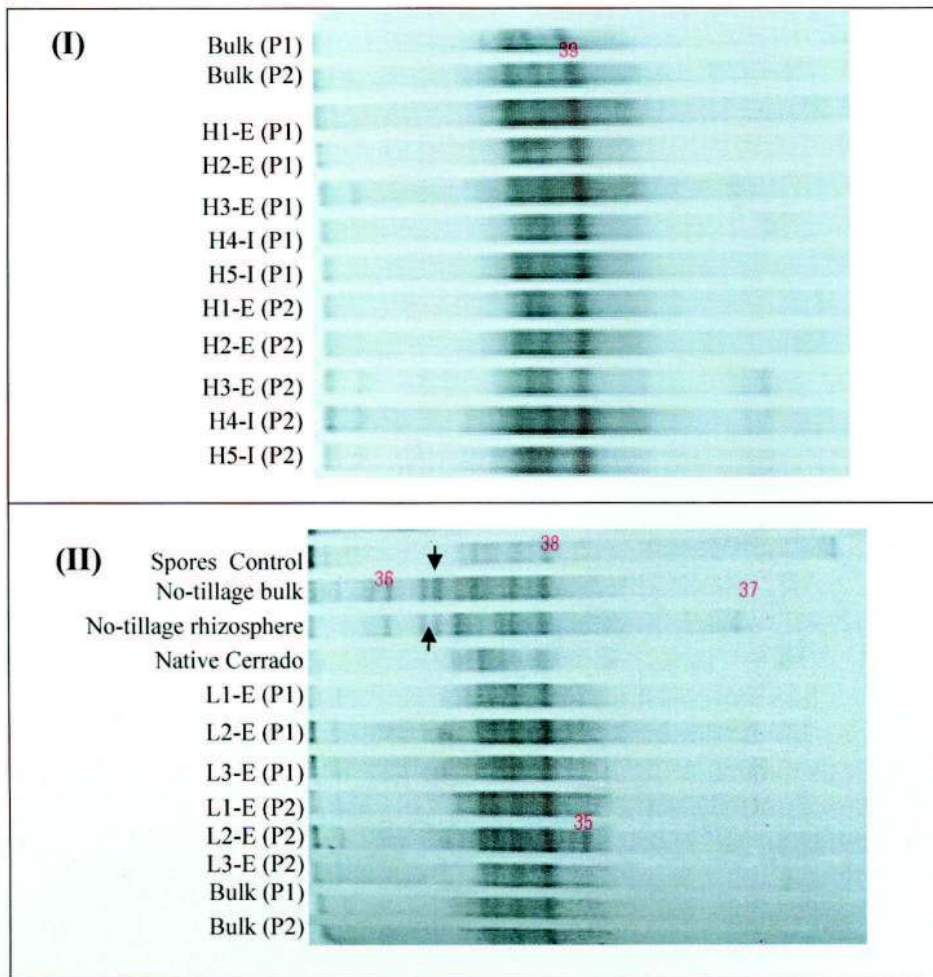


Figure 5. Gigasporaceae specific PCR-DGGE patterns of rhizosphere soil of maize hybrids (I) and inbred lines (II). The P efficiency (E) or inefficiency (I) and levels of P on the soil, low P (P1) and high P (P2) are indicated to each sample. The numbers indicate different bands among samples identified in Table 1.

Table 1. Closest relatives of the mycorrhiza associated with maize rhizosphere that were recovered from DGGE bands (valid sequences).

DGGE band ¹	Closest relatives		
	Microorganisms ² (% similarity)	Phylogenetic affiliation	Genbank Accession number ²
Acaulosporaceae specific DGGE			
1	<i>Acaulospora scrobicula</i> (88%)	Acaulosporaceae	AJ306442
2	<i>Acaulospora morrowiae</i> (88%)	Acaulosporaceae	AJ242500
3	<i>Glomus intraradices</i> (94%)	Glomaceae	AF185692
4	<i>Glomus intraradices</i> (97%)	Glomaceae	AF185692
5	<i>Glomus</i> sp. 0191 (98%)	Glomaceae	AY174693
6	<i>Acaulospora rugosa</i> (93%)	Acaulosporaceae	AZ14005
7	<i>Ajellomyces capsulatus</i> (100%)	Ajellomycetaceae ³	AF322387
8	Soil clone	-	
9	<i>Archaeospora</i> sp. (93%)	Archaeosporaceae	AF452636
10	<i>Acaulospora longula</i> (89%)	Acaulosporaceae	AJ306439
11	<i>Archaeospora</i> sp. (94%)	Archaeosporaceae	AF452636
12	<i>Glomus intraradices</i> (100%)	Glomaceae	AF185692
13	<i>Archaeospora</i> sp (94%)	Archaeosporaceae	AY174699
14	<i>Glomus intraradices</i> (96%)	Glomaceae	AF185692
15	<i>Glomus</i> sp (98%)	Glomaceae	AF452626
16	<i>Acaulospora morrowiae</i> (88%)	Acaulosporaceae	AJ242500
Glomaceae specific DGGE			
17	<i>Glomus caledonium</i> (98%)	Glomaceae	GCA17653
18	<i>Glomus mosseae</i> (91%)	Glomaceae	GMSUSMA
19	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (94%)	Glomaceae	AY174691.1
20	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (98%)	Glomaceae	GMA301857
21	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (96%)	Glomaceae	AY174691.1
22	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (96%)	Glomaceae	GMA301857
23	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (95%)	Glomaceae	AY174691.1
24	<i>Glomus coremioides</i> (95%)	Glomaceae	SCO249715
25	<i>Glomus coremioides</i> (96%)	Glomaceae	SCO249715
26	<i>Glomus coremioides</i> (98%)	Glomaceae	SCO249715
27	<i>Glomus</i> sp. 5014b25 (90%)	Glomaceae	AF480158.1
28	<i>Glomus manihotis</i> (93%)	Glomaceae	GMA17648
29	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (96%)	Glomaceae	AY174691.1
30	<i>Glomus</i> sp. clone W3347 (92%)	Glomaceae	GMA301857
31	<i>Glomus</i> sp. 5014b24 (93%)	Glomaceae	AF480157.1
32	<i>Glomus mosseae</i> (98%)	Glomaceae	GMSUSMA
33	<i>Glomus</i> sp. 5014b25 (93%)	Glomaceae	AF480157.1
34	<i>Glomus</i> sp. clone 0171 (95%)	Glomaceae	AY174691.1
Gigasporaceae specific DGGE			
35	<i>Scutellospora cerradensis</i> (85%)	Gigasporaceae	AB048690.1
36,37	Soil clone	-	
38	<i>Gigaspora margarita</i> (100%)	Gigasporaceae	AY442360.1

¹ DGGE bands designation are as labeled in Figure 3, 4 and 5. ² Most related isolate from GenBank by BLAST results

³ Specie belong to Ascomycota order

REFERENCES

- Abbot, A.D. Robson Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Ecosystems and environment*, 35: 121-150, 1991.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaeffer A.A. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402, 1997.
- Alves, V.M.C.; Magalhães, J.V.; Novais, R.F; Bahia F^o, A.F.C., Oliveira, C.A., França, C.C.M. Acúmulo de nitrogênio e de fósforo em plantas de milho afetado pelo suprimento parcial de fósforo às raízes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.23, p. 299-305, 1999.
- Barea J.M., Azco'n R, Azco'n-Aguilar C. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varma S, eds. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 195–212, 2005a.
- Barea JM, Werner D, Azco'n-Aguilar C, Azco'n R. Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbiosis in sustainable agriculture. In: Werner D, Newton WE, eds. *Agriculture, forestry, ecology and the environment*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005b.
- Barea, J-M., Pozo, M. J., Azco'n, R. and Aguilar, C. A. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761–1778, 2005c.
- Cardoso I.M., Kuyper T.W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 116: 72–84, 2006.
- Chellius, K. M.; Triplett, E. W. Rapid detection of arbuscular mycorrhiza in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza*, 9: 61-64, 1999.
- Clapp J.P., Fitter A.H., Young J.P.W. Ribosomal small sub-unit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology*, 8: 915-921, 1999.
- Clapp, J.P., Fitter, A.H., Merryweather, J.W. Arbuscular mycorrhizas. In: Hall, J.S. (Ed.), *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*. CAB International, New York, pp. 145–161, 1996.

Clark, R.B.; Zeto, S.K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biol. Biochem.*, v.28, n.10/11, p. 1505-1511, 1996. and alkaline soil *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1505-1511, 1996.

Creste S., Tullman-Neto, A., Figueira, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrilamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306, 2001.

de 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*, 70: 1413–1424, 2004.

Gianinazzi S, Schu"pp H, Barea JM, Haselwandter K. *Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Basel, Switzerland: Birkha"user Verlag, 2002.

Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989) In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243–255, 1989.

Giovannetti M., Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500, 1980.

Gomes N. C. M, Fagbola O., R. Costa, Rumjanek N. G., Buchner A., Hagler-Mendonca Smalla K. Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3758–3766, 2003.

Gomes N. C. M., H. Heuer J. Scho"nfeld, R. Costa, L. Hagler-Mendonca, and K. Smalla. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 232: 167–180, 2001.

Gosling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113:17–35, 2006.

Helgason T., Daniell T. J., R. Husband, Fitter A. H., Young J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 384:431, 1998.

- Hinsinger, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237: 173-195, 2001.
- Jansa, J., Mozafar, A., Kuhn, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I. R., Frossard, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecology Applied*, 13: 1164–1176, 2003.
- Johnson D, IJdo M, Genney D. R., Anderson I. C. and Alexander I. J. How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? *Journal of Experimental Botany*, 56: 1751–1760, 2005
- Kabir, Z. Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. *Can. Journal Plant Science*, 85: 23–29. *Journal Article Abstracts*. 2005.
- Kaeppler SM, Parke JL, Mueller SM, Senior L, Stuber C, Tracy WF. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal colonization. *Crop Science* 40: 358–364, 2000.
- Koide R. T., Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145–163, 2004.
- Koide RT (2000) Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 147: 233-235, 2000.
- Kowalchuk, G. A., F. A. de Souza, and J. A. van Veen. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11:571–581, 2002.
- Lambais, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St.Paul: American Phytopathological Society Press. pp.46-60, 2000.
- Lynch, J.M.; Whipps, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129:1-10, 1990.
- Ma W.K., Siciliano S.D., Germida J.J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1589–1597, 2005.
- Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn., Academic Press, London. 1995.
- Marschner, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Research* 56, p. 203-207, 1998.

- Mota, F.F., Nóbrega, A., Marriel, I.E., Paiva, E., Seldin, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes planted in Cerrado soil. *Applied Soil Ecology* 20: 119–132, 2002.
- Muyzer, G., and K. Smalla. The need for DGGE and TGGE in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127–141, 1998.
- Õpik M., Moora M., Liira J., Kõljalg U., Zobel M., Sen R. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla spp.* in boreal Scots pine forest and grassland soils *New Phytologist*, 160: 581–593, 2003.
- Parentoni, S. N.; Vasconcellos, C. A.; Alves, V. M. C.; Pacheco, C. A. P.; Santos, M. X.; Gama, E. E. G.; Meirelles, W. F.; Correa, L. A.; Pitta, G. V. E.; Bahia Filho, A. F. C. Eficiência na utilização de fósforo em genótipos de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia, MG. Resumos expandidos. Sete Lagoas: ABMS/EMBRAPA Milho e Sorgo/Universidade Federal deUberlândia, 2000. CD-ROM.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetic Evol* 14 :276–284, 2000.
- Redecker, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, 10:73-80, 2000.
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, 130: 419-427, 1995.
- Simon L., Lalonde M., Bruns T.D. Specific Amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied Environmental Microbiology* 54, 2908-2915, 1992.
- Siqueira, J. O.; Nair, M. G.; Hammerschmidt, R.; Safir, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Knoxville, 10: 63-121, 1991.
- Siqueira, J.O.; Lambais, M.R.; Sturmer, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 5: 12-21, 2002.

Smith, S. E., Smith, A. F., Jakobsen, I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*, 133: 16-20, 2003.

Van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396:69–72, 1998.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, Calif., pp 315–322, 1990.

Wright, D P., Julie D. Scholes, David J. Read and Stephen A. Role European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection *New Phytologist*, 167: 881–896, 2005.

**CAPÍTULO 3 - Diversidade metabólica e genética de bactérias em rizosfera de genótipos
de milho contrastantes para fósforo**

Diversidade metabólica e genética de bactérias em rizosfera de genótipos de milho
contrastantes para fósforo

RESUMO

Diferenças genótípicas na tolerância ao estresse de fósforo no solo por plantas têm sido relacionadas com vários mecanismos de eficiência na aquisição de P, entre estes a interação das plantas com microrganismos do solo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes no uso de fósforo, pelo sistema BIOLOG, utilização de fontes de carbono na Ecoplate e o DGGE, eletroforese em gel de gradiente desnaturante dos fragmentos amplificados dos genes 16S ribossomais de bactérias. Foram coletadas amostras de solo rizosférico de híbridos e linhagens eficientes e não eficientes para fósforo, cultivados em um latossolo vermelho-escuro fase cerrado com baixo e alto teor de P. Amostras de rizosfera de híbridos e linhagens eficientes sob estresse de P analisadas pelo sistema Biólogo, tenderam a se agrupar conforme a análise de componentes principais, indicando que os microrganismos tiveram utilização semelhante de fontes de carbono, principalmente carboidratos. Uma maior diversidade genética e metabólica foi encontrada nas amostras de solo rizosférico de milho sob estresse de P. Não ocorreram diferenças na diversidade bacteriana entre genótipos eficientes e ineficientes no uso de P analisada pelo DGGE. Com base no seqüenciamento dos fragmentos do 16S rDNA provenientes das bandas do DGGE foi verificado que a rizosfera de genótipos de milho sob estresse de P no solo parece selecionar bactérias da subdivisão Gammaproteobacteria, da ordem Desulfuromonales, gênero *Ruminococcus* e a espécie *Bacillus algicola*. O teor de P no solo influenciou mais fortemente a estrutura populacional genética e metabólica de bactérias da rizosfera de plantas que a eficiência a fósforo.

Palavras-chave: BIOLOG (Ecoplates), DGGE, *Zea mays*

Bacterial diversity in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus acquisition efficiency as determined by BIOLOG and DGGE methods

ABSTRACT

Genotype-specific microbial community composition in the rhizosphere has been known to influence P acquisition efficiency and the capacity of plants to grow in soil with low P availability. This study reports on the use of Biolog system, a sole carbon source tests (BIOLOG™ Ecoplate), and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S ribosomal DNA (rDNA) fragments to characterize bacteria communities in maize rhizosphere soil. Rhizosphere soil samples of maize genotypes contrasting for phosphorus acquisition efficiency were collected in a corrected and low P (oxisol red latosol). Bacterial populations collected from the rhizosphere soil of the P efficient maize genotypes were clearly distinct from the bacterial populations from the inefficient maize genotypes and had distinct patterns of substrate utilization. The main discriminating substrates were mainly carbohydrates. The greatest genetic and metabolic diversity was found in the low P treatment. Microbial diversity analyzed by DGGE did not differ between P efficient and inefficient maize genotypes. Based on the sequence similarity of the 16S rDNA fragment revealed by DGGE with the database, it was shown that the rhizosphere of maize genotypes growing at low P soils seemed to select the Gammaproteobacteria Filo, the Desulfuromonales order, the Ruminococcus genus and the *Bacillus algicola* specie. The level of P in the soil had a greater influence on the genetic and metabolic diversity of the rhizosphere bacteria community than the maize genotypes contrasting for P acquisition efficiency.

Key word: BIOLOG (Ecoplates), PCR-DGGE, bacteria metabolic and genetic diversity, maize

INTRODUÇÃO

Uma combinação de práticas de manejo do solo e da biologia deste, associadas ao uso de cultivares eficientes, constituem tecnologias importantes para uma agricultura sustentável. A tolerância de alguns cultivares aos estresses nutricionais, principalmente de fósforo, pode estar relacionada com a ocorrência de determinados microrganismos na rizosfera das plantas (Hinsinger, 2001; Marschner, 1995, Marschner et al., 2006). Comparado com a maioria dos outros nutrientes, o fósforo é o nutriente menos móvel no solo e menos disponível para as plantas, sendo que a sua deficiência no solo de cerrado, tem sido um fator limitante para o crescimento da planta de milho. Quando as plantas crescem em um meio deficiente em fósforo, as raízes podem excretar substâncias funcionais, que constituem um importante mecanismo adaptativo à variação de fósforo no ambiente (Li et al., 1997, Marschner, 1995; Li et al., 2004; Marschner et al., 2006). A quantidade e qualidade dos exsudatos liberados pela raiz também alteram a química do solo e influenciam a comunidade bacteriana que coloniza a rizosfera utilizando estes exsudatos como fonte de carbono (Lynch & Whipps, 1990; Marschner, 1995; Grayston et al., 1998, Baudoin et al., 2001). A composição destes exsudatos pode variar com a idade e o genótipo da planta, com o metabolismo, com a condição nutricional, dependendo do estresse e de outros fatores ambientais (Lynch & Whipps, 1990; Liu et al., 2004; Barea et al., 2005).

A composição da comunidade microbiana na rizosfera pode afetar a disponibilidade de P para as plantas (Marschner et al., 2006). Com o aumento da ênfase nas práticas agrícolas de baixos insumos, tem havido crescente interesse no manejo das comunidades microbianas do solo para promover aumento do crescimento das plantas. No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos com relação à população microbiana rizosférica em cultivares de milho que demonstram eficiência na adaptabilidade a condições de estresse de fósforo.

O conhecimento sobre a estrutura e função dos microrganismos associados às plantas agrícolas tropicais ainda é incipiente. Essa limitação, em parte, seria em razão de dificuldades metodológicas de identificação de microrganismos e da incapacidade de se isolar populações representativas. Além disso, somente uma pequena percentagem dos microrganismos do solo pode ser cultivada em laboratório (0,1-20%) (Torsvik et al., 1990) e os que conseguem crescer em meios de cultura não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio de origem natural (Muyzer & Ramsing, 1995; Nannipieri et al., 2003). Neste contexto, métodos que avaliam a diversidade metabólica e métodos moleculares têm sido utilizados a fim de alcançar um maior número de espécies e avaliar mais adequadamente a estrutura da comunidade microbiana (Kirk et al., 2004). Dentre eles podemos citar a diversidade funcional com o sistema 'Biolog' que usa diferentes fontes de carbono para produzir um padrão metabólico dos microrganismos pela medição da intensidade de utilização destes substratos (Garland & Mills, 1991) e métodos moleculares como a análise do rDNA 16S para bactérias a partir da amplificação por PCR (reação em cadeia da RNA polimerase) e o DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante). Esta última técnica permite identificar polimorfismo nos fragmentos de mesmo tamanho do DNA obtido a partir de amostras da microbiota do solo (Muyzer et al., 1993).

O objetivo desse trabalho foi de estudar as variações da diversidade funcional e genética de microrganismos totais da rizosfera de cultivares de milho eficientes e ineficientes no uso de fósforo, em ambientes com alta e baixa disponibilidade deste elemento, utilizando-se o sistema BIOLOG e o DGGE.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo rizosférico foram coletadas em um latossolo vermelho-escuro fase cerrado, durante o início da fase de florescimento do milho. Os experimentos de campo foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas, MG, em delineamento inteiramente

casualizado, com três repetições. As amostras de solo rizosférico foram constituídas da porção de solo aderida à raiz de 5 plantas de cada híbrido e linhagem de milho, eficientes (E) e ineficientes(I) para fósforo, em locais de adubação diferenciada de fósforo: 29 mgP.dm⁻³ (alto P) e 3mgP.dm⁻³ (baixo P). Os híbridos foram: HT (E), HS1 (E), HS2 (E), HS3 (I), HS4 (I); as linhagens L3 (E), L228 (E), L22 (I). Coletaram-se também outras amostras para comparação: solo não rizosférico da área de baixo fósforo(NR), solo não rizosférico da área de alto fósforo (NRP), solo da rizosfera do híbrido triplo em plantio direto (HT E PD), solo não rizosférico do plantio direto (NRD) e vegetação natural de cerrado (MATA). O solo da área experimental possuía as seguintes características: textura argilosa (55% argila, 11% silte, 34% areia), pH 5.2 (relação solo/água, 1:2.5 [vol/vol]), matéria orgânica (3%); Al (0.25), Ca (2.29), Mg (0.36) cmolc. Kg⁻¹ (peso seco) de solo (1 N KCl extractor) e 0.16 mg dm⁻³ de K (Mehlich I). Amostras de solo para extração de DNA foram mantidas a -20°C.

Diversidade metabólica

Para determinação da diversidade funcional microbiana foi utilizada a metodologia descrita por Zak et al. (1994). Amostras de solo foram suspensas em 90mL de solução salina (0.85 % NaCl) e agitadas durante 30min, a 150rpm. Cerca de 5 mL desta suspensão foram centrifugados a 4000rpm durante 15 minutos. Alíquotas de 120µL do sobrenadante foram transferidas para cada cavidade de placas “Ecoplates” ® (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) que foram incubadas no escuro durante 5 dias, a 25°C. Cada placa continha, três grupos iguais de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), além do controle, cavidade sem substrato. A leitura das placas, ou seja, o desenvolvimento de cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos, foi realizada por um espectrofotômetro leitor de placas (Labstems, MultSkán, MS) em 405nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os componentes da diversidade funcional, atividade total, diversidade metabólica – Shannon index (H), utilização de substratos (S), foram

estimados de acordo com Zak et al., 1994. Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se AWCD (Average Well Colour Development - média das leituras dos 31 substratos de cada amostra e repetição) de acordo com Garland & Mills (1991). Os valores acima de zero foram considerados como reação positiva, que evidenciam a utilização de substratos e os valores negativos ausência de uso do substrato.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento inteiramente casualizado e teste Tukey para detectar diferenças entre as médias. Os dados de utilização de substratos (S) e atividade total (transformada) foram utilizados para análise de agrupamento (UPGA- Unweigh Pair-Group Average) utilizando o coeficiente de distancia euclidiana e análise de componentes principais (PCA) através do software Statistica (versão 6.0).

Diversidade genética da população de bactérias pelo DGGE

O DNA total da população de bactérias foi extraído a partir de 500mg de solo de todas amostras descritas acima, utilizando-se o protocolo descrito pelo "Fast Kit DNA for soil" (Qbiogene, BIO 101 Systems, Carlsbad, CA, USA). Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando-se os iniciadores universais para bactérias, F968 e R1401 (Nu"bel et al., 1996). A reação de amplificação (PCR) continha um total de 50 μ L, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2,5 μ L de tampão de magnésio (Invitrogen), 50 μ M de cada dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 0,5 μ L de formamida deionizada e 0,2 μ M de cada iniciador. O PCR foi realizado em um termociclador Perkin-Elmer 9700 usando-se o seguinte programa: 94°C por 2 minutos, seguido de trinta ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram aplicados em gel contendo 6% de poliacrilamida, com gradiente de desnaturantes de 45% a 65%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes (uréia e formamida deionizada). A eletroforese foi realizada em uma unidade de DGGE da Biorad

(Richmond, USA) durante 16 h a 60°C e 70V em tampão TAE 1X. Após a eletroforese o gel foi corado com prata de acordo com a metodologia descrita por Creste et al. (2001) e fotografado em câmera digital. Como DNA controle do DGGE, foram utilizadas as espécies de bactérias: *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum sp*, *Bacillus thuringiensis*.

Após o DGGE, os padrões de bandas obtidos foram comparados usando a mesma análise de agrupamento do item anterior.

Identificação das bandas de DGGE

As bandas importantes foram eluídas do gel de DGGE e reamplificadas via PCR para posterior identificação de espécies. O produto do PCR foi aplicado em um gel de agarose 1.5% (p/v), corado com brometo de etídio (1 µg ml⁻¹) e visualizados em um transluminador de UV Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). O produto de PCR foi extraído do gel e purificado utilizando-se o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany), em seguida seqüenciados com o kit "Big Dye Terminator" v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN com o banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e o programa Seqmatch com o banco de dados RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ecologia microbiana envolve tanto o estudo da estrutura quanto o da função de cada grupo microbiano em um ecossistema. Avaliações representativas de comunidades microbianas não só devem considerar a abundância e distribuição de espécies mas também a diversidade funcional presente em uma comunidade microbiana. Neste trabalho, a atividade de utilização dos substratos medida pelo desenvolvimento de cor (expressa em AWCD), foi diferente ao

longo do tempo de incubação para cada amostra de extrato microbiano (Figura 1). A partir de 48 horas de incubação, já apareceram distinções entre os extratos microbianos das rizosferas.

Observou-se que os extratos microbianos da rizosfera dos híbridos HS1(E) e HS2 (E) cultivados em condições de baixo teor de P no solo, apresentaram atividade de utilização dos substratos maior que os demais, durante o período de incubação das amostras (Figura 1-A). Em estudo realizado sob condições de casa de vegetação, Brasil (2003) obteve resultados semelhantes de atividade metabólica microbiana na rizosfera destes mesmos genótipos, o que permite sugerir que essa característica é inerente ao híbrido. As linhagens consideradas como eficientes para o uso de P também apresentaram maior atividade de utilização de substratos (Figura 1-B) em baixo P (P1). No entanto, o solo rizosférico da linhagem L22 (I) apresentou a mesma diversidade de microrganismos (H- Shannon index) em condições estressantes de P no solo (Tabela 1), significando que os microrganismos da rizosfera de linhagens eficientes utilizaram os mesmos substratos que os da linhagem ineficiente, porém com maior intensidade de utilização demonstrada pelo desenvolvimento de cor. Estudos anteriores mostraram correlação entre densidade de células e a taxa de desenvolvimento de cor (Garland & Mills, 1991). Segundo Marschner (1995) a alta taxa de liberação de carbono orgânico pelas raízes favorece o aumento da densidade populacional de microrganismos na rizosfera, especialmente de bactérias, em relação ao restante do solo. Portanto, pode-se sugerir que na rizosfera de L3 (E) e L228 (E) ocorreu maior liberação de fontes de carbono que favoreceram um maior

O Índice de diversidade de Shannon (H), calculado com base na capacidade de utilização de fontes de carbono das diferentes comunidades microbianas, indica uma maior diversidade para amostras com maior riqueza de utilização de diferentes fontes de carbono. A escala de H para as placas do tipo Ecoplate varia de 0 a 4 (Zak et al., 1994). Na rizosfera dos genótipos estudados as amostras coletadas revelaram valores de H próximos de 3, verificando-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre genótipos eficientes e ineficientes e entre níveis de P

para cada cultivar. A diversidade microbiana medida pelo índice de Shannon (H) nos solos não rizosféricos (NR e NRP) foi menor principalmente em alto P (Tabela 1). Houve efeito rizosférico sobre a diversidade de espécies de bactérias para todos os genótipos em baixo P, exceto para HS4 (I). De maneira geral, amostras de solos em alto P tiveram menor diversidade comparado às de baixo P, independente do genótipo (Tabela 1), evidenciando que a dosagem de P no solo influenciou a redução do número de espécies de bactérias nestes ambientes. Para o híbrido HT (E) isto não ocorreu, a atividade metabólica de utilização de fontes de carbono e diversidade de microrganismos foi maior em P2. Pelos resultados obtidos, verificou-se uma tendência de alteração do perfil metabólico microbiano na rizosfera dos genótipos de milho submetidos a baixos níveis de P (Figura 1, Tabela 1), modificando a atividade e as fontes de carbono utilizadas pelos microrganismos. Como ocorreu com a atividade total, o maior índice de diversidade bacteriana encontrado nos híbridos eficientes para fósforo pode estar associado ao maior acúmulo de diferentes tipos e intensidades de fontes de carbono na região rizosférica devido ao estresse de fósforo no solo.

A análise do perfil metabólico da rizosfera das plantas nos diferentes tratamentos (Figura 2) foi efetuada com a leitura de 72 horas, bem como o cálculo da diversidade metabólica (Tabela 1). Dependendo de sua origem, as comunidades microbianas tiveram perfil distinto de utilização das fontes de carbono, como revelou a análise de agrupamento (Figura 2). A comunidade microbiana proveniente da rizosfera do híbrido HT em plantio direto (HT E PD) foi distinta da rizosfera deste em plantio convencional (HT e HTP), revelando o efeito do tipo de cultivo sobre a diversidade funcional das bactérias na rizosfera de milho. Ocorreu a formação de dois grupos principais, onde em “I” houve um agrupamento de solos rizosféricos provenientes de alta adubação de P. Em “II” houve predomínio dos solos em baixo P da rizosfera de genótipos eficientes, principalmente em II-b, onde se agruparam com a mata, sítio de alta diversidade microbiana. No gráfico de PCA (Fig. 3-A) para as amostras avaliadas

observamos que o primeiro componente respondeu por 28% da variação, o segundo por 16% e o terceiro por 14%, com 6 componentes principais respondendo por 80% da variação. No gráfico da figura 3-B o total de componentes respondeu por 83% da variação. Amostras de rizosfera de híbridos (HT e HS2) e linhagens eficientes (L3 e L228) tenderam a se agrupar (Figura 3-A, 3-B), indicando que os microrganismos pertencentes a estas amostras tiveram utilização semelhante de fontes de carbono. Exsudatos radiculares destes genótipos podem ter alterado a composição de espécies de bactérias em suas rizosferas. No entanto, L3, L228 e HT, HS2 formaram perfil microbiano totalmente distinto quando sob alta dose de P. O teor de P no solo influenciou a estrutura populacional de bactérias na rizosfera de genótipos de milho contrastantes para fósforo mais que a eficiência na utilização deste elemento. O solo não rizosférico (NR) foi separado das demais amostras pelo primeiro componente (Factor 1 ou PCA 1) nos dois gráficos com relação ao perfil metabólico formado pela utilização diferenciada de fontes de carbono, confirmando os dados de diversidade (Tabela 1).

Considerando a diferente utilização de fontes de carbono por cada comunidade bacteriana de cada genótipo, pode-se sugerir que a população microbiana parece ter sido favorecida pela exsudação de substâncias radiculares das plantas sob estresse de fósforo. Autores como Campbell et al. (1997) e Baudoïn et al. (2003) tem ressaltado que as fontes contidas na Ecoplate (Biolog) são representativas das fontes de carbono exsudadas pelas raízes na rizosfera. Neste estudo, bactérias de híbridos e linhagens eficientes em baixo P apresentaram maior utilização de carboidratos enquanto os ineficientes, maior utilização de ácidos carboxílicos (málico, galactônico, láctico, pirúvico, benzóico). Grayston et al. (1998), avaliando o solo rizosférico de raízes de trigo, trevo e centeio, verificaram que houve uma clara discriminação entre as fontes de carbono utilizadas pelas comunidades microbianas da rizosfera de diferentes plantas. Carboidratos, ácidos carboxílicos e aminoácidos foram os principais substratos responsáveis por essa discriminação, sugerindo que as plantas podem

diferir na exsudação desses compostos, principalmente sob estresse nutricional como aqui encontrado. Garland (1996) também observou distintos padrões de utilização de fontes de carbono na rizosfera de plantas de soja, trigo, batata doce e batata branca. Em milho, pouco se conhece sobre a quantidade e qualidade dos exsudatos radiculares em genótipos eficientes no uso de P em condições de baixa disponibilidade deste elemento (Liu et al., 2004). Alguns autores encontraram maior exsudação de ácidos orgânicos quando os genótipos de milho eficientes foram submetidos à condições de estresse de P (Gaume et al., 2001) enquanto que em outros estudos foi verificado uma redução da produção de ácidos orgânicos (Liu et al., 2004). Baudoin et al. (2001) observaram que o perfil discriminatório entre as amostras de solo não rizosférico e rizosférico das fontes de carbono foi baseado no maior consumo de ácidos carboxílicos > carboidratos > aminoácidos > amidas.

Os resultados do DGGE com relação ao número e intensidade de bandas no gel sugerem a existência de uma maior diversidade genética da população bacteriana nas amostras de solo rizosférico de principalmente linhagens de milho sob estresse de P, indicando que modificações na rizosfera sob baixas concentrações de P podem estar favorecendo certas comunidades bacterianas (Figura 4-I; Figura 4-II). Algumas bandas, identificadas como bactérias da subdivisão Gammaproteobacteria, da ordem Desulfuromonales, gênero *Ruminococcus* e a espécie *Bacillus algicola*, bandas A, C, H e J respectivamente (Figura 4, Tabela 2) aparecem na rizosfera de genótipos do solo com estresse de fósforo e desaparecem sob alto P. Este aparecimento de novos grupos de bactérias pode estar relacionado com mudanças na rizosfera destes genótipos ocasionadas pelo estresse de fósforo. Foi também observado maior intensidade de algumas bandas nas amostras de genótipos sob baixo P (banda C, Figura 4-I), indicando uma maior abundância de bactérias da ordem Desulfuromonales (Tabela 2) nesta condição de fósforo no solo. Diferenças na composição da comunidade microbiana entre genótipos de plantas estão geralmente relacionadas com diferenças na

composição e quantidade de exsudatos radiculares (Marschner et al., 2006). Isto foi recentemente evidenciado por Baudoin et al (2003) e Benizri et al. (2002), que, em estudos sobre o efeito da aplicação direta de exsudatos radiculares de milho sobre a microbiota, constataram mudanças na estrutura populacional de espécies de bactérias.

No dendrograma construído com base no padrão de bandas de DGGE da rizosfera de linhagens, observou-se a formação de um grupo distinto, a 2,0 pontos de distância genética, contendo o solo rizosférico das linhagens eficientes e ineficientes cultivadas em solos com baixo teor de P e o solo de mata de cerrado, considerado como de alta diversidade (Figura 4-I). observou-se também, no dendrograma, que o perfil genético da comunidade bacteriana do solo não rizosférico com baixo P (NR) foi distinto da população bacteriana na rizosfera das linhagens nesta mesma condição de P no solo, indicando que houve efeito rizosférico destes genótipos, dependendo do teor de P no solo.

Não ocorreram diferenças na diversidade microbiana entre a rizosfera de genótipos eficientes e não eficientes (Figura 4-I e 4-II), sugerindo que o teor de fósforo no solo foi o fator determinante da diferença na estrutura da população bacteriana total da rizosfera de genótipos de milho contrastantes no uso de fósforo. Esta ausência de diferença genotípica para análise de DGGE baseado na amplificação via PCR de fragmentos da região 16S do DNA ribossomal também foi encontrada por Silva et al. (2003), Gomes et al. (2001), Mota et al. (2002, 2005) que estudaram a diversidade e dinâmica de comunidades bacterianas na rizosfera de cultivares de milho em cerrado brasileiro usando TGGE e DGGE. Estes autores observaram que as diferenças ocorreram mais entre os estádios de crescimento da plantas, entre tipos de solo e condições de estresse mineral no solo, que entre genótipos. Por outro lado, semelhanças na composição da comunidade bacteriana de amostras de solo rizosférico de genótipos eficientes para fósforo em condições estressantes de fósforo no solo foram observadas na análise de componentes principais do perfil metabólico (Figura 3) indicando que pode ter ocorrido

mudanças nas densidades populacionais de grupos específicos metabolicamente ativos sem alteração da densidade total.

Como o PCR-DGGE da região 16S avalia somente a comunidade bacteriana predominante existente na rizosfera (Muyzer & Ramsing, 1995), metabolicamente ativa ou não (Prosser et al., 2002), mudanças no perfil metabólico de cada espécie podem ter sido responsáveis pelas diferenças constatadas na análise de Biolog entre genótipos eficientes e ineficientes. Entretanto o uso de Biolog, tem também sido questionado por gerar “fingerprints” de apenas uma fração da comunidade representada pelos microrganismos de crescimento mais rápido e que são cultiváveis, refletindo o potencial metabólico e não a diversidade “in situ” (Nannipieri et al., 2003; Kirk et al., 2004). Portanto, os resultados encontrados ressaltam a importância da utilização das duas técnicas em conjunto como também sugerido por outros autores (Baundoin et al., 2001; Kirk et al., 2004), uma vez que por meio do DGGE foi possível avaliar grupos bacterianos não cultiváveis nas condições de meio de cultura e placa de Biolog, possibilitando maior entendimento da interação microrganismo-planta. Estudos futuros com o uso de iniciadores (primers) específicos de gêneros ou espécies poderão ser realizados para o refinamento da análise de DGGE.

A análise das bandas de DGGE mostrou que a maioria dos grupos bacterianos das amostras de genótipos de milho contrastantes para fósforo pertencem ao Filo Proteobacteria, principalmente à subdivisão gama (Tabela 2). Esses resultados sugerem que este grupo desempenha papel importante no desenvolvimento destes cultivares nos solos de cerrado, onde a deficiência de fósforo é um dos fatores predominantes. Além disso, sabe-se que este grupo contém representantes dos gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, entre outros, que são conhecidos como promotores de crescimento vegetal e atuam no controle biológico de doenças de plantas (Rodríguez & Fraga, 1999).

CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados do presente estudo mostram que o efeito do estresse de P no solo sobre a composição da comunidade bacteriana da rizosfera de cultivares de milho pode ser detectado usando técnicas de avaliação da diversidade funcional e genética. A técnica de Biolog foi mais eficiente que o DGGE em detectar as diferenças na estrutura da população rizosférica de bactérias entre genótipos eficientes e ineficientes no uso de P.

O teor de fósforo no solo influenciou a estrutura da comunidade bacteriana na rizosfera de cultivares de milho mais que o genótipo e ou eficiência no uso de fósforo, sendo observada maior diversidade genética e metabólica nas amostras de solo rizosférico de milho sob estresse de P, independente do genótipo, indicando que modificações na rizosfera sob baixas concentrações de P podem estar favorecendo certas comunidades bacterianas. Microrganismos de amostras de rizosfera de híbridos e linhagens eficientes sob estresse de P apresentaram utilização semelhante de fontes de carbono, principalmente carboidratos.

Algumas bandas, identificadas como de bactérias da subdivisão Gammaproteobacteria, da ordem Desulfuromonales, gênero *Ruminococcus* e a espécie *Bacillus algicola*, foram observadas somente na rizosfera de genótipos sob estresse de fósforo. O grupo Proteobacteria foi predominante entre as bactérias associadas aos genótipos de milho avaliados em solo mde cerrado. Diferenças na composição da comunidade microbiana na rizosfera podem também contribuir para o aumento da capacidade de plantas de crescerem em solos com baixa disponibilidade de fósforo como os do cerrado brasileiro.

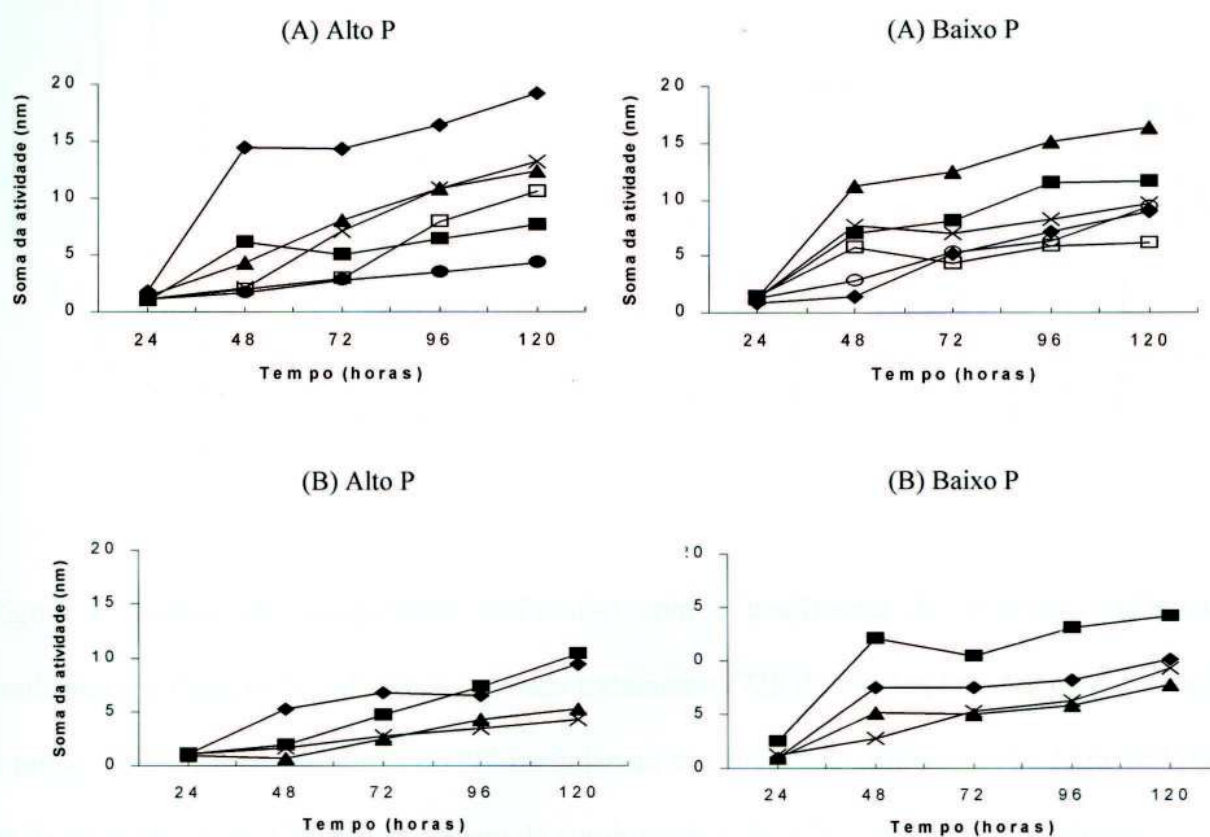


Figura 1. Soma da atividade total de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico em alto teor de fósforo no solo (alto P) e baixo teor de P (baixo P) dos genótipos eficientes (E) e ineficientes (I) e testemunhas. Os Híbridos (A): HT (E) ◆, HS1 (E) ■, HS2 (E) ▲, HS3 (I) X, HS4 (I) □, NRP (solo não rizosférico em alto P) ● e NR (solo rizosférico em baixo P) ○. As Linhagens (B): L3 (E) ◆, L228 (E) ■, L22 (I) ▲, e testemunhas NRP e NR, X.

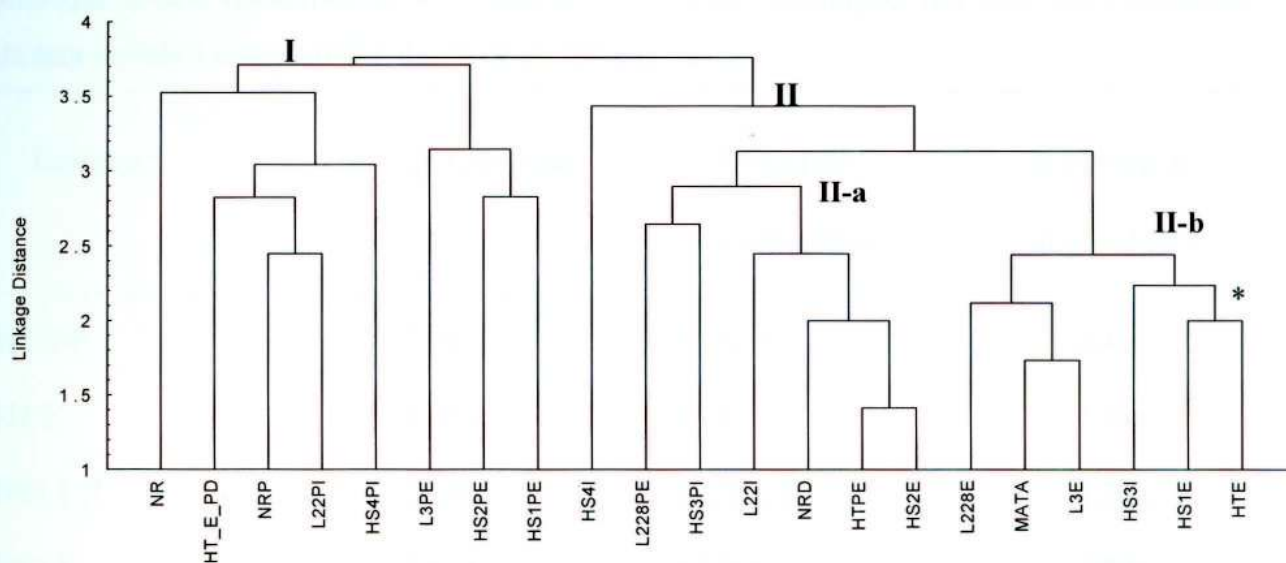


Figura 2. Análise de agrupamento (UPGMA) com o coeficiente de distancia euclidiana, conforme a utilização de substratos em cada tratamento (72h de incubação). *A letra “E” após o nome simbolizando eficiência ou “I” ineficiência dos híbridos e linhagens e a letra “P” para os do nível alto de P. Utilizou-se a regra de combinação UPGMA e distancia Euclidiana.

Tabela 1. Diversidade metabólica (Índice de Shannon - H) em 72 horas de incubação para amostras de solo rizosférico de 5 híbridos de milho (H) e 3 linhagens (L), solo não rizosférico da área de baixo fósforo (NR), de alto P (NRP) e mata

Híbridos ²	H (índice de diversidade)	Linhagens e testemunhas ²	H (índice de diversidade)
HT E P	3,09a	L3 E P	2,42b
HT E	2,80a	L3 E	2,74a
HS1 E P	2,33b	L228 E P	2,70a
HS1 E	2,81a	L228 E	2,80a
HS2 E P	2,77a	L22 I P	2,00b
HS2 E	2,98a	L22 I	2,57a
HS3 I P	2,67a	NR P	1,93b
HS3 I	2,74a	NR	2,38b
HS4 I P	2,28b	Mata	2,90a
HS4 I	2,25b		

¹ médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey de médias, $p < 0,05$.

² solo rizosférico do genótipos em nível alto de P indicado pela letra P e em baixo P, sem a letra P. A letra E indica os genótipos eficientes no uso de P, os demais são considerados como ineficientes (I).

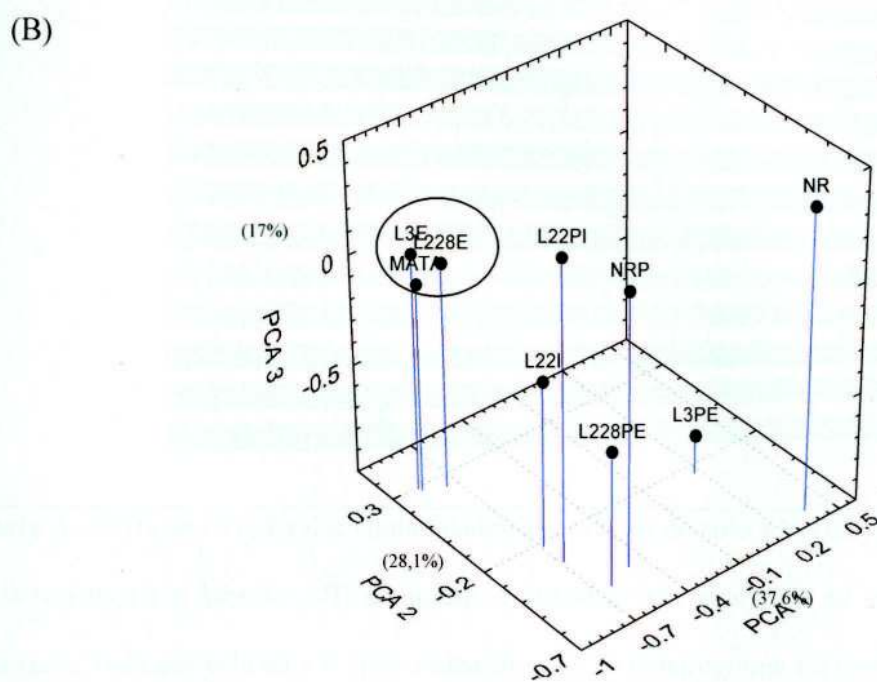
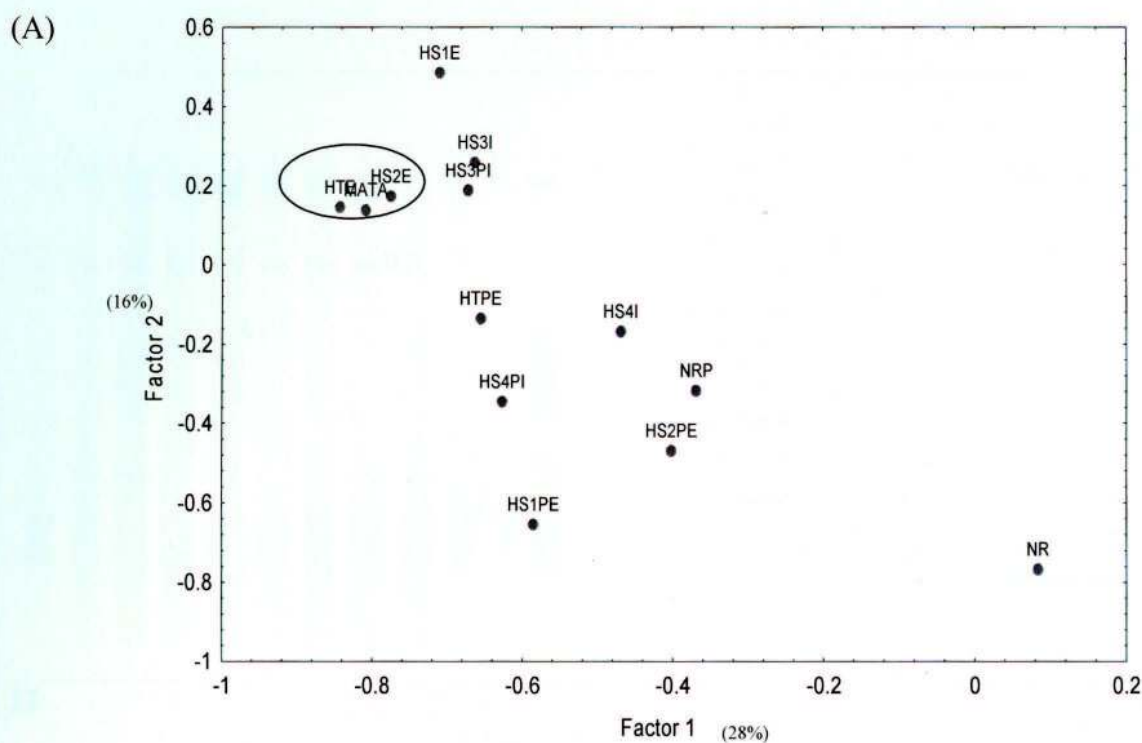


Figura 3. Análise bidimensional dos híbridos (A) e análise tridimensional das linhagens (B) por componentes principais (PCA) conforme a utilização de substratos após 72 horas de incubação. A letra “P” após o nome do genótipo indica o nível alto de P e a letra “E” indica os genótipos que são eficientes para P.

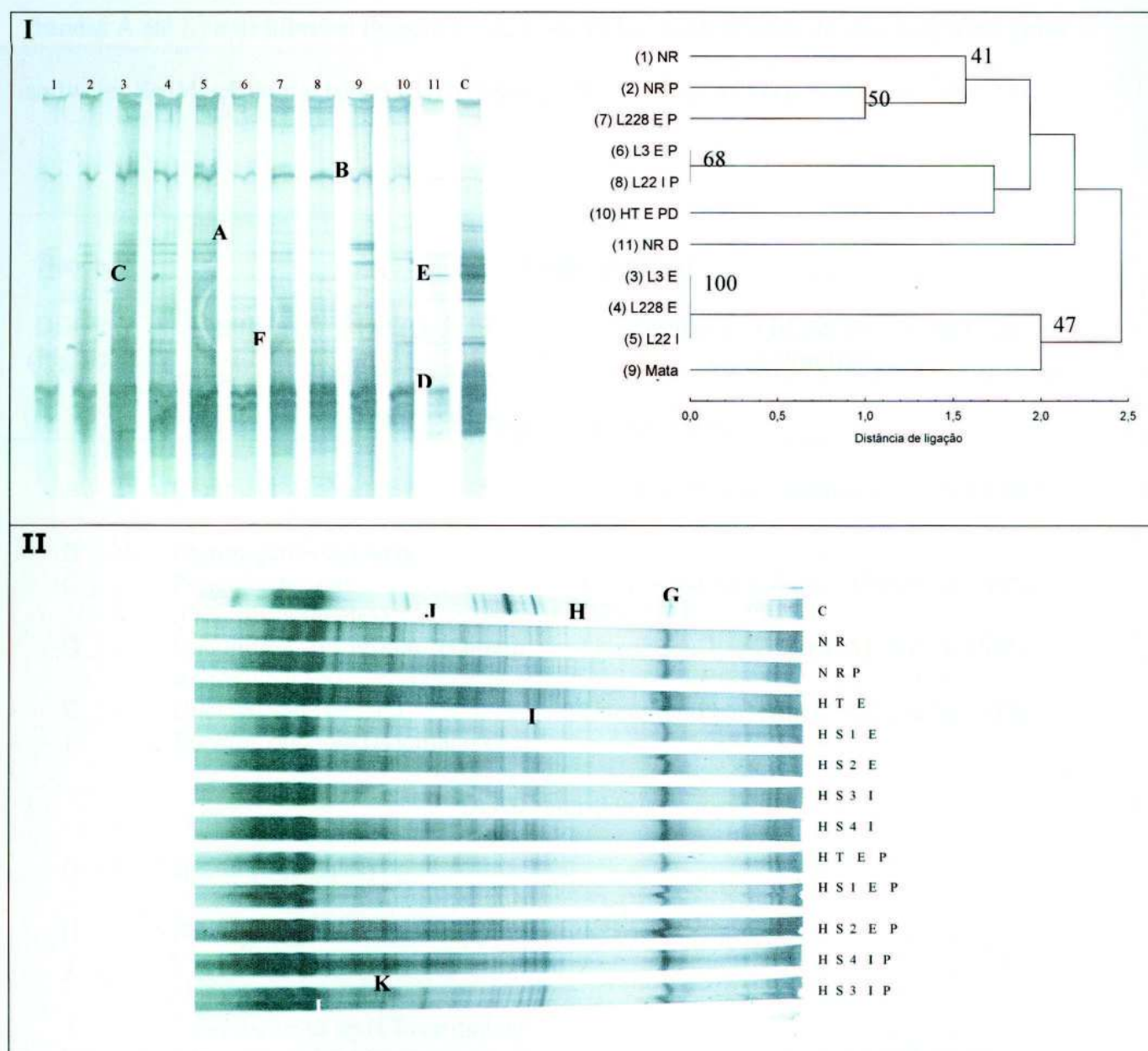


Figura 4. Perfis de DGGEs das comunidades bacterianas do solo não rizosférico e de solo rizosférico de linhagens (I) e híbridos (II) de milho, cultivadas sob condições de estresse por fósforo e não estressante indicada pela letra P após a identificação. O dendrograma foi construído pelo coeficiente de distância euclidiana e o método de UPGMA. As fileiras C contêm os controles do DGGE com DNA puro de bactérias, Mata contém amostras de solo de uma mata virgem de cerrado, NR e NRP, solo não rizosférico em parcelas de baixa e alta concentração de fósforo no solo. As bandas relacionadas nos géis de DGGE foram seqüenciadas e suas identificações são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação das bandas reamplificadas das amostras de DGGE obtidas de linhagens (bandas A até E) e de híbridos (bandas G até L) de milho contrastantes no uso de fósforo pelos softwares SeqMatch com o banco RDP (Ordem) e BlastN com o banco NCBI (primeiro hit)

Banda de DGGE (Fig. 4) ¹	Grupo genético	
	Identificação RDP (Ordem) ²	Identificação BLASTN / Número de acesso/Similaridade ³
DGGE Linhagens e testemunhas		
A	Gammaproteobacteria	Uncultured soil bacterium / AY326587 / 98%
B	Gammaproteobacteria	-
C	Proteobacterium (Desulfuromonales)	Uncultured bacterium / AF269005 / 89%
D	Uncultured bacterium (Ordem Anaerolineales)	Uncultured bacterium / AJ536876 / 88%
E	Unclassified Bacteria	Uncultured bacterium / AJ536876 / 93%
F	<i>Bacillus algicola</i> (Bacillales)	-
DGGE híbridos		
G	Bacilli (Bacillales)	-
H	<i>Bacillus algicola</i> (Bacillales)	-
I	Uncultured bacterium (Aquificales)	-
J	<i>Ruminococcus</i> sp (Clostridiales)	-
K	Alpha proteobacterium (Rickettsiales)	-
L	Unclassified Bacteria	Uncultured bacterium / AJ536876.1 / 90%

¹ Bandas de DGGE relacionadas nos géis da Figura 4

² Resultado do primeiro "hit" das sequências no banco de dados NCBI e programa BLASTN, acesso em 02/01/2007

³ Resultado mais provável de classificação das sequências no banco de dados RDP com o programa Seqmatch.

REFERÊNCIAS

- BAREA, J.-M., POZO, M. J., AZCO'N, R. E AGUILAR, C. A.-. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761–1778, 2005.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology*, 37: 85-93, 2001.
- BAUDOIN E, BENIZRI E AND GUCKERT A Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1183–1192. 2003.
- BENIZRI, E., DEDOURGE, O., DIBATTISTA-LEBOEUF, C., PIUTTI, S., NGUYEN, C., GUCKERT, A. Effect of maize rhizodepositis on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, 21: 261-265, 2002.
- BRASIL, E. C. Mecanismos envolvidos na eficiência de aquisição de fósforo em genótipos de milho. – Lavras : UFLA, 2003. 161p. Tese (Doutorado) – UFLA.
- CAMPBELL, C.D., GRAYSTON, S.J., HIRST, D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 33-41, 1997.
- CRESTE S., TULLMAN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrilamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306, 2001.
- GARLAND, J.L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecology*, 24: 289–300, 1997.
- GARLAND, J.L. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 223-230, 1996.
- GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-solo-carbon-source-utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2351-2359, 1991.
- GAUME A., MACHLER, F., LÈON, C.D., NARRO, L., FROSSARD, E. Low-P tolerance by maize genotypes: significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant Soil*, 228: 253-264, 2001.
- GOMES, N. C. M., H. HEUER, J. SCHO'NFELD, R. COSTA, L. HAGLER-MENDONCA, AND K. SMALLA.. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 232:167–180, 2001.

- GOMEZ, E., BISARO, V. , CONTI, M., Potencial C-source utilization patterns of bacterial communities as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. *Applied Soil Ecology*, 15: 273–281, 2000.
- GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology*, 16: 1031-1038, 1996.
- GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 369-378, 1998.
- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rizhosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237: 173-195, 2001.
- KIRK, J.L., BEAUDETTE, L.A., HART. M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J.N., LEE, H., TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188, 2004.
- LI, M.; SHINANO, T.; TADANO, T. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 237-245, 1997.
- LI, O., ALLEN, H.L., WOLLUM, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 571-579, 2004.
- LIU, Y., MI, G., CHEN, F., ZHANG, J., ZHANG, F. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Science*, 167: 217-223, 2004.
- LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129:1-10, 1990.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of hight plants. Academic Press, San Diego, C.A. 889p. 1995.
- MARSCHNER P, SOLAIMAN Z, RENGEL Z. (2006) Rhizosphere properties of Poacea genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283:11-24.
- MOTA, F.F., NÓBREGA, A., MARRIEL, I.E., PAIVA, E., SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes planted in Cerrado soil. *Applied Soil Ecology*, 20: 119– 132, 2002.

- MOTA, F. F.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Análise das comunidades bacterianas presentes nas rizosferas de variedades de milho sensíveis e tolerantes ao alumínio plantadas em solo de cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26.; 2006, Belo Horizonte, Inovação para sistemas integrados de produção: resumos. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. p. 91.
- MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science Technology*, 32: 1-9, 1995.
- NANNIPIERI, P., ASCHER, J., CECCHERINI, M.T., LANDI, L., PIETRAMELLARA, G., RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670, 2003.
- NUBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 5636– 5643.
- PROSSER, J.I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 244: 9-17, 2002.
- RODRIGUES H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339, 1999.
- SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F. ; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE methods and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 213-231, 2003.
- STADDON, W.J.; DUCHESNE, L.C.; TREVORS, J.T. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by Sole-Carbon-Source utilization patterns. *Microbial Ecology*, 34:125-130, 1997.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L.. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 78-787, 1990.
- ZAK, J.C.; WILLING, M.R.; MOOREHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 1101-1108, 1994.

CONCLUSÃO GERAL

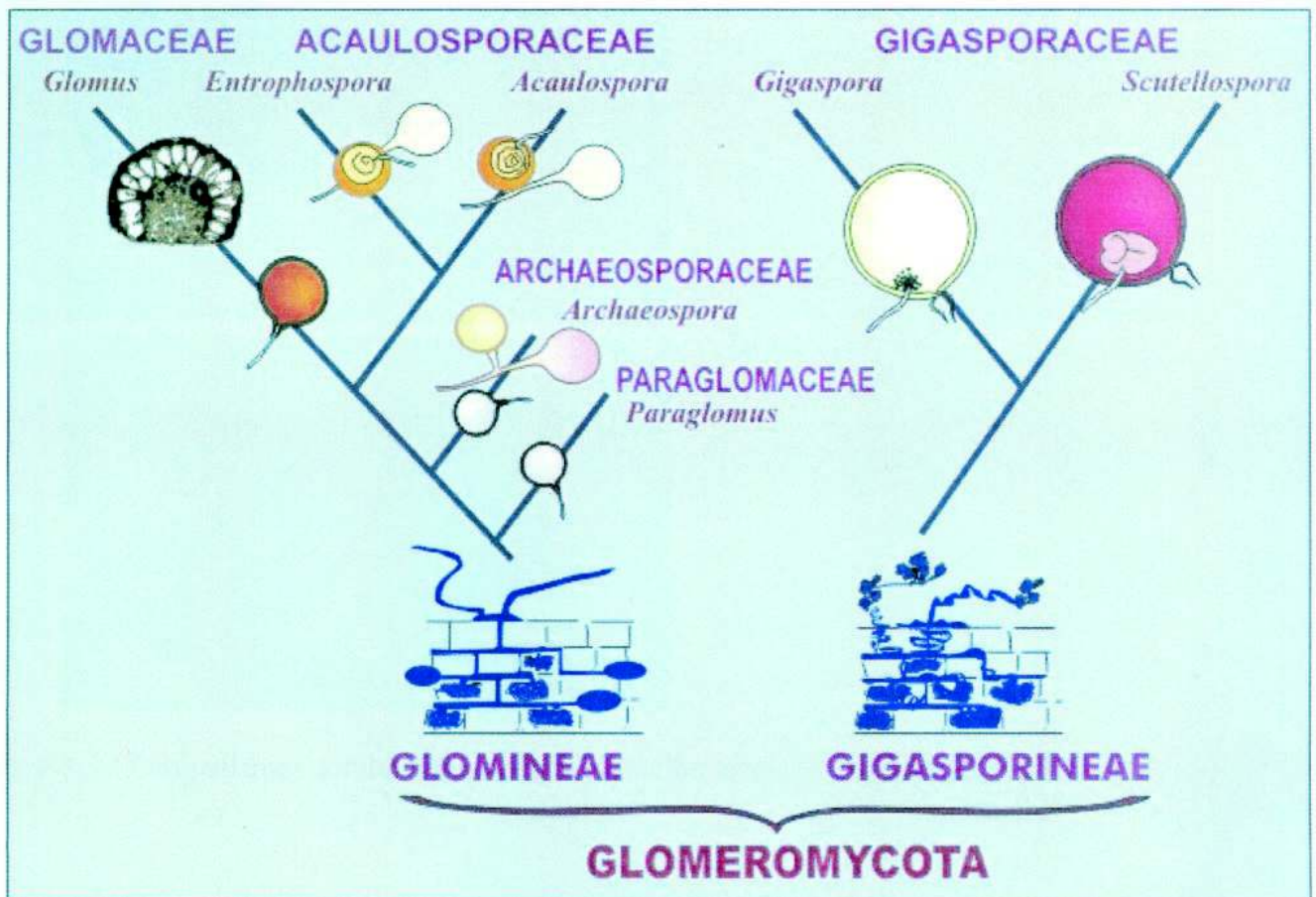
Com a estratégia utilizada nesse trabalho, foi possível ter acesso à diversidade de microrganismos solubilizadores de fosfato, fungos micorrízicos e bactérias presentes na rizosfera de genótipos eficientes e não eficientes de milho quanto ao uso de fósforo, em condições de estresse desse nutriente no solo.

Ocorreram diferenças entre os genótipos de milho com relação à população rizosférica destes microrganismos. Porém, o teor de P no solo parece ter influenciado mais a estrutura populacional destes microrganismos da rizosfera de milho que a eficiência no uso de P determinada por cada genótipo de milho testado.

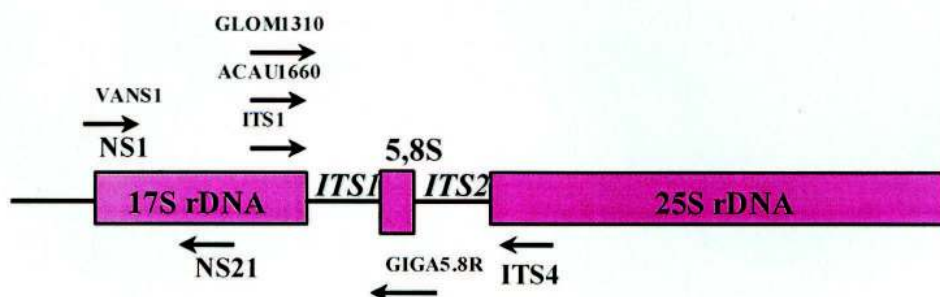
A diversidade de microrganismos solubilizadores, bactérias e micorrizas foi maior no plantio direto quando comparado com a rizosfera de milho em plantio convencional.

Foi possível, pela análise de seqüenciamento, verificar quais espécies estavam presentes na rizosfera de cultivares eficientes no uso de P e ausentes nos genótipos ineficientes. Estas espécies podem estar envolvidas no processo de eficiência de absorção do fósforo sendo favorecidas na rizosfera dos genótipos de milho eficientes, quando estes estão submetidos a condições de baixa disponibilidade deste elemento no solo. O conhecimento da diversidade e comportamento destas espécies poderá contribuir para futuras aplicações biotecnológicas na agricultura minimizando o uso de fertilizantes químicos.

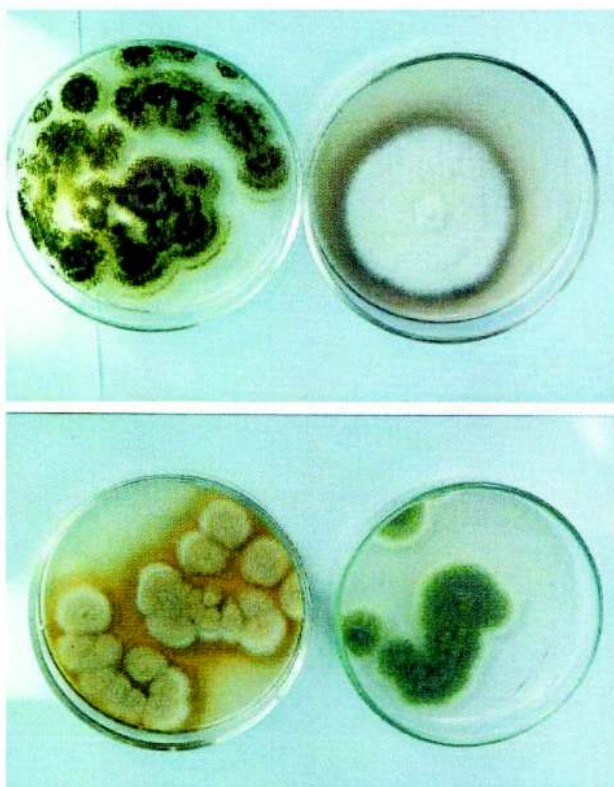
ANEXOS



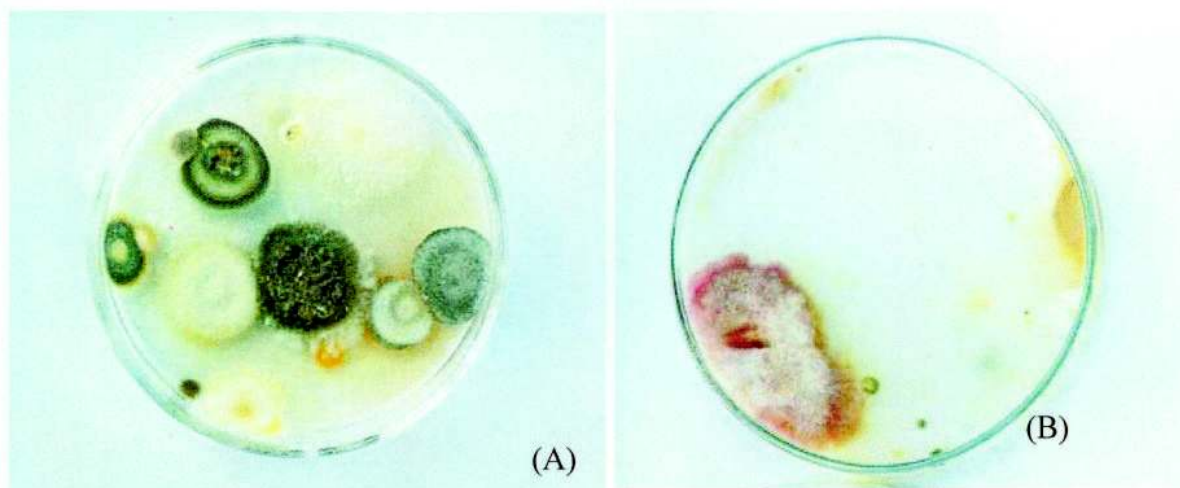
Anexo 1. Classificação atual dos FMAs de Glomeromycota. Fonte: <http://invam.caf.wvu.edu>



Anexo 2. Posição dos iniciadores do do rDNA de fungos utilizados nos DGGEs de micorrizas.



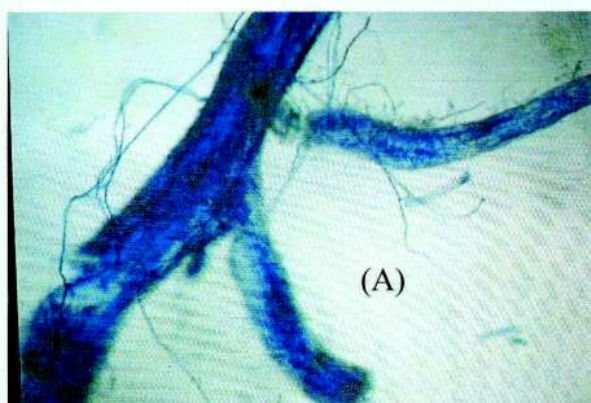
Anexo 3. Microrganismos solubilizadores de P em milho, coleção Embrapa Milho e Sorgo.



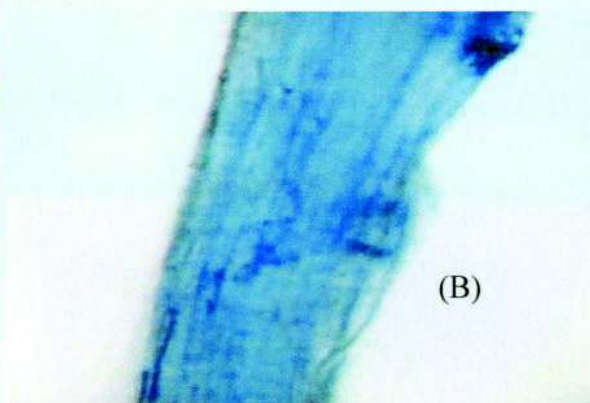
Anexo 4. Microrganismos solubilizadores de P em rizosfera de híbridos eficientes para fósforo (A), H3 e em H5 (B), ineficiente.



Anexo 5. Produção de halo em microrganismos solubilizadores de P.



(A)



(B)

Anexo 6. Colonização micorrízica em raízes de milho, linhagens L3 (A), eficiente para fósforo e L1(B), ineficiente.