

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR
DE FUNGOS E BACTÉRIAS
MINERALIZADORES DE FITATO ISOLADOS
DA RIZOSFERA DE LINHAGENS DE MILHO**

PATRÍCIA GOMES SILVA

2008

PATRÍCIA GOMES SILVA

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS E
BACTÉRIAS MINERALIZADORAS DE FITATO ISOLADOS DA
RIZOSFERA DE LINHAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof^a. Dra. Andréa Almeida Carneiro

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Patrícia Gomes.

Caracterização de microrganismos mineralizadores de formas orgânicas
/ Patrícia Gomes Silva. – Lavras : UFLA, 2008.

44p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Andréa Almeida Carneiro.

Co-orientador: Ivanildo Evódio Marriel.

Bibliografia.

1. Microrganismos. 2. Fósforo. 3. Fitato. 4. Fitases. 5. Solubilização.
6. Mineralização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.6

PATRÍCIA GOMES SILVA

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS E
BACTÉRIAS MINERALIZADORAS DE FITATO ISOLADOS DA
RIZOSFERA DE LINHAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2008

Profa. Dr. Andréa Almeida Carneiro

Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo



Prof. Dr. Andréa Almeida Carneiro
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Joaquim e Dalva pela confiança depositada em mim, aos meus irmãos Rodrigo e Thiago pelo apoio incondicional e a toda minha família pelo carinho e força

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e coragem para enfrentar tantos obstáculos e finalmente atingir esse objetivo, tornando a pesquisa uma realidade que avança à nossa compreensão.

À minha maravilhosa mãe e ao meu querido pai por todo esforço e confiança;

Os meus irmãos, a quem eu tanto amo e que sempre me apoiaram e me deram muito carinho e amor para que eu pudesse continuar sempre sem nunca desistir;

A minha querida vovó pelas orações e aos meus familiares que sempre estiveram junto comigo me acompanhando me dando toda força, me ajudando a superar os momentos difíceis e celebrar os de felicidades;

Ao meu amado namorado Gedaias, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis;

Á minha orientadora e Profa. Dra. Andréa Almeida Carneiro, por toda sua dedicação, exemplo e confiança em meu trabalho;

Ao Pesquisador Dr. Ivanildo Evódio Marriel pela amizade, força, ensinamentos, carinho e orientação durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luciano, pela confiança depositada;

Aos amigos do laboratório de Microbiologia do Solo, Verenice, Fernanda, Jéssica, as Amandas, Jonathan, Márcia, Rodrigo, Camila, Jacqueline e em especial Ubiana e Nayara;

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, Mariana, Gracielle, Fernanda, Edna e Ricardo;

Aos funcionários Heloisa e Carlos e aos estagiários, Levir e Thiago da Embrapa Milho e Sorgo pela ajuda nos momentos de dificuldade, pela amizade e pelos momentos de descontração;

A todos os meus amigos da EMBRAPA Milho e Sorgo;

A todos os colegas de curso pela amizade apoio e solidariedade;

A todos os professores do Mestrado em Biotecnologia Vegetal pelos ensinamentos no decorrer das disciplinas;

A Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

À CAPES, pelo suporte através de concessão de bolsa de estudo de mestrado;

Aos amigos, de longe e de perto, pelo ombro amigo, apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos, em especial à Mônica Santos, Fernanda Caniato.

Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado, me incentivando e me dando força, porque quem chega onde estou chegando nunca chega sozinho.

A todos, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 A cultura do milho	3
2.2 Fósforo	4
2.3 Fitases	6
2.4 Utilização de Fitato pelas Plantas e Microrganismos da Rizosfera	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Coleta de amostras de solos	10
3.2 Isolamento dos microrganismos da rizosfera capazes de utilizar Na-IHP	10
3.3 Análise da capacidade de utilização de Na-IHP pelos microrganismos da rizosfera	11
3.5. Extração do DNA.....	12
3.5.1 Extração do DNA genômico de bactérias	12
3.5.2 Extração do DNA genômico de fungos	13
3.6 Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	14
3.7 Sequenciamento da rDNA	15
4 RESULTADOS	17
4.1 Isolamento e seleção de microrganismos presentes na rizosfera de milho capazes de mineralizar fitato de sódio (Na-IHP)	17
4.3 Caracterização molecular dos fungos e bactérias capazes de utilizar Na-IHP	29
5 DISCUSSÃO	31

6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

SILVA, Patrícia Gomes. **Eficiência e diversidade molecular de fungos e bactérias mineralizadoras de fitato isolados da rizosfera de linhagens de milho**. 2008. 44 p. Dissertação. (Mestrado Agronomia/Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais. No solo, uma proporção significativa de P está na forma orgânica (50-80%), sendo que aproximadamente metade deste corresponde ao ácido fítico. Microrganismos produtores de fitase são essenciais para uma maior disponibilidade do P orgânico para a planta. O objetivo deste estudo foi a caracterização molecular de microrganismos isolados da rizosfera de plantas de milho coletadas ao acaso, capazes de mineralizar o fitato (Na-IHP), bem como da rizosfera de plantas eficientes e ineficientes para o uso de P, cultivadas em solo com alta e baixa disponibilidade de Pi. Em meio líquido foi encontrado uma atividade mineralizadora de fitato entre 0,3 a 99% para fungos e bactérias, isolados a partir de solo rizosférico coletado ao acaso. A eficiência de liberação de Pi neste grupo de microrganismos, variou de 0,39 a 21% para fungos e de 0,54 a 2,10% para bactérias. Os microrganismos isolados da rizosfera de plantas de milho eficientes e ineficientes para o uso de P, apresentaram um perfil similar para a mineralização de Na-IHP, sendo que 54% dos fungos e 76% das bactérias foram capazes de mineralizar mais de 50% do fitato. Para a caracterização molecular dos microrganismos isolados, DNA total foi extraído e amplificado por PCR utilizando os primers universais para rDNA (ITS1 / ITS4 para fungos; F968 / R1401 para bactérias). Em seguida os fragmentos amplificados foram seqüenciados utilizando ABI 3100. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com seqüências depositadas no GenBank Nucleotide Database utilizando os programas BLAST e Clustal 1.6. Dentre os microrganismos estudados, foram encontrados fungos mineralizadores de fitato dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*; bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.

ABSTRACT

SILVA, Patrícia Gomes. **Efficiency and molecular diversity of phytate mineralizing fungi and bacteria isolated from the rhizosphere of maize lines.** 2008. 44 p. Dissertation (Master Program in Agronomy/ Plant Biotechnology) – Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Phosphorus (P) is essential for the growth and development of plants. In the soil, significant amount of P is in the organic form (50-80%) and approximately half of the organic form correspond to phytic acid. Microorganisms producers of phytase are essential to a higher organic P availability to the plants. The objective of this study was the molecular characterization of microorganisms capable of phytate (Na-IHP) mineralization, isolated from the rizosphere of maize plants collected randomly, as well as from the rizosphere of plants efficient and non-efficient to use P, cultivated in soil containing high and low levels of Pi. In liquid media it was found activity of phytate mineralization between 0.3 to 99% for fungi and bacteria, isolated from rhizospheric soil randomly collected. The release Pi efficiency, in this group of microorganism, ranged from 0.39 to 21% for fungi and from 0.54 to 2.10% for bacteria. Microorganisms isolated from the rhizosphere of maize plants efficient and non-efficient to use P, showed similar pattern for the Na-IHP mineralization, 54% of fungi and 76% of bacteria were able to mineralize more than 50% of the phytate. For the molecular characterization of the microorganism isolated, total DNA were extracted and amplify by PCR utilizing universal primers (ITS1/ITS4 for fungi; F968/R1401 for bacteria). Following the amplification the fragments were sequenced using the ABI3100. The sequences obtained were analyzing and compared with sequences present in the GenBank Nucleotide Database using the programs BLAST e Clustal 1.6. Among the microorganism studied, it was found fungi mineralizing phytate from the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*; bacteria from the genus *Bacillus* e *Pseudomonas*.

* Advisor Comittee: Andréa Almeida Carneiro – UFLA (Advisor), Ivanildo Evódio Marriel (Co-Advisor) – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A aquisição de fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, desempenhando importantes papéis em funções fisiológicas básicas (Raghothama, 1999). Entretanto, P é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas, embora seja abundante no solo tanto na forma orgânica (Po) quanto inorgânica (Pi) (Gyaneshwar et al., 2002). Esta escassez é devida ao fato de este mineral ter uma difusão muito pequena na maioria dos solos, seus íons serem altamente reativos com numerosos constituintes do solo (Hinsinger, 2001) e as plantas utilizarem este nutriente quase que exclusivamente na forma de ânions de fosfato, principalmente HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$. Apenas uma pequena quantidade destes íons, entre 0,1 e 10 μM (Raghothama, 1999; Frossard et al., 2000), está disponível na fase líquida do solo. Para manter um crescimento saudável, plantas necessitam, no mínimo, entre 5 a 60 μM de P, dependendo da espécie (Föhse et al., 1988). Estima-se que 5,7 bilhões de hectares ao redor do mundo contenham quantidades insuficientes de P para um ótimo crescimento de lavouras (Batjes, 1997).

Para resolver o problema da deficiência de P e manter um ótimo rendimento agrícola, mais de 30 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados, são adicionados aos solos no mundo inteiro (International Fertilizers Industry Association, IFIA, 2005). Com base no atual consumo de fertilizantes fosfatados estima-se uma durabilidade de, no máximo, 90 anos para as fontes de P utilizadas para a produção de suprimentos agrícolas (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghothama, 1999). A produção de fertilizantes químicos fosfatados é um processo altamente energético custando em torno de 4 bilhões de dólares por ano para atender às necessidades globais (Goldstein et al., 1993). A situação ainda é mais complicada pelo fato que 75-90% dos fertilizantes aplicados no solo

(Stevenson, 1986) rapidamente tornam-se indisponíveis para a utilização pelas plantas devido a sua ligação a cátions e compostos orgânicos. Este acúmulo de fertilizantes fosfatados em regiões agrícolas é potencialmente poluente (Abselson, 1999; Miller et al., 2001) e tem causado danos ao meio ambiente. A lixiviação destes fertilizantes gera eutrofização (Raghotama, 1999), hipoxia (Vance et al., 2003) e conseqüentemente, degradação de ecossistemas, principalmente os aquáticos.

O P orgânico (Po) representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato. Esta forma de P orgânico parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (Adams & Pate, 1992; Findenegg & Nelemans, 1993; Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000). Para ser utilizado o Po precisa ser hidrolisado através da atividade de enzimas fosfatases de origem microbiana ou vegetal. A hidrólise de fitato é mediada especificamente pelas fitases, cuja contribuição para a nutrição de plantas tem sido pouco explorada. Sabe-se que a rizosfera de plantas é habitada por uma gama variada de microrganismos com papel importante na ciclagem e disponibilização de nutrientes. Espera-se que a prospecção de comunidades microbianas com capacidade de utilizar fitato como fonte de P permita a identificação de microrganismos com alta produção e atividade de fitase, poderiam ser utilizados diretamente como inoculantes, fontes de genes ou enzimas para o bioprocessamento de fontes orgânicas de P.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do milho

O Milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais produzidos no mundo. O Brasil é um dos maiores produtores, com cerca 41.900.000 toneladas do grão, perdendo em número apenas para a soja, que apresentou produção de 49.521.531 toneladas na safra de 2004 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2005). Durante as últimas décadas, a produção anual de milho, em toneladas, foi semelhante à do arroz e à do trigo (O'Connor-Sanchez et al., 2002).

De acordo com Huang & Wei (2004), o milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. Hoje, trata-se da forragem mais importante entre os cereais, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento. Sua utilização na alimentação é bem diversificada devido ao alto conteúdo de amido (71,5%) e teores significativos de proteínas (10,3%), lipídeos (4,8%) e açúcares (2,%) (Lopes, 2005).

Milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo dependem do milho para sua subsistência. Nestas áreas, a produtividade das colheitas é freqüentemente baixa devido a estresses bióticos, abióticos e limitações nutricionais (O'Connor-Sanchez et al., 2002).

A limitação de terra agricultável, os recursos de água, os estresses ambientais e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção de milho, bem como na sua qualidade (Huang & Wei, 2004). Kochian et al. (2004) afirmam que 20% da safra mundial de milho é oriunda de solos que apresentam acidez e baixa disponibilidade de P o que demonstra que o melhoramento convencional já avançou muito no aumento da produtividade e da tolerância a estas características dos solos. No entanto, o

uso da biotecnologia poderá aumentar ainda mais a produtividade das lavouras de milho.

2.2 Fósforo

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento de todos os organismos. Este nutriente está envolvido em funções básicas como formação de ácidos nucléicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de tradução de sinais (Abel et al., 2002; Rausch & Bucher, 2002; Schünmann et al., 2004b) podendo desta forma, ser considerado o principal fator limitante para o desenvolvimento de plantas em ecossistemas naturais.

Para garantir a sobrevivência em solos com baixas concentrações de P, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de adaptação (Muchal, 1999; Karthikeyan et al., 2002 e Hammond et al., 2004) como modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, na anatomia da raiz, acúmulo de pigmentos de antocianina, secreção de fosfomonoesterases e ácidos orgânicos na rizosfera (Fan et al., 2003; Ligaba et al., 2004; Lopez-Bucio et al., 2000; Rausch & Bucher, 2002). A assimilação, armazenamento e metabolismo do P são processos altamente regulados que afetam diretamente o crescimento, desenvolvimento e, conseqüentemente, a produção da planta (Abel et al., 2002).

A deficiência de P pode gerar diversos distúrbios metabólicos que levam à queda da produtividade e até à inviabilidade da cultura. Wasaki et al. (2003) enumeram estas mudanças metabólicas como: (1) aceleração da provisão de carbono para síntese de ácidos orgânicos por meio da glicólise, (2) alterações do metabolismo de lipídio, (3) remobilização de fosfolipídios da parede celular, e (4) mudanças de expressão de genes relacionados à resposta para elementos metálicos, como o Al, Fe e Zn. Plantas deficientes em P apresentam uma

coloração azul ou avermelhada, folhas mais velhas têm uma coloração verde intensa, clorose marginal, redução no crescimento, amadurecimento precoce, perda de produtividade e qualidade dos frutos colhidos (Malavolta et al., 1989; Marschner, 1995).

Para promover um aumento de produtividade agrícola, grandes quantidades de fertilizantes fosfatados são aplicadas nestas áreas a cada ano, mas somente 10% a 20% do total são prontamente utilizados pelas plantas (Holford, 1997). O uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados vem aumentando progressivamente desde 1960 (Vance et al., 2003). Se o aumento do consumo de adubos fosfatados continuar acontecendo, a previsão é de, que as fontes de Pi se esgotem nos próximos 90 anos (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghotama, 1999; Vance et al., 2003).

O P total é acumulado na natureza na forma orgânica (Po) ou inorgânica (Pi). Pi no solo ocorre na forma de ânions de fosfato, os quais em solo ácidos são altamente reativos com os óxidos de ferro (Fe), alumínio (Al) e silicatos de alumínio, enquanto em solos alcalinos, formam precipitados pouco solúveis com carbonatos de cálcio (Ca) (Sanyal & De Datta, 1991). Em regiões tropicais e subtropicais as características geoquímicas do solo favorecem uma maior retenção dos íons de fosfato pelos constituintes sólidos do solo.

O P orgânico compreende entre 50% e 80% do total de P presente nos solos (Larsen, 1967; Bielecki, 1973; Dalal, 1977). Os principais componentes de P orgânico no solo, identificados por RNM^{31}P , são os ortofosfatos de monoésteres $[\text{RO-PO}_3]$, os ortofosfatos de diésteres $[\text{R-O-PO}_2\text{-O-R}']$ e os fosfonatos $[\text{R-PO}_4]$. Os ortofosfatos de monoésteres são as formas predominantes de P orgânico em extratos de solos (Magid et al., 1996), sendo que o principal componente são os fosfatos de inositol (ésteres de hexaidroxibenzeno), desde mono até hexafosfato de inositol. De particular importância é a ocorrência no solo de P orgânico na forma de ácido

hexafosfático de myo inositol ou fitato, provavelmente devido à maior estabilidade dessa forma no solo (revisão por Novais & Smyth, 1999).

Muitas plantas são beneficiadas, sob a deficiência em P, pela associação com microrganismos. Esta associação pode resultar em um melhor acesso ou disponibilização para as planta de fontes de P insolúveis. O envolvimento de microrganismos na solubilização de fosfatos inorgânicos é conhecido, desde 1903 (Kucey et al., 1989). Microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) estão presentes em diversos ambientes e seu número é bastante variável. Nos solos, bactérias solubilizadores de fosfato constituem 1-50% e fungos, 0.5-0.1% do total da população. Em geral, bactérias solubilizadoras de P estão em maior número do que os fungos (Banik & Dey, 1982, Kucey, 1983; Kucey et al., 1989). A maioria dos MSP solubilizam complexos de Ca-P e apenas poucos podem solubilizar Fe-P e Al-P (Kucey et al., 1989). A capacidade dos MSP de solubilizar complexos de Ca-P tem sido atribuída a sua habilidade de reduzir o pH pela liberação de ácidos orgânicos ou prótons. Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral ou quelar íons de Fe ou Al associados com o fosfato. Entretanto, acidificação não parece ser o único mecanismo de solubilização, pois a habilidade de reduzir o pH em alguns casos não está correlacionada com a habilidade de solubilizar fosfato mineral (Subba Rao, 1982).

2.3 Fitases

Fitato representa até 80% do total de P orgânico no solo (Mudge et al. 2003; Iyamuremye & Dick 1996; Dalal, 1977). Entretanto, esta forma de P orgânico parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (Adams & Pate, 1992; Findenegg & Nelemans, 1993; Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000).

Fosfatases são requeridas para a hidrólise de formas orgânicas de fosfato presentes no solo e liberação do Pi (Raghothama, 1999). Uma grande variedade de fosfatases com diferentes especificidades tem sido caracterizada em raízes de plantas (Bosse & Kock, 1998; Tandano & Sakai, 1991) em microrganismos do solo (Richardson, 1994). Estas incluem as fitases (*myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolases) que são enzimas que pertencem à família das fosfatases ácidas e compartilham uma seqüência aminoacídica padrão [LIVM]-X-X-[LIVMA]-X-X-[LIVM]-X-R-H-[GN]-X-R-X-[PAS] (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/get-prodoc-ntry?PDOC00538>). Fitases são capazes de catalizar a hidrólise de ligações fosfomonoéster do fitato (sais de *myo*-inositol hexaphosphate ou *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexadihydrogen phosphate), em formas menos complexas de *myo*-inositol fosfato e fosfato inorgânico. Fitases são agrupadas de acordo com a posição do grupo fosfato ester na molécula do fitato, onde a hidrólise enzimática é iniciada, como 3-fitase (EC 3.1.3.8) de microrganismos, ou 6-fitases (EC3.1.3.26) de plantas (Wodzinski & Ullah, 1996).

No estudo das fitases muita atenção tem sido dada ao seu uso como um aditivo na ração animal porque o fitato presente nas sementes de plantas não é digerido pelos animais monogástricos (revisado por Wodzinski & Ullah 1996; Brinch-Pedersen et al., 2002). Entretanto, a contribuição de fitases, provenientes de raízes ou de microrganismos do solo, para a nutrição de plantas permanece pouco entendida. Aumento da atividade de fosfatases em resposta à deficiência de Pi e altos níveis de atividade dentro da rizosfera, comparado com o restante do solo, é evidente o envolvimento destas enzimas na nutrição de plantas (Hayes et al., 1999; Hubel & Beck, 1996; Li et al., 1997).

2.4 Utilização de Fitato pelas Plantas e Microrganismos da Rizosfera

Para se tornar disponível para as plantas, o P orgânico precisa ser desfosforilado por fosfatases porque as plantas utilizam o fosfato apenas na

forma inorgânico (Pi) (Richardson, 2001). O solo presente na vizinhança das raízes, denominado de rizosfera, é caracterizado como uma área de alta densidade microbiana Hiltner (1904) citado por Hinsinger & Marschner (2006), sendo a estimulação do crescimento microbiano pelas raízes comumente conhecida como efeito rizosfera. Na rizosfera, substâncias orgânicas (açúcares, ácidos orgânicos, polissacarídeos, etc.) são exsudadas da raiz para o solo, no qual são utilizadas pelos microrganismos como fontes de carbono e energia para o crescimento e reprodução (Whipps, 1990). A atividade de fosfatases é alta na rizosfera, tornando esta área uma zona de degradação e consumo de P orgânico, principalmente fitatos (Tarafdar & Jungk, 1987). Em geral, muitas espécies de plantas não utilizam o fitato como uma fonte de P porque não possuem uma fitase extracelular; em *Arabidopsis thaliana*, fitase constitui menos de 0,8% da atividade total de fosfomonoesterase ácidas presente nas raízes e não foi detectada como uma enzima extracelular (Richardson *et al.*, 2001). Entretanto, quando fitases (Hayes *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002) são adicionadas ao meio de crescimento, plantas são capazes de crescer, *in vitro*, utilizando fitato como única fonte de P.

Embora bactérias que utilizem o ácido fítico (Na-IHP) possam ser encontradas tanto em solos cultivados como em solos alagados, pastagens e florestas (Richardson & Hadobas, 1997), a utilização do fitato, presente no solo, pelas plantas e microrganismos é geralmente limitada. Pouca informação existe relacionando microrganismos produtores de fitase, presentes na rizosfera, e o crescimento vegetal. Unno *et al.* (2005) isolaram e caracterizaram mais de 300 bactérias capazes de utilizar fitato da rizosfera de *Lupinus albus*. Alguns de seus isolados foram inoculados em plântulas de *Lotus japonicus* e foram capazes de promover um crescimento vegetal significativo. Em relação à cultura do milho, poucos dados relativos à interação de microrganismos mineralizadores de fosfato orgânico e a planta existem. Apenas Hussin *et al.* (2007) estudaram

bactérias capazes de mineralizar o fitato isoladas a partir de diferentes regiões da raiz. Portanto, mais pesquisas relacionadas com esta interação são necessárias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras de solos

Foram utilizadas amostras de solo da rizosfera (solo rizosférico) na camada de 0-20 cm de profundidade e coletadas de plantas de milho nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. As amostras foram coletadas de acordo com Ishizawa et al. (1957), de seis plantas ao acaso. Em seguida o solo bem aderido às raízes foi retirado e passado em peneira de aproximadamente 2 mm, constituindo as amostras de solo rizosférico. As amostras foram armazenadas na geladeira para análises posteriores.

3.2 Isolamento dos microrganismos da rizosfera capazes de utilizar Na-IHP

Amostras de 1 g de solo foram suspensas em 9 ml de solução salina (NaCl, 0,85% p/v) e agitadas em shaker durante 40 minutos em temperatura ambiente. Para o isolamento dos microrganismos capazes de utilizar Na-IHP, foram preparadas diluições seriadas decimais de 10^{-1} a 10^{-4} , com três réplicas cada uma, através da transferência de 1 ml de cada suspensão para 9 ml de solução salina. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram transferidas para placas contendo meio de fitato sólido (FS), com a seguinte composição por litro: 10,0 g de glucose, 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g urea, 3,0 g ácido cítrico, 2,0 g citrato de sódio, 1,0 g sulfato de magnésio, 3,0 g fitato de sódio, 100 ml de Tris buffer (pH 8,0), 0,1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 μg biotina, 20 mg tiamina-HCl, e 20,0 g de agar. O pH foi ajustado para 7,0 usando HCl 1M antes de ser autoclavado a 120°C por 20 minutos.

O isolamento dos microrganismos capazes de utilizar Na-IHP crescidos em meio de cultura de fitato como a única fonte de fósforo foi efetuado a partir de colônias puras obtidas no bioensaio para contagem de microrganismos. As

colônias obtidas nesses meios foram caracterizadas morfológicamente quanto à forma, cor, presença de halo, opacidade, consistência, superfície. As colônias selecionadas foram transferidas duas vezes para novos meios de cultivo para obtenção de colônias puras. Após o isolamento e purificação os isolados foram estocados em frascos de 12 ml, que continham meio sólido BDA (Batata, dextrose e agar). As culturas foram cobertas com 3ml de óleo mineral esterilizados e os frascos foram fechados com rolha de plástico e identificados para conservação e realização de estudos posteriores.

3.3 Análise da capacidade de utilização de Na-IHP pelos microrganismos da rizosfera

Diluições feitas utilizando as amostras de solo coletadas da rizosfera de plantas de milho foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo fitato, como fonte de P. Foram pré-selecionados 174 isolados (bactérias, fungos) dos quais 45 bactérias e 45 fungos foram avaliados quanto ao potencial de mineralização de fitato em meio fitato líquido (FL) (mesma composição do meio FS sem agente geleificante. Fungos (6mm de disco de micélio de cultura) e bactéria (10^6 a 10^8) foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio (FL) e incubados por 10 dias sob agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, a cultura foi filtrada e o ácido fítico quantificado (Thompson et al., 1982). No tubo contendo o material filtrado foram adicionados 25 ml da solução cloreto férrico, a qual é composta pelos seguintes reagentes: 2g $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ +16,3mL HCl/L H_2O desionizada. Em seguida o material foi agitado em banho-maria em ebulição por 75 minutos. Após esse período as amostras foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos, seguidos de centrifugação a 140000 rpm por 15 minutos; nesta etapa o sobrenadante foi separado do ácido fítico restante no meio de cultivo. O precipitado (fitato) foi submetido a três lavagens com a 25 ml da solução de

cloreto férrico descrita acima; após cada lavagem o material foi centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm. Concentração de P presente no sobrenadante e precipitado foram determinadas após a digestão ácida com solução de nitroperclórica das amostras. Para a análise de sobrenadante, foi pipetado 1ml do material em tubo de ensaio próprio para digestão seguido pela adição de 3ml de solução nitroperclórica 2:1. O material do resíduo (fitato) precipitado através da solução de cloreto férrico, foi adicionado 4ml da solução de nitroperclórica. As amostras foram colocadas no bloco digestor à temperatura de 150°C durante 40 minutos. Após os 40 minutos, a temperatura do bloco foi aumentada para 250°C até o clareamento total das amostras (~30 minutos). Assim que todas as amostras estavam frias, adicionaram-se 50mL de água deionizada, seguidos por homogeneização constante. O P das amostras foi determinado usando a reação de coloração Molybdato Blue. A absorbância medida foi de 720 nm. Pipetou-se 1ml das amostras do sobrenadante o qual foi digerido em erlenmeyer de 125ml e adicionado de 21 ml de água deionizada, mais 4ml da solução de ácido ascórbico 0,53%. As amostras do precipitado (fitato) digeridas foram diluídas 1/10. Pipetou-se 1ml dessa diluição das amostras do precipitado para 21 ml de água deionizada procedido de 4ml da solução de ácido ascórbico, seguido por homogeneização das amostras pipetadas as quais foram deixadas em repouso por 20 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 725 nm.

3.5. Extração do DNA

3.5.1 Extração do DNA genômico de bactérias

Os isolados bacterianos foram cultivados em 5 ml de meio LB líquido e incubados por 24 horas a 28°C, em agitador a 120g. Depois desse período, as suspensões bacterianas foram recolhidas em tubos de 1,5 ml e centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm; o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de Tampão TNE (5 ml Tris 1M, 6,6 ml NaCl 3M e 40 ml 0,5 M EDTA: completar o volume para 200 mL com água destilada). O material foi agitado em sonicador por 1 min para lise da parede celular. Em seguida foram adicionados 400 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e 200 µl de SDS 20%. O material foi gentilmente misturado por 10 minutos. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. O DNA foi extraído pela adição de fenol e clorofórmio e o precipitado com álcool absoluto, misturando gentilmente por inversão e armazenando a -20°C por 2 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000 rpm; o sobrenadante foi descartado. DNA foi lavado com etanol 70% e colocado para secar a temperatura ambiente por 2 horas. Após a ressuspensão do material em 50 mL de água Milli-Q, ele foi estocado a -20°C. Todas as amostras foram tratadas com RNase (20 mg mL⁻¹).

3.5.2 Extração do DNA genômico de fungos

Os fungos foram cultivados em erlemayers de 125 ml contendo 50 ml de meio líquido BDA e permaneceram durante nove dias em shaker sob agitação constante a temperatura ambiente. Como inóculo, foram utilizados círculos de aproximadamente 0.5mm de massa micelial proveniente de culturas puras. Após o crescimento do fungo, o micélio foi filtrado e o DNA total foi extraído de acordo com Azevedo et al. (2000). Um grama de micélio foi triturado com o auxílio de nitrogênio líquido, ao qual foram adicionados 400 µl de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 3% SDS; H₂O destilada esterilizada). Após a homogeneização, as amostras foram colocadas a 65 °C por 1 hora e em seguida centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos. À fase aquosa foi adicionada uma mistura de clorofórmio: fenol, 1:1 a qual foi homogeneizada por 5 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 minutos, novamente a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e igual volume de

clorofórmio-octanol 24:1, foi adicionado e homogeneizado por 5 minutos. Após centrifugação a 10.000g por 10 minutos a fase aquosa foi transferida para microtubos (aproximadamente 400 µl em cada tubo) e cerca de 40 µl de NaCl 3 M foram acrescentados ao material. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol gelado. E incubou-se a -20 °C por 1 hora. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 20 minutos, o pellet foi lavado com 200µl etanol 70%, centrifugado por 5 minutos e seco a vácuo. O material precipitado foi posteriormente ressuscitado em 100 µl de tampão TE (1mL Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 mL EDTA 0,5 M pH 8,0; 98,8 mLH₂O) e mantido a -20 °C. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0), comparando-se com um padrão de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi diluído em água ultrapura para a concentração de 40 ng/µl e armazenado a -20 °C.

3.6 Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

O rDNA dos fungos e bactérias isolados foi amplificado do DNA total usando primers universais para fungo (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) e para bactéria (Nubel et al., 1996). As amplificações foram realizadas empregando-se 5µl de DNA genômico, 1,0 M de MgCl₂, 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 µl de dNTP, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl e 0,2mM de cada oligonucleotídeo. A reação foi realizada em termociclador modelo Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT programado para uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido o ciclo de desnaturação 95°C por 30 segundos, 46°C por 1 minuto

e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 Volts por 2 horas em gel de agarose 1,8% utilizando tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0).

3.7 Sequenciamento da rDNA

Foram sintetizados quatro iniciadores para amplificação do rDNA: (*ITS1*: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; *ITS4*: TCCTCCGCTTATTGATATGC; *F968*: GTAGTCATATGCTTGTCTC e *R1401*: TCCGCAGGTTACCTACGGA). As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit de seqüenciamento ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer). As reações foram realizadas em volume total de 20 µl contendo 180 ng de DNA, 8,0 µl de premix e 4,0 mM de um dos iniciadores (*ITS1*, *ITS4*, *F968* e *R1401*). A reação foi incubada no termociclador “PTC-100 TM MJ Research. Inc.”, utilizando o programa de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e quatro minutos a 60°C, repetido 25 vezes. As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando os programas de pesquisa BLAST e Clustal 1.6.

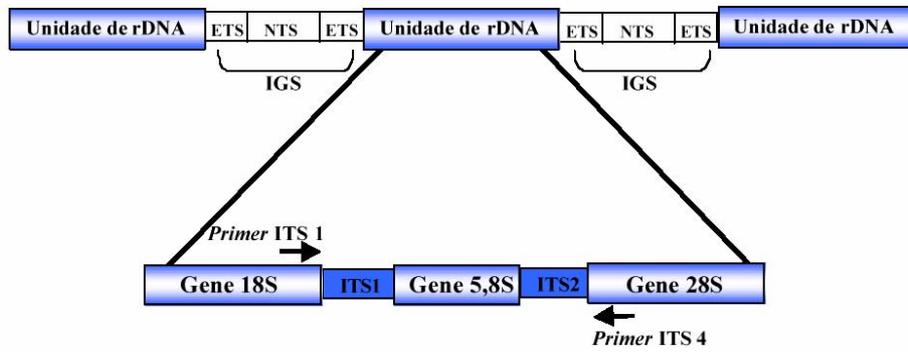


FIGURA 1: Localização dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e seleção de microrganismos presentes na rizosfera de milho capazes de mineralizar fitato de sódio (Na-IHP)

A capacidade de mineralização do fitato (Na-IHP) por microrganismos presentes na rizosfera do milho foi analisada, numa primeira etapa, por meio da medida da capacidade de crescimento em meio sólido contendo Na-IHP como única fonte de P. Os microrganismos foram obtidos a partir de amostras de solo rizosférico coletadas aleatoriamente de raízes de plantas de milho crescidas no cerrado, em diferentes locais da área experimental da Embrapa Milho e Sorgo. Após uma semana de incubação das amostras plaqueadas no meio de cultura seletivo, 154 colônias de microrganismos (85 fungos; 69 bactérias) foram transferidas para novo meio contendo fitato e purificadas.

Posteriormente, com base nas características fenotípicas, 40 colônias de fungos e 34 de bactérias foram selecionadas para estudos de utilização e mineralização de Na-IHP. Estes isolados de microrganismos selecionados foram reavaliados quanto à pureza e preservados em agar inclinado. Numa segunda etapa, efetuou-se a análise da atividade mineralizadora dos isolados selecionados em meio líquido contendo Na-IHP como única fonte de P, por meio da quantificação dos teores de fitato remanescentes nas culturas enriquecidas e teores de fósforo inorgânico presente no sobrenadante das culturas. E, a partir destes dados, estimaram-se os teores de P-fitato imobilizados na biomassa microbiana (eficiência de mineralização) e de fósforo disponível (eficiência de liberação de Pi).

Estes isolados de fungos e de bactérias foram inoculados em meio de cultura líquido contendo Na-IHP. Os resultados das análises do meio de cultivo

líquido, na ausência da inoculação com microrganismos mostraram que apenas traços de Pi estavam presentes no sobrenadante ($>0,005 \text{ mg.l}^{-1}$).

De modo geral, observou-se que todos isolados de fungos e bactérias, pré-selecionados em meio sólido contendo Na-IHP, foram capazes de crescer em meio líquido contendo fitato. A capacidade de mineralização do fitato pelos fungos e bactérias isolados está representada na Figura 2 e nas Tabelas 1 e 2. Pode-se observar que neste grupo de microrganismos estudados, existe uma grande variação na habilidade de mineralização do fitato (Figura 3). Em geral, os fungos foram capazes de mineralizar maior quantidade de fitato do que as bactérias. A eficiência de liberação de Pi no sobrenadante oscilou entre os valores de 0,2 e 21% ($2,52$ e $205,31 \text{ mg.P.l}^{-1}$) e de 0,74 e 1,97% ($16,04$ e $19,74 \text{ mg.P.l}^{-1}$) para o grupo de fungos e de bactérias, respectivamente.

Nas Figuras 2 A e B observa-se que a eficiência de liberação de Pi foi maior para os fungos (0,39 a 21,00%) do que para as bactérias (0,54 a 2,13%). A Figura 3A mostra que a maioria dos isolados de fungos (65%) apresentou uma eficiência de mineralização entre 0,2 e 3,9% do P-fitato adicionado ao meio de cultivo; 20,9% foram capazes de liberar entre 5 e 10% de Pi no sobrenadante, enquanto 13,95% liberaram mais de 15% do P-fitato. Na figura 3B, observa-se que a maioria das bactérias apresentou uma eficiência de liberação de Pi menor que 2,00%.

Na Tabela 1 estão apresentados os dados referentes à eficiência de mineralização e liberação de P-fitato por fungos isolados da rizosfera de milho. Observa-se que todos os fungos foram capazes de crescer no meio de cultivo líquido e, conseqüentemente, utilizar P na forma de fitato. Os fungos com uma maior eficiência de liberação de Pi foram os isolados CNPMS 69, 65, 91, 88 e 50, com média de 17,54% e eficiência de mineralização de P-fitato de 61,71%. Os isolados CNPMS90 e CNPMS51 mineralizaram apenas 18,38 e 23,57% do P-fitato, mas mostraram uma eficiência de liberação do Pi no sobrenadante de

9,00 e 6,7% (87,93 e 65,33 mg.P.l⁻¹), respectivamente, enquanto os isolados CNPMS 54, 87, 115, 30, 55, 78, 47, 101, 64, 80, 170, 86, 45, 172, 56, 09, 73, 93, 56, 38, 32, 39, 83 e 26 apresentaram uma eficiência de mineralização média de 66,49 % mas uma eficiência de liberação de Pi de apenas 0,89% ou menos de 1 mg.P.l⁻¹.

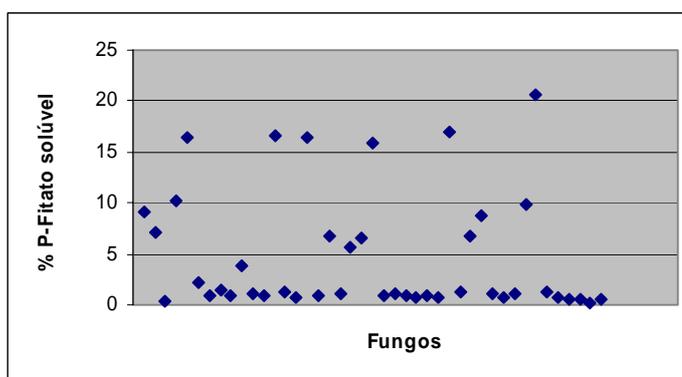


TABELA 1: Eficiência de mineralização e liberação de P-fitato por fungos isolados da rizosfera de milho.

Isolado	<u>Blast</u>	%	% EM⁽¹⁾	% EL⁽²⁾
Fungos		Identidade		
CNPMS54	ND	-	62,07	0,39
CNPMS 169	ND	-	44,65	10,50
CNPMS 69	<i>Mucor hiemals</i>	99%	42,11	16,70
CNPMS 89	ND	-	42,11	2,20
CNPMS 29	ND	-	54,10	0,90
CNPMS 22	ND	-	44,90	1,50
CNPMS 87	<i>Aspergillus caelatus</i>	99%	92,25	1,00
CNPMS 40	ND	-	77,64	3,90
CNPMS 115	ND	-	73,72	1,00
CNPMS 30	ND	-	86,57	1,00
CNPMS 65	<i>Fusarium sp.</i>	99%	40,56	17,00
CNPMS 55	ND	-	91,31	1,30
CNPMS 78	ND	-	78,73	0,70
CNPMS 91	<i>Fusarium acutatum</i>	99%	80,05	16,80
CNPMS 47	ND	-	59,35	1,00
CNPMS 53	ND	-	99,10	6,90
CNPMS 101	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	99%	64,91	1,10
CNPMS 27	ND	-	64,98	5,90
CNPMS 51	ND	-	23,57	6,70
CNPMS 88	<i>Aspergillus caelatus</i>	99%	73,89	16,20
CNPMS 64	ND	-	75,01	1,00
CNPMS 80	<i>Aspergillus niger</i>	99%	46,14	1,20

...continua...

TABELA 1, Cont.

CNPMS 26	<i>Eucapenicillium shearii</i>	99%	58,03	0,50
CNPMS 86	ND	-	69,47	0,70
CNPMS 170	ND	-	57,44	0,90
CNPMS 45	<i>Penicillium citrinum</i>	99%	59,09	1,10
CNPMS 172	ND	-	47,18	0,79
CNPMS 56	ND	-	79,66	1,20
CNPMS 63	<i>Aspergillus caelatus</i>	99%	66,08	6,90
CNPMS 90	<i>Aspergillus caelatus</i>	99%	18,38	9,00
CNPMS 09	ND	-	76,19	1,20
CNPMS 73	<i>Talaromyces flavus</i>	99%	64,88	0,80
CNPMS 93	ND	-	47,05	1,10
CNPMS 74	ND	-	99,09	10,10
CNPMS 50	<i>Aspergillus pseudolamari</i>	99%	71,93	21,00
CNPMS 56	ND	-	79,66	1,40
CNPMS 38	ND	-	92,01	0,80
CNPMS 32	ND	-	67,21	0,60
CNPMS 39	ND	-	61,95	0,50
CNPMS 83	ND	-	70,82	0,20

ND: não determinado

(1) Eficiência de mineralização

(2) Eficiência de utilização

Na Tabela 2 estão apresentados os dados referentes à eficiência de mineralização e liberação de P-fitato por bactérias da rizosfera de milho. Observa-se que quase todos os isoladas foram capazes de mobilizar o P-fitato de sódio presente no meio e apenas seis bactérias não cresceram em meio líquido

contendo fitato. 59,75% das bactérias isoladas apresentaram uma eficiência de mineralização entre 0-25% do fitato total presente no meio; 21,21% entre 25-50%; 3,03% entre 50-75% e 21,21% mais de 75%. Apesar da habilidade de utilizar do fitato como fonte de P, as bactérias selecionadas neste estudo apresentaram uma baixa eficiência de liberação de Pi para o sobrenadante, menos de 0,5 mg P.l⁻¹

TABELA 2: Eficiência de mineralização e liberação de P-fitato por bactérias isoladas da rizosfera de milho.

Isolado	Blast	%	% EM⁽¹⁾	% EL⁽²⁾
Bactéria	Identidade			
CNPMS206	ND	-	5,66	0,54
CNPMS 22	ND	-	0	0
CNPMS 78	ND	-	0	0
CNPMS 75	<i>Bacterium antarctica</i>	99%	42,13	1,21
CNPMS 19	ND	-	12,26	0,74
CNPMS 214	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	99%	23,00	1,64
CNPMS 79	ND	-	17,48	1,60
CNPMS 15	ND	-	92,14	1,60
CNPMS 184	<i>Uncultured bacterium</i>	99%	91,31	0,94
CNPMS 194	<i>Bacillus subtilis partial</i>	99%	31,97	1,51
CNPMS 107	ND	-	9,11	1,64
CNPMS 09	ND	-	19,72	1,15
CNPMS 05	ND	-	0	0

...continua....

TABELA 2, Cont.

CNPMS 02	<i>Uncultured bacterium</i>	99%	37,93	1,97
CNPMS 10	ND	-	13,85	1,37
CNPMS 144	ND	-	20,33	1,10
CNPMS 11	ND	-	41,19	0,98
CNPMS177	ND	-	0	0
CNPMS 103	ND	-	10,90	2,13
CNPMS 188	ND	-	18,77	1,77
CNPMS 182	ND	-	90,68	1,10
CNPMS 03	ND	-	71,07	1,85
CNPMS 139	ND	-	99,12	1,69
CNPMS 23	ND	-	84,42	0,71
CNPMS 16	ND	-	43,64	0,85
CNPMS 175	ND	-	99,12	1,49
CNPMS 205	ND	-	22,48	1,07
CNPMS 204	ND	-	88,91	1,49
CNPMS179	ND	-	0	0
CNPMS 202	ND	-	3,41	0,81
CNPMS 121	ND	-	28,00	1,21
CNPMS 200	ND	-	0,52	1,21
CNPMS 183	ND	-	34,62	1,63

ND: Não determinado

(1) Eficiência de mineralização

(2) Eficiência de liberação 4.2 Seleção de fungos e bactérias rizosféricos capazes de mineralizar Na-IHP, provenientes de genótipos de milho eficientes e ineficientes no uso de P cultivados em solo com baixos e altos teores de Pi.

Raízes de diferentes linhagens de milho eficientes (L3, L161, BR3060) e ineficientes (L53, L22, Cateto) ao estresse de P foram coletadas após 30 dias de germinação do milho em solo contendo altos e baixos teores de P. Solo rizosférico coletado das raízes foi diluído em solução salina e plaqueado em meio de cultivo contendo Na-IHP como fonte de P.

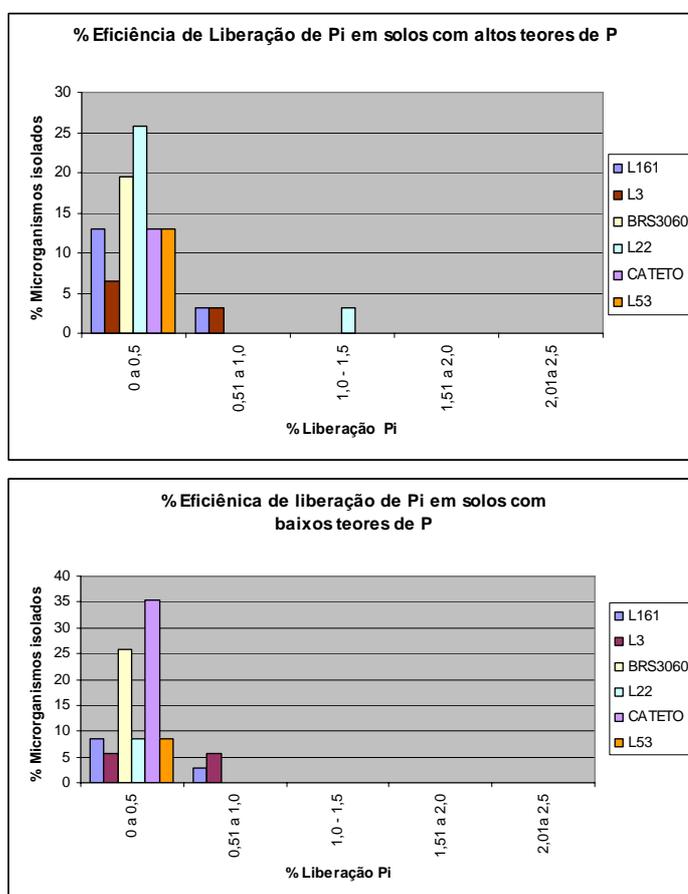


FIGURA 3: Eficiência da liberação de Pi por microrganismos isolados da rizosfera de diferentes cultivares de milho crescidos em solos com baixos e altos teores de P. Linhagens eficientes: L161, L3, BRS3060; Linhagens ineficientes: L22, Cateto, L53.

Mais de 200 microrganismos cresceram no meio seletivo sólido. Posteriormente, 119 isolados cresceram em meio líquido suplementado com Na-IHP. Deste total de fungos e/ou bactérias inicialmente inoculadas, apenas 57 cresceram. O total de fitato que foi mineralizado e liberado para o meio de cultivo pelos isolados que conseguiram crescer em meio líquido foi quantificado e está apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Os dados apresentados nas Figuras 3 A e B mostram que independentemente da cultivar de milho utilizada e do teor de P do solo, a maioria dos microrganismos isolados apresentou uma baixa eficiência de liberação de Pi para o meio de cultivo. A maior parte dos microrganismos mineralizadores de fitato foram isolados de genótipos ineficientes para a utilização de P (L22 e Cateto).

As Tabelas 3 e 4 mostram que em média, microrganismos isolados da rizosfera de genótipos de milho eficientes na absorção de P apresentaram uma taxa de eficiência de liberação de P-fitato de cerca de 0,62% do fitato ou aproximadamente 6 mgP.L^{-1} nas condições do experimento. Similarmente, a eficiência de liberação do fitato por microrganismos isolados da rizosfera de genótipos de milho ineficientes foi de 0,65%. Com relação à eficiência de mineralização de Na-IHP pelos microrganismos provenientes da rizosfera de genótipos eficientes e ineficientes observou-se que 54,54% e 76% foram capazes de mineralizar mais de 50% do fitato.

TABELA 3 Microrganismos capazes de mineralizar Na-IHP isolados de genótipos eficientes de milho cultivados em alto e baixo teor de P.

Pi solo	Genótipos Eficientes	Isolado	Classe	% EM ⁽¹⁾	% EL ⁽²⁾	mgP.l ⁻¹ no sobrenadante
Alto P	L161	CNPMS13	F	48,26	0,11	1,11
Alto P	L161	CNPMS03	F	25,16	0,20	1,96
Alto P	L161	CNPMS 35	F	4,43	0,49	4,83
Alto P	L161	CNPMS 08	F	30,74	0,79	7,74
Alto P	L3	CNPMS 31	B	32,74	0,85	8,34
Alto P	L3	CNPMS 123	B	79,96	0,23	2,26
Alto P	L3	CNPMS 34	B	74,82	0,74	7,26
Alto P	L3	CNPMS 19	F	15,15	1,21	11,86
Alto P	L3	CNPMS 05	F	51,53	0,89	8,70
Alto P	L3	CNPMS 12	F	57,60	0,80	7,86
Alto P	BRS3060	CNPMS 112	F	91,64	0,75	7,34
Alto P	BRS3060	CNPMS 44	B	0	0	2,47
Alto P	BRS3060	CNPMS 45	F	90,19	0,47	4,65
Alto P	BRS3060	CNPMS 46	F	63,09	0,20	2,02
Alto P	BRS3060	CNPMS 47	B	90,19	1,66	16,31
Alto P	BRS3060	CNPMS 43	B	45,46	2,07	20,29
Baixo P	L161	CNPMS 07	F	48,55	0,46	4,54
Baixo P	L161	CNPMS 14	F	52,70	0,44	4,31
Baixo P	L161	CNPMS 111	F	45,07	0,39	3,79
Baixo P	L161	CNPMS 102	F	90,38	0,93	9,11
Baixo P	L3	CNPMS 32	F	70,80	0,38	3,77
Baixo P	L3	CNPMS 01	B	13,43	0,76	7,47

...continua...

TABELA 3, Cont.

Baixo P	L3	CNPMS 86	B	89,85	0,42	4,09
Baixo P	L3	CNPMS 98	F	23,59	0,24	2,38
Baixo P	BRS3060	CNPMS 25	B	95,62	1,12	10,98
Baixo P	BRS3060	CNPMS 73	B	59,93	0,78	7,66
Baixo P	BRS3060	CNPMS 13	F	92,33	0,39	3,77
Baixo P	BRS3060	CNPMS 50	F	84,08	0,33	3,22
Baixo P	BRS3060	CNPMS 25	F	89,69	0,68	6,67
Baixo P	BRS3060	CNPMS 18	F	65,05	0,56	5,54
Baixo P	BRS3060	CNPMS 10	F	19,17	0,36	3,56
Baixo P		CNPMS 04	B	37,00	0,48	4,73
Baixo P		CNPMS 44	B	0	0	

F: Fungo; B: Bactéria

⁽¹⁾ % Eficiência de mineralização P-fitato

⁽²⁾ % Eficiência de liberação de P

TABELA 4 Microrganismos capazes de utilizar Na-IHP isolados de genótipos ineficientes de milho cultivados em alto e baixo teor de P.

Pi solo	Genótipos	Isolado	Classe	% EM ⁽¹⁾	% EL ⁽²⁾	mgP.l ⁻¹ no sobrenadante
Alto P	L22	CNPMS27	F	77,86	0,24	2,34
Alto P	L22	CNPMS 133	B	5,96	0,98	9,61
Alto P	L22	CNPMS 14	F	62,40	0,19	1,89
Alto P	L22	CNPMS 100	F	79,68	0,16	1,54
Alto P	L22	CNPMS 27	F	69,56	1,30	12,71
Alto P	Cateto	CNPMS 132	B	67,93	0,17	1,66
Alto P	Cateto	CNPMS 32	F	71,01	0,24	2,38
Alto P	Cateto	CNPMS 125	B	97,52	0,75	7,40
Alto P	L53	CNPMS 94	F	83,29	0,18	1,81
Alto P	L53	CNPMS 98	F	96,78	0,42	4,13
Alto P	L53	CNPMS 11	F	94,10	0,78	7,64
Alto P	L53	CNPMS 34	F	24,74	0,82	8,08
BaixoP	L22	CNPMS 113	F	72,42	0,71	6,97
BaixoP	L22	CNPMS 18	F	93,3	0,33	3,20
BaixoP	L22	CNPMS 06	F	65,68	0,24	2,36
BaixoP	Cateto	CNPMS 132	F	79,98	0,69	6,79
BaixoP	Cateto	CNPMS 104	F	87,24	0,16	1,54
BaixoP	Cateto	CNPMS 105	F	37,72	0,40	3,95
BaixoP	Cateto	CNPMS 29	F	74,28	1,63	16,00
BaixoP	Cateto	CNPMS 120	F	7,69	0,74	7,24
BaixoP	Cateto	CNPMS 104	F	90,78	0,36	3,53
BaixoP	Cateto	CNPMS 108	F	22,64	1,23	12,06
BaixoP	Cateto	CNPMS 30	F	18,53	0,91	8,89
BaixoP	Cateto	CNPMS 110	F	92,69	2,06	20,21
BaixoP	Cateto	CNPMS 61	B	83,38	0,54	5,33

F: Fungo; B: Bactéria

⁽¹⁾ % Eficiência de mineralização P-fitato. ⁽²⁾ % Eficiência de liberação de Pi

4.3 Caracterização molecular dos fungos e bactérias capazes de utilizar Na-IHP

Para a caracterização molecular de alguns dos microrganismos isolados capazes de mineralizar o fitato de maneira mais eficiente, O DNA total foi extraído e a região do rDNA foi amplificada por PCR utilizando-se os primers universais para ITS1 / ITS4 para fungos e F968 / R1401 para bactérias. Não foram detectadas diferenças no tamanho dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em um seqüenciador ABI 3100. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com seqüências depositadas no GenBank Nucleotide Database utilizando os programas BLAST e Clustal 1.6. Entre os microrganismos estudados, foram encontrados fungos mineralizadores de fitato dos gêneros *Aspergillus* (CNPMS50, CNPMS63, CNPMS80, CNPMS87, CNPMS88, CNPMS90), *Penicillium* (CNPMS45), *Eupenicillium* (CNPMS26) , *Paecilomyces* (CNPMS101), *Talaromyces* (CNPMS73), *Mucor* (CNPMS69) e *Fusarium* (CNPMS65, CNPMS91), bactérias dos gêneros *Bacillus* (CNPMS194), *Pseudomonas* (CNPMS214), e alguns genótipos ainda não caracterizados (CNPMS02, CNPMS75, CNPMS184).

Os fungos do gênero *Aspergillus* isolados neste trabalho apresentaram grandes diferenças quando ao potencial de liberação, enquanto os isolados CNPMS87 e CNPMS88 foram capazes de liberar apenas 1,00 e 1,20% do Na-IHP, os isolados CNPMS63 e CNPMS90 liberaram entre 6,9 e 9%, e os isolados CNPMS88 e CNPMS50 16,20 e 21,00%, respectivamente. Com exceção do isolado CNPMS90, que foi capaz de mineralizar apenas 18,38% do fitato presente no meio de cultivo, todos os demais *Aspergillus* mineralizaram entre 46,14 a 92,25%. Fungos do gênero *Fusarium* isolados neste trabalho também apresentaram um bom potencial para mineralização do Na-IHP. O isolado CNPMS91 foi capaz de mineralizar 80,05% do fitato presente no meio e liberar

16,80% de Pi para o meio de cultivo. O isolado CNPMS65 liberou 17,00% de P presente no fitato de sódio para o meio de cultivo e mineralizou 40,56%. Outro gênero com potencial para mineralização de Pi a partir de fitato foi *Mucor* CNPMS69, com uma eficiência de liberação de 17,00% do Na-IHP para o meio de cultivo. Os demais gêneros seqüenciados, apesar de serem capazes de mineralizar mais de 50% do fitato presente no meio, não conseguiram liberar quantidades expressivas de Pi.

As bactérias isoladas, apesar de mineralizarem o fitato e crescerem em meio líquido, não tiveram uma alta eficiência de liberação de Pi. Os isolados CNPMS 2, CNPMS75, CNPMS184, CNPMS 194 e CNPMS 214 tiveram seu rDNA seqüenciado e foram identificadas por comparação com seqüências depositadas no banco de dados. Apenas as bactérias CNPMS 194 e CNPMS 214 apresentaram similaridade com seqüências conhecidas, *Bacillus* e *Pseudomonas*, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

O fósforo orgânico representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato, o qual apresenta baixa biodisponibilidade para as plantas. A associação de microrganismos e plantas ao nível da rizosfera é de fundamental importância para aumentar a hidrólise do fitato e melhorar a liberação de Pi para a utilização pelas plantas. A busca por microrganismos com uma atividade de fitase intra e/ou extracelular eficiente é de primordial importância, uma vez que estes microrganismos poderão ser utilizados diretamente como inoculantes ou como fontes de genes para processos biotecnológicos relacionados com a mineralização de Po.

Estudos de isolamento e caracterização de diferentes grupos de microrganismos que possuem atividade de fitase têm sido publicados. Gargova et al. (1997) estudaram 203 fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* e conseguiram selecionar uma espécie de *Aspergillus* com alta eficiência de produção de fitase extracelular. Sano et al. (1999) avaliaram cerca de 1200 estirpes de leveduras da coleção Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda, para sua eficiência de crescer em fitato como fonte de carbono e fosfato. A grande maioria dos isolados não cresceu. Entretanto, *Arxula adenivorans* apresentou um crescimento vigoroso, que foi correlacionado com atividade extracelular de fitase. Yanke et al. (1998) isolaram 22 espécies (334 estirpes) diferentes de bactéria anaeróbica do rúmen. As espécies *Selenomonas uiminatum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Mitsuokella multiacidus* e *Treponema* sp. mostraram atividade de fitase. Quatro espécies de bactérias mineralizadoras de fitato foram obtidas por Richardson & Hadobas (1997) após analisarem mais de 400 isolados de bactérias de diferentes solos. Mais de 300 bactérias capazes de utilizar Na-IHP foram isoladas de diferentes

regiões da rizosfera de *Lupinus albus*. Estes isolados foram capazes de crescer em Na-IHP como única fonte de C e P. Análise de seqüências do 16S rRNA foi conduzida em 73 isolados, sendo que 70 estirpes mostraram alta similaridade com o subgrupo das *Burkholderia* (Unno et al., 2005).

Poucos dados relacionados à colonização das raízes do milho por microrganismos mineralizadores de fosfato orgânico já foram publicados, Hussin et al. (2007) avaliaram diferentes regiões da rizosfera de milho quanto à presença de bactérias com atividade extracelular de fitase. Devido à grande importância econômica da cultura do milho e aos benefícios econômicos e ambientais que microrganismos capazes de mineralizar o fitato poderiam trazer para a agricultura, no atual trabalho, fungos e bactérias da rizosfera de milho foram analisados com relação a sua capacidade de utilizar fitato, o que indiretamente seleciona indivíduos que produzem algum tipo de fitase, intra ou extracelular.

A seleção de microrganismos capazes de utilizar fitato é normalmente realizada em duas etapas, um primeiro isolamento em meio sólido seletivo, seguido de uma confirmação em meio líquido. Alguns trabalhos têm relatado o crescimento de um grande número de colônias em meio sólido seletivo que não foram capazes de crescer em meio líquido (Gargova et al. 1997; Richardson & Hadobas, 1997). De acordo com Gargova et al. (1997) microrganismos quando cultivado em meio sólido, podem produzir ácidos diversos que diminuem o pH nas proximidades das colônias, resultando na liberação de uma quantidade de fósforo suficiente para o crescimento microbiano, portanto independente de uma atividade de fitase microbiana. Ademais, Richardson & Hadobas (1997) sugeriram que o número de microrganismos determinados usando crescimento microbiano apenas em meio sólido é superestimado com relação à proporção de microrganismos que realmente utilizam IHP. Segundo estes mesmos autores, é possível que esta discrepância seja, em parte, devida à presença no agar de

pequenas quantidades de Pi. Este fato também foi observado na pesquisa atual, em que nem todos os fungos e/ou bactérias selecionados em meio sólido foram capazes de crescer em meio líquido, sem Pi residual.

Na primeira etapa deste trabalho, microrganismos foram isolados independentemente da concentração de Pi presente no solo ou da cultivar de milho utilizada. Observou-se que a maioria dos isolados de fungos ou bactérias foram capazes de crescer em meio contendo fitato, o que indica a presença de uma atividade enzimática de degradação deste ácido orgânico, provavelmente algum tipo de fitase, uma vez que essas enzimas são bastante específicas para o substrato (Irving & Cosgrove, 1971; Shimizu, 1992).

Os fungos isolados no presente trabalho apresentaram um maior potencial em mineralizar o fitato presente em meio de cultivo quando comparados com as bactérias. Resultados semelhantes foram apresentados por Lissitska et al. (1999) analisando a capacidade de produção de fitase de microrganismos isolados de diferentes amostras de solos estocadas em museus. Os fungos isolados foram capazes de mineralizar o P de maneira mais eficiente do que as bactérias. No estudo de Volfova et al. (1994), foram isolados e caracterizados 132 microrganismos capazes de utilizar o fitato; apenas fungos apresentaram atividade de fitase extracelular. De acordo com a literatura, alta atividade de fitase microbiana é mais frequentemente detectada em fungo, particularmente em espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Volfova et al 1994, Gargova et al .,1997).

O isolado CNPMS50, *Aspergillus pseudolamari*, apresentou o melhor potencial de mineralização de fitato (21,00%) de todo o grupo de microrganismos isolados, entretanto os isolados CNPMS69 *Mucor hiemalis*; CNPMS65 *Fusarium* sp; CNPMS91 *Fusarium acutatum*; CNPMS88 *Aspergillus caelatus* também foram capazes de mineralizar, em média, 16,67% do Na-IHP presente no meio. Estes isolados apresentam potencial para serem utilizados

como inoculantes para culturas de milho, visando um melhor aproveitamento do fitato presente no solo. Os isolados CNPMS38, CNPMS53, CNPMS55, CNPMS74, CNPMS87 não liberaram quantidade significativa de Pi para o meio de cultivo, entretanto foram capazes de utilizar mais de 90,00% do fitato disponível, sugerindo que estes organismos apresentam atividade de fosfatase intracelular. Estes isolados poderão ser utilizados como fontes para estudos e caracterização de diferentes genes relacionados à degradação de fitato. Pinto et al. (2006) isolou e caracterizou 55 microrganismos de solos do cerrado quanto à produção de fitase, e relatou que a maior atividade de solubilização foi observado com isolados de fungo identificados geneticamente como *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

As bactérias isoladas no presente estudo não foram eficientes para disponibilizar Pi para o meio de cultivo, entretanto foram capazes de crescer utilizando fitato. Pelo menos cinco dos isolados bacterianos CNPMS15, CNPMS139, CNPMS175, CNPMS182 e CNPMS184 utilizaram mais de 90% do fitato do meio de cultivo. Duas das bactérias capazes de crescer em meio de cultivo contendo fitato, identificadas por seqüenciamento do rDNA como *Pseudomonas* e *Bacillus*, são comumente citadas na literatura como possuindo atividade de fitase bastante eficientes (Richardson & Hadobas, 1997; Vohra & Satyanarayana, 2003; Hussin et al., 2007). Hussin et al. (2007) isolaram, da raiz do milho, quatro espécies de *Bacillus* endofíticos com alta atividade de fitase. Vohra & Satyanarayana (2003) isolaram e caracterizaram várias bactérias quanto à habilidade de crescer utilizando fitato. Estes pesquisadores observaram que as fitases bacterianas, na maioria, estavam associadas com a célula, ou seja intracelular. Os resultados do presente trabalho também sugerem que as bactérias isoladas podem ter algum tipo de atividade de fitase intracelular, pois foram capazes de crescer em meio de cultivo líquido utilizando fitato como fonte de P.

Hussin et al., (2007) fizeram um estudo de 249 bactérias isoladas de diferentes regiões da raiz do milho (rizosfera, halosfera e endofitos). Todos os isolados endofíticos apresentaram atividade de fitase eficiente. A maioria das estirpes estudadas (83%) produziu fitase extracelular, mas 41 estirpes apresentaram atividade da fitase associada com o pelete celular. Os principais gêneros identificados foram *Staphylococcus lentus*, *S. xylosus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycooides*, *Brevibacillus laterosporus*, *Kocuria varians*.

Na segunda etapa deste trabalho, assumiu-se que diferentes concentrações de Pi presentes no solo, bem como diferentes cultivares de milho, poderiam influenciar na distribuição da população de microrganismos produtores de fitato. Portanto, analisou-se a presença de microrganismos capazes de mineralizar fitato em cultivares de milho (eficientes e não-eficientes na utilização de Pi) crescidos em solo contendo alto ou baixo teores de Pi. Independentemente da cultivar utilizada ou do tipo de solo em que ela foi cultivada, não foi observada nenhuma diferença na presença de microrganismos mineralizadores de fitato na rizosfera. Poucos dados relativos à presença de microrganismos mineralizadores de fitato comparando diferentes condições de manejo do solo existem na literatura. Richardson & Hadobas (1997) isolaram 238 bactérias de solos submetidos a vários tipos de manejo agrícola e observaram que as estirpes mais eficientes na mineralização de fitato vieram solos adubados com resíduos orgânicos. Estes autores concluíram que a faixa de microrganismos nos diferentes solos capazes de utilizar fitato ainda é desconhecida. Também, Unno et al. (2005) isolaram cerca de 300 bactérias da rizosfera de *Lupinus albus* crescidos em campos experimentais mantidos sob diferentes sistemas de adubação desde 1914 (+NPKS, +NPK, +NPS, +NKS, +PKS, -NPKS). Estes autores relataram que não foi observada uma diferença clara, quando da presença de microrganismos mineralizadores de fitato, entre os

diferentes “plots” que tinham sido submetidos a um longo período de fertilização química.

A maioria dos fungos e bactérias isolados na segunda etapa deste trabalho utilizou fitato como fonte de Pi para crescer, mas provavelmente não possuem uma fitase extracelular eficiente nas condições do experimento, pois não foram capazes de disponibilizar altas concentrações de Pi no meio de crescimento. Diferentes fitases possuem diferentes requerimentos para uma ótima atividade enzimática. Por exemplo, a faixa de pH em que as várias fitases atuam é bastante ampla, entre 2 a 10; o mesmo se observa em relação à temperatura, que pode variar de 38 a 77°C (Liu et al., 1998; Pandey et al., 2001; Pedersen et al., 2002). Richardson & Hadobas (1997) relataram que em pH 7.0 duas estirpes de *Pseudomonas* (CCAR59 e CCAR60), com as quais estavam trabalhando, cresciam e utilizavam sais de fitato eficientemente, já no pH 5.0 a estirpe CCAR59 apenas crescia. No trabalho atual, diferentes condições de crescimento microbiano, que pudessem favorecer uma atividade ótima de fitases não foram testadas portanto, não podemos afirmar que em diferentes condições de crescimento alguns destes microrganismos não fossem capazes de apresentar uma atividade de fitase mais eficiente. Entretanto, a presença de microrganismos que apresentam uma atividade extracelular eficiente de fitase no solo pode ser baixa, como sugerem os dados apresentados por Richardson & Hadobas, (1997). Estes pesquisadores testaram cerca de 200 colônias bacterianas isoladas de diversos solos para a habilidade de mineralizar Na-IHP, e encontraram que apenas 0,5% do total de bactérias cultiváveis puderam utilizar este sal como fonte de P e/ou C. Isto mostra que provavelmente, seria necessário aumentar a amostragem de solo utilizada no atual trabalho para ser possível detectar microrganismos com uma atividade de fitase mais eficiente e possíveis diferenças de colonização microbiana na rizosfera dos diferentes genótipos testados.

6 CONCLUSÃO

- 1) A rizosfera do milho é colonizada por fungos e bactérias com atividade mineralizadora de fitato;
- 2) Fungos isolados neste trabalho mostram uma taxa de liberação de Pi maior do que as bactérias;
- 3) Alguns dos fungos e bactérias caracterizados neste trabalho apresentam o potencial de serem utilizados como inoculantes para melhorar o desempenho de plantas de milho cultivadas em solos com altos teores de fitato;
- 4) Genes que codificam para enzimas capazes de mineralizar o fitato podem ser caracterizados e isolados a partir dos microrganismos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 1-8, 2002.

ABELSON, P. H. A potential phosphate crisis. **Science**, v.283, n.5410, p.2015, Mar. 1999.

ADAMS, M. A.; PATE, J. S. Availability of organic and inorganic forms of phosphorus to lupins (*Lupinus* spp.). **Plant Soil**, v. 145, p.107-113, 1992.

BANIK, S.; DEY, B.K. Available phosphate content of alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated – solubilizing microorganisms. **Plant and Soil**, p. 69, 353-364, 1982.

BIELESKI, R. L. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 225-252, 1973.

BOSSE, D.; KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. **Plant Cell Environmental**, v.21, p.325–332, 1998.

BRINCH-PEDERSEN, H.; OLESEN, A.; RASMUSSEN, S.K.; HOLM, P.B. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus phytase*. **Mol. Breeding**, v. 6, p. 195-206, 2000.

DALAL, R. C. Soil organic phosphorus. **Adv. Agronomy**, v. 29, p. 83–117, 1977.

FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDAS, C.; BROW, K. M.; LYNCH, J. P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Physiology**, v. 30, p. 1-14, 2003.

FINDENEGG, G. R.; NELEMANS, J. A. The effect of phytase on the availability of phosphorus from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. **Plant and Soil**, v. 154, p. 189-196, 1993.

FOHSE, D.; CLAASSEN, N.; JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, n.1, p. 101-109, 1988.

GORGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 221-224, 1997.

GÜSWELL, S. N. P. Ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, p. 243-266, 2004.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAMMOND, J. P.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. Genetic responses to phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 323-332, Sept. 2004.

HAYES, J. E.; RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperature pasture grass and legume seedlings. **Aust. Journal Plant Phytologist**, v. 26, p. 801-809, 1999.

HAYES, J. E.; SIMPSON, R.J.; RICHARDSON, A. E. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. **Plant and Soil**, v. 220, p.165-174, 2000.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v.237, p.133-195, 2001.

HINSINGER, P.; MARSCHNER, P. Rhizosphere perspectives and challenges a tribute. **Plant and Soil**, v. 283, n. 1/2, May 2006.

HOLFORD, I.C.R. Phosphorus, its measurements and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 227-239, 1997.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). **Plant Cell Reportes**, New York, v. 22, p. 793-800, 2004.

HUBEL, F.; BECK, E. Maize root phytase. Purification, characterization localization of enzyme activity and its putative substrate. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1429-1436, 1996.

HUSSIN, A.S.M.; FAROUK, Abd-ElAzim; GREINER, R.; SALLEH, H.M.; ISMAIL, A.F. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. **World Journal Microbiol. Biotechnol.**, v.23, p.653–1660, 2007.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–210, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 24 fev. 2007.

INTERNATIONAL FERTILIZES INDUSTRY ASSOCIATION. **Fertilizes.** Disponível em: <<http://www.fertilizes.org>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

IRVING, G.C.J.; COSGROVE, D.J. Inositol phosphate phosphatase of microbial origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. **Aust. Journal Biology Science**, v. 24, p. 547-557, 1971.

ISHIZAWA, S.; SUZUKI, T.; SATO, O.; TOYODA, H. Studies on microbial population in the rhizosphere of higher plants with special reference to the method of study. **Soil Plant Food**, v. 3, p. 85–94, 1957.

IYAMUREMYE, F.; DICK, R. P. Organic amendments and phosphorus sorption by soils. **Adv. Agronomy**, v. 56, p. 139–185, 1996.

KARTHIKETYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; MUKATIRA, U. T.; D'USZO, M. P.; DAMZ, B.; RAGHOTAMA, K. G. Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 1, p. 221-233, Sept. 2002.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O.A.; PINEROS, A.A. How do crop plants tolerance acid soil? mechanisms of aluminium tolerance and phosphorus efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-93, 2004.

KUCEY, R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, n. 4, p. 671-678, 1983.

KUCEY, R.M.N.; JANZEN, H.H.; LEGGETT, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 199-228, 1989.

LARSEN, S. Soil phosphorus. **Advances in Agronomy**, v. 19, p. 151-210, 1967.

LENTON, T. M. The role of land plants, phosphorus weathering and are in the rise and regulation of atmospheric oxygen. **Global Change Biology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 613-629, 2001.

LIGABA, A.; SHEN, H.; SHIBATA, K.; YAMAMOTO, Y.; TANAKAMARU, S.; MATSUMOTO, H. The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 4, p. 575-584, 2004.

LI, M.; OSAKI, M.; RAO, I. M.; TADANO, T. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. **Plant Soil** v. 195, p. 161-169, 1997.

LIU, H.; TRIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.11, p.14-22, 1998.

LISSITKAYA, T.B.; SHMELEVA, V.G.; VARDOIAN, G.S.; YAKOVLEV, V.I. Screening of microorganism producing phytase. **Mikologiya I Fitopatologiya**, v. 33, n. 6, p. 402-405, 1999.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho 'Saracura BRS-4154' sob encharcamento contínuo**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LOPÉZ-BUCIO, J.; NEITO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUES, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolim in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 1, p. 1-13, Dec. 2000.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1989. 201 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic, 1995. 889p.

MILLER, S. S.; LIU, J.; ALLAN, D. L.; MENZHUBER, C. J.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed White Lupin. **Plant Physiology**, v. 127, p. 594-606. Oct. 2001.

MUCHHAL, U. S.; RAGHOTAMA, K. G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872, 1999.

MUDGE, S. R.; SMITH, F. W.; RICHARDSON, A. E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. **Plant Science**, v. 165, p. 871-878, 2003.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. **Plant Cell Reporters**, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

PINTO, A.; GONÇALVES NETO, M.M.; BARBEDO, J.D. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.3, maio/jun. 2006.

RAGHOTAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, New York, v. 216, n. 1, p. 23-37, 2002.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P. R. (Ed.). **Soil biota management in sustainable farming systems**. Melbourne: CSIRO, 1994. p. 50-62.

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.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P. A. Soil isolantes of *Pseudomonas* spp. That utilize inositol phosphates. **Canadian Journal Microbiology**, v. 43, p. 509-516, 1997.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. **Plant Cell Environmental** v. 23, p. 397–405, 2000.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. **Australian Journal Plant Physiology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 641-649, Mar. 2001.

SANO, E. E.; BARCELLOS, A. de O.; BEZERRA, H. S. **Área e distribuição espacial de pastagens cultivadas no cerrado brasileiro**. Planaltina, DF: 1999. Embrapa Cerrados. 21p. (Boletim de Pesquisa, 3).

SANYAL, S. K.; De DATTA, S. K. Chemistry of phosphorus transformations in soil. **Adv. Soil Science**, v. 16, p. 1-120, 1991.

SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. **Boscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, p. 1266-1269, 1992.

SCHUNMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; VICKERS, C. E.; DELHAIZE, E. Promoter analysis of the barley Pht1; 1 Phosphate transporter gene identifies regions /controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 4, p. 4205-4214, Dec. 2004.

STEVENSON, F. J. **Cycles of soil: carbono, nitrogen, phosphorus, sulfur and micronutrients**. New York: J. Willey, 1986. p.380.

SUBBA RAO, N.S. (Ed.). **Advances in agricultural microbiology**. Oxford: Oxford and IBH, 1982. p. 229–305.

TANDANO, T.; SAKAI, H. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 37, p. 129-140, 1991.

THOMPSON, L.U. Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose response. In: _____. **Phytic acid: chemistry and applications**. Minnesota: E. Graf. Pilatus, 1986. p. 173–194.

UNNO, Y.; OKUBO, K.; WASAKI, J.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 396-404, 2005.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, n. 3, p. 423-447, 2003.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological application. **Critical Review Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 28-60, 2003.

VOLFOVA, O.; DVORAKOVA, J.; HANZLIKOVA, A.; JANDERA, A. Phytase from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiology**, v. 39, p. 481-484, 1994.

WASAKI, J.; YONETANI, R.; KURODA, S.; SHINANO, T.; YAZAKI, J.; FUJII, F.; SHIMBO, K.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; SASAKI, T.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S.; YAMAGISHI, M.; OSAKI, M. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1515-1523, Sept. 2003.

WHIPPS, J. M. Carbon economy. In: LYNCH, J.M. (Ed.). **The rhizosphere**. John Chichester, West Sussex, UK: J. Wiley, 1990. p. 59–97.

WODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Phytase. **Advance Applied Microbiology**, v. 42, p. 263-302, 1996.

YANKE, L.J, BAE, H.D.; SELINGER, L.B.; CHENG, K.J. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. **Microbiology**, v.144, p.1565–1573, 1998.