



MARCO ESTEBAN GUDIÑO GOMEZJURADO

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR FUNGOS
DO SOLO E EFICIÊNCIA DE SUA
INOCULAÇÃO EM CAUPI E MILHO**

LAVRAS – MG

2012

MARCO ESTEBAN GUDIÑO GOMEZJURADO

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO FUNGOS DO SOLO E EFICIÊNCIA
DE SUA INOCULAÇÃO EM CAUPI E MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Fátima Maria de Souza Moreira

Coorientadores

Prof. Ludwig H. Pfenning

Dr. Lucas Magalhães de Abreu

LAVRAS - MG

2011

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

Gomezjurado, Marco Esteban Gudiño.

Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua
inoculação em caupi e milho / Marco Esteban Gudiño Gomezjurado.
– Lavras : UFLA, 2011.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Fungos solubilizadores de fosfato. 2. *Haematonectria
ipomoeae*. 3. *Pochonia clamydosporea* var. *catenulata*. 4.
Acremonium polychromum. 5. Desenvolvimento vegetal. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

MARCO ESTEBAN GUDIÑO GOMEZJURADO

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO FUNGOS DO SOLO E EFICIÊNCIA
DE SUA INOCULAÇÃO EM CAUPI E MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de dezembro de 2011.

Dr. Fábio Lopes Olivares	UENF
Dr. Lucas Magalhães de Abreu	UFLA
Dr. Ludwig H. Pfenning	UFLA

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
Orientadora

Prof. Ludwig H. Pfenning
Dr. Lucas Magalhães de Abreu
Coorientadores

LAVRAS - MG

2011

Aos meus pais, ao meu irmão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de toda sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos mediante o Programa Estudante Convênio Pós-Graduação (PEC-PG).

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação e pelos ensinamentos passados.

Ao professor Ludwig Pfenning e ao doutor Lucas Magalhães de Abreu, pelos conhecimentos transmitidos, motivação e paciência.

Ao professor Fábio Lopes Olivares, ao professor Ludwig H. Pfenning e ao doutor Lucas Magalhães de Abreu, pela participação na banca examinadora

À senhorita Ana Karla Freitas M. Machado e aos técnicos Marlene Aparecida de Souza, Manoel Aparecido da Silva e Edson Luís Rezende, pela contribuição na execução das análises.

RESUMO

O processo da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas é realizado por bactérias nodulíferas possuidoras da enzima nitrogenase, que catalisa a redução do nitrogênio molecular a amônio, que é assimilado pelas plantas. Apesar da alta diversidade do Reino Fungi, relatos sobre a solubilização de fosfatos por fungos têm se restringido aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Isto se deve às técnicas usualmente utilizadas para isolamento que favorecem fungos com rápida capacidade de esporulação. A interação sinérgica conseguida mediante a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio e de fungos solubilizadores de fosfato pode favorecer o desenvolvimento vegetal e o aumento da produção agrícola. Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a capacidade de diversos gêneros e espécies de fungos, isolados pela técnica de lavagem e filtração de partículas de solo de diferentes sistemas de uso de solo da Amazônia Brasileira, em solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido; determinar a influência dos isolados selecionados em promover o crescimento de caupi cultivar Gurgueia BR17 e de milho cultivar BR026, utilizando fósforo insolúvel [P-Ca₃(PO₄)₂] como única fonte de fosfato e determinar a efetividade da inoculação de dois isolados de fungos solubilizadores fosfato de cálcio e de um isolado não solubilizador no meio PVK ágar, com as estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA 03-84 e INPA 03-11B, em promover o crescimento de caupi utilizando fósforo insolúvel como fonte de fosfato e baixa concentração de nitrogênio disponível sob condições axênicas. Neste trabalho relatam-se, pela primeira vez, quatorze isolados de diferentes gêneros de fungos saprofitos pertencentes ao Filo Ascomycota com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio no meio de cultura PVK, a ausência de inibição de crescimento entre todos os isolados de fungos e as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. mediante a técnica de cultura dupla e o potencial de dois isolados de fungos solubilizadores de fosfato e de um isolado não solubilizador em aumentar significativamente (p<0.05) a massa da matéria seca da parte aérea nos tratamentos que receberam inoculação dos microrganismos quando comparados com os controles sem inoculação.

Palavras-chave: Fungos solubilizadores de fosfato. Fixação Biológica de Nitrogênio. *Haematonectria ipomoeae*. *Pochonia clamydosporia* var. *catenulata*. *Acremonium polychromum*. *Bradyrhizobium*. *Vigna unguiculata* [L.] Walp. *Zea mays* L.

ABSTRACT

The process of biological nitrogen fixation in leguminous is achieved by bacteria forming nodules possessing the nitrogenase enzyme that are able to catalyze the reduction of molecular nitrogen to ammonia which is assimilated by the plants. Despite the high diversity of the Kingdom Fungi, reports on the solubilization on phosphates by fungi have been restricted to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. This is due to the techniques used for isolation that favor fungi with fast sporulation capacity. The synergistic interaction achieved by inoculation of nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizing fungi could promote the plant growth and increase the agricultural production. The objectives of this study were to evaluate the ability of various genera and species of fungi, isolated by filtration and washing of soil particles technique from different land use systems in the Brazilian Amazon, to solubilize calcium phosphate in solid medium; evaluate the influence of selected strains to promote the growth of cowpea cultivar BR17 and maize cultivar BR026 using insoluble phosphorus [P-Ca₃(PO₄)₂] as the sole source of phosphate and evaluate the effectiveness of the co inoculation of two strains of calcium phosphate solubilizing fungi and an unable strain to solubilize calcium phosphate in the PVK agar medium with the *Bradyrhizobium* strains UFLA03-84 and INPA03-11B to promote the growth of cowpea using insoluble phosphorus as source of phosphate and low concentration of available nitrogen under axenic conditions. We report, the first time, fourteen strains of different genera of saprophytic fungi of the Ascomycota phylum capable of solubilize calcium phosphate in PVK agar medium, the absence of growth inhibition among all fungi strains and the two *Bradyrhizobium* sp. strains by dual culture technique and the capacity of two strains of phosphate solubilizing fungi and a strain unable to solubilize phosphate to increase the shoot dry matter of the treatments with inoculation significantly ($p < 0,05$) when compared with uninoculated controls.

Keywords: Phosphate solubilizing fungi. Nitrogen Biological Fixation. *Haematonectria ipomoeae*. *Pochonia clamydosporia* var. *catenulata*. *Acremonium polychromum*. *Bradyrhizobium*. *Vigna unguiculata* [L.] Walp. *Zea mays* L.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Fixação biológica de nitrogênio por bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio	11
2.2	Descrição de <i>Bradyrhizobium</i> spp.	12
2.3	Disponibilidade de fosfato nos solos	13
2.4	Fungos solubilizadores de fosfato	15
2.5	Interações entre fungos e bactérias	17
2.6	Inoculantes microbianos à base de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio e fungos	18
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE	27
	ARTIGO 1 Solubilização de fosfato por diversos gêneros de fungos saprofiticos e sua influência no crescimento de milho e de caupi	27
	ARTIGO 2 Interações entre fungos solubilizadores de fosfato e <i>Bradyrhizobium</i> sp. no crescimento de caupi	50

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O fósforo e o nitrogênio são dois elementos indispensáveis para o desenvolvimento vegetal. Muitas das reservas de fósforo no solo encontram-se imobilizadas na forma de sais insolúveis, ficando indisponíveis para as plantas. Quando se usa fertilizantes à base de fosfatos, uma parte passa rapidamente à forma insolúvel. Entre os fungos do solo, algumas espécies apresentam a capacidade de solubilizar o fosfato a partir da forma inorgânica insolúvel mediante mecanismos dependentes da diminuição do pH (produção de ácidos orgânicos e reações de intercâmbio), síntese de fosfatases e por reações de quelatação dos metais aos quais o ânion fosfato encontra-se ligado.

Apesar da diversidade existente no Reino Fungi, os trabalhos sobre fungos solubilizadores de fosfato consideram apenas isolados dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* caracterizados por apresentar esporulação abundante e crescimento rápido, o que faz que sejam facilmente isolados pela técnica de diluição e posterior plaqueamento. O isolamento de uma maior diversidade de fungos que crescem ativamente em forma de micélio nas partículas de solo é conseguido mediante a técnica de lavagem dessas partículas, portanto, a diversidade de fungos capazes de solubilizar fosfato pode ser bem maior que a conhecida, se os microrganismos isolados forem avaliados por meio dessa técnica.

A maior parte do nitrogênio encontra-se na biosfera na forma diatômica (N_2) e, sob essa conformação química, não pode ser utilizado pelas plantas. A disponibilização desse elemento é conseguida mediante o processo de fixação biológica realizado por alguns gêneros de procariotos possuidores da enzima

nitrogenase, que catalisa a reação de redução de N_2 a amônia. Entre esses microrganismos encontram-se os pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

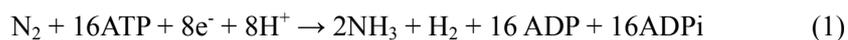
O caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e o milho (*Zea mays* L.) são duas espécies vegetais amplamente utilizadas como alimento no Brasil. Segundo dados da FAO, este país é o terceiro produtor mundial dessas duas espécies que são cultivadas em solos deficientes em nitrogênio e em fósforo, o que ocasiona limitações à produção agrícola. Os inoculantes microbianos baseados em bactérias diazotróficas e fungos solubilizadores de fosfato poderiam suprir os requerimentos de nitrogênio e de fósforo dessas espécies vegetais, sendo prioritária a ausência de inibição entre esses microrganismos.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a capacidade de diversos gêneros e espécies de fungos, isolados pela técnica de lavagem e filtração de partículas de solo de diferentes sistemas de uso de solo da Amazônia brasileira, em solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido; determinar a influência dos isolados selecionados em promover o crescimento de caupi e de milho, utilizando fósforo insolúvel como única fonte de fosfato e determinar a efetividade de dois dos isolados de fungos solubilizadores fosfato de cálcio e de um isolado não solubilizador no meio Pikovskaya ágar, inoculados em associação com as estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA 03-84 e INPA 03-11B, em promover o crescimento de caupi utilizando fósforo insolúvel como fonte de fosfato e baixa concentração de nitrogênio disponível sob condições axênicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação biológica de nitrogênio por bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio

Os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium*, *Shinella*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phylobacterium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, *Devosia*, *Burkholderia* e *Cupriavidus* são capazes de estabelecer relações simbióticas com plantas leguminosas mediante a formação de nódulos nas raízes (LINDSTRÖM et al., 2006; MOREIRA, 2010). No interior destas estruturas vegetativas o nitrogênio atmosférico molecular (N₂) é reduzido a amônia (NH₃), a qual é utilizada como fonte de nitrogênio pela planta. A transformação do nitrogênio molecular a amônia é catalisada pela enzima nitrogenase, sendo sua forma mais comum a Mo-nitrogenase, composta por duas metaloproteínas, MoFe e FeMoCo (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). O processo de redução do nitrogênio é explicado pela seguinte equação:



Uma das características mais relevantes desta interação simbiótica é a sua especificidade. Isso significa que cada espécie bacteriana possui um número determinado de hospedeiros, podendo este número ser amplo ou não, dependendo da capacidade da bactéria de infectar e nodular muitas ou poucas espécies de plantas, respectivamente (PUPOT; MARTÍNEZ-ROMERO; PROMÉ, 1993). Portanto, uma espécie de rizóbio não vai ser capaz de formar nódulos com todas as espécies de leguminosas, estabelecendo um grupo bem

definido de espécies vegetais que serão hospedeiras de espécies bem definidas de rizóbios.

A infecção e o processo de nodulação são controlados por genes da bactéria e da planta. A expressão dos genes bacterianos de nodulação (*nod* e *nol*) é ativada por flavonoides secretados pelas raízes das plantas. Esse processo garante a síntese de compostos extracelulares denominados fatores lipoquitoligossacarídeos Nod (OLDROYD; DOWNIE, 2004), os quais vão induzir o encurvamento dos pelos radiculares (GAGE, 2004), com a consequente formação do primórdio do nódulo e o seu desenvolvimento, permitindo a expressão dos genes bacterianos *nif* (*nifHDKYQENXUSVWZ*), que codificam para a enzima nitrogenase (DIXON; KAHN 2004; FISCHER, 1994), dando início à fixação simbiótica de nitrogênio pelos bacteroides localizados no interior do nódulo (JONES et al., 2007).

2.2 Descrição de *Bradyrhizobium* spp.

Até 1982, as espécies do gênero *Rhizobium* foram classificadas em função das espécies das leguminosas hospedeiras nas quais desenvolviam os nódulos. sendo esse o parâmetro que determinava a espécie da bactéria.

O gênero *Bradyrhizobium* foi descrito posteriormente correspondendo a bacilos gram-negativos curtos (0,5 µm a 0,9 µm x 1,2 µm a 3,0 µm), aeróbios, não formadores de esporos, móveis com um flagelo polar ou subpolar. As colônias de *Bradyrhizobium* spp. são de crescimento lento no meio extrato de levedura manitol (YMA), circulares, convexas, com diâmetro não maior do que 1 mm depois de serem incubadas entre 5-7 dias, a temperaturas entre 25 a 30 °C, produzindo reação alcalina no meio manitol com sais minerais depois da incubação por 28 dias, a 27 °C (JORDAN, 1982). Neste gênero encontram-se atualmente dez espécies descritas, que são *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B.*

liaoningense, *B. yuanmingense*, *B. betae*, *B. canariense*, *B. iriomotense*, *B. jicamae*, *B. pachyrhizi* e *B. cytisi* (MOREIRA, 2010).

Espécies de *Bradyrhizobium* nodulam raízes de algumas leguminosas de regiões de clima tropical e temperado dos gêneros *Glycine*, *Vigna*, *Macroptilium*, *Aeschynomene*, *Alysicarpus*, *Crotalaria*, *Eriosema* e *Indigofera*. Nos nódulos dessas espécies vegetais os bacteroides aparecem ligeiramente inchados, com inclusões de poli- β -hidroxibutirato (KUYKENDALL, 2005).

No Brasil, existem ao redor de 100 estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio recomendadas pela Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) e autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para diversas leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dentre elas estão as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-84 (=SEMIA 6461; número no GenBank: EF158574) e INPA 03-11B (=SEMIA 6463; número no GenBank: EF158575) para o feijão caupi (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006).

2.3 Disponibilidade de fósforo nos solos

O fósforo é o segundo elemento mais importante, após o nitrogênio, para as plantas. A grande parte do fósforo nos solos com pH ácido encontra-se na forma insolúvel de sais de ferro ou de alumínio, fazendo que este elemento não possa ser utilizado pelos vegetais (VASSILEV et al., 2001). Com o propósito de incrementar a disponibilidade de fósforo para as raízes, grandes quantidades de fertilizantes à base deste mineral são aplicadas durante as práticas agrícolas, trazendo consequências como a perturbação da diversidade microbiana no solo (GYANESHWAR et al., 2002). Leva-se em consideração o fato de que a aplicação de fósforo poderia ser um fator importante na mudança da comunidade microbiana durante o manejo agrícola de pastagens de montanha (*Agrostis*

capillaris, *Festuca ovina* e *Lolium perenne* (ROONEY; CLIPSON, 2009). Da mesma maneira, uma grande proporção deste elemento é rapidamente transformada na forma insolúvel (OMAR, 1998), fazendo com que a quantidade do fósforo suplementado torne-se indisponível para as plantas, resultando necessária a sua aplicação contínua (ABDALLA, 1994).

Muitas espécies de bactérias, fungos, leveduras e actinobactérias são capazes de solubilizar fósforo a partir de fontes biodisponíveis (ABDALLA, 1994; GOLDSTEIN, 1986; HALDER; MISHRA; CHAKABARTHY, 1991; WHITELAW; HARDEN; HELYAR, 1999). Esses microrganismos poderiam ser utilizados como alternativa para disponibilizar o fosfato para as plantas, o que poderia garantir a utilização sustentável de fertilizantes à base desse elemento, permitindo o melhoramento da produção agrícola, além de estarem envolvidos em processos que afetam a transformação de fósforo no solo, constituindo-se em componentes integrais do ciclo deste elemento (EL-AZOUNI, 2008).

Entre os mecanismos que os microrganismos utilizam para solubilizar o fósforo estão: diminuição de pH mediante a produção de ácidos, quelação de íons e reações de intercâmbio na interface solo rizosfera (WHITELAW; HARDEN; HELYAR, 1999). Tanto bactérias como fungos apresentam essa capacidade. Entre as bactérias, nos gêneros mais estudados incluem-se *Pseudomonas* e *Bacillus* (ILLMER; SCHINNER, 1992). A espécie *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* tem relevância porque é amplamente utilizada como inoculante bacteriano, enquanto entre os fungos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais estudados em relação a esta capacidade (SOUCHIE et al., 2006; WAKELIN et al., 2004). Ahmad e Jha (1968) evidenciaram que os fungos conseguem se desenvolver em solos com pH ácido, além de terem maior capacidade para solubilizar fosfato do que as bactérias (NAHAS, 1996) devido à sua maior variedade na produção de ácidos com relação a estas últimas (VENKATESWARLU et al., 1984). Portanto, estes microrganismos poderiam

apresentar uma potencial aplicação como inoculantes que permitam a solubilização de fosfato e contribuam para melhorar a produção agrícola.

2.4 Fungos solubilizadores de fosfato

Kucey (1983) reportou uma densidade populacional de fungos solubilizadores de fosfato de 0,1% em relação à população total de fungos em solos da região de Alberta, Canadá, além de a capacidade para solubilizar fósforo por esses microrganismos ser mais bem conservada do que nas bactérias após culturas sucessivas sob condições de laboratório.

Narsian e Patel (2000) evidenciaram a capacidade de *Aspergillus aculeatus* de solubilizar fosfato a partir de rocha de fosfato. Da mesma maneira, algumas espécies de *Penicillium* apresentam esta característica. Por exemplo, *P. purpurogenum* foi eficiente na solubilização de rocha de fosfato em relação ao controle, conforme analisado sob condições de laboratório (NAHAS, 1996) e *P. bilaji* foi capaz de disponibilizar fosfato a partir de rocha de fosfato em culturas de trigo (*Triticum aestivum*) e de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (KUCEY, 1987).

Além de *Penicillium* e *Aspergillus*, a diversidade de fungos capazes de solubilizar fosfato foi descrita em outros gêneros. Dos 56 artigos encontrados na base de dados ISI Web of Knowledge, em março de 2011, sobre este assunto, 48 tratavam de espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, e um número bem menor de artigos (8) tratou dos gêneros *Cladosporium*, *Scytalidium*, *Stachybotrys*, *Tolypocladium*, *Mortierella*, *Beauveria*, *Mucor* e *Talaromyces* (Quadro 1).

Quadro 1 Gêneros, origem e meio de cultura de isolamento de fungos diferentes aos gêneros *Aspegillus* e *Penicillium* com capacidade para solubilizar fosfato

Gênero	Meio de cultura utilizado	Origem	Referência
<i>Beauveria</i>	MMN+ fosfato de zinco	Solo, Escócia	Fomina et al. (2004)
<i>Cladosporium</i>	Meio de Richard+fosfato de cálcio	Solo, Índia	Sethi e Subba-Rao (1968)
<i>Cladosporium</i>	Pikovskaya	Solo, Índia	Singh e Kapoor (1999)
<i>Mortierella</i>	Meio 1: (1,0 g NaCl, 0,2 g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,4 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,0 g NH ₄ NO ₃ , 10,0 g glicose, 7,0 g ágar, 3,5 g rocha fosfórica) L ⁻¹ ; Meio 2: (6,0 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 20,0 g protease peptona, 15 mL glicerol, 7,0 g ágar e 3,5 g rocha fosfórica) L ⁻¹ ; Meio 3: (0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,02 g MnSO ₄ ·H ₂ O, 0,02 g FeSO ₄ ·7H ₂ O, 10,0 g glicose, 7,0 g ágar, 7,7 g rocha fosfórica) L ⁻¹	Rizosfera de <i>L. leucocephala</i> , Hawaii	Osorio e Habte (2001)
<i>Mucor</i>	NBRIP	Solo de minas de fosfato/China	Xiao et al. (2008, 2009)
<i>Scytalidium</i>	Pikovskaya	Solo	Reddy e Reddy (1987)
<i>Stachybotrys</i>	Pikovskaya	Solo	Reddy e Reddy (1987)
<i>Talaromyces</i>	NBRIP	Solo, Argentina	Scervino et al. (2010)
<i>Tolyposcladium</i>	Pikovskaya	Solo	Reddy e Reddy (1987)

2.5 Interações entre fungos e bactérias

Os microrganismos são capazes de estabelecer interações positivas, negativas ou neutras entre eles. No solo e na rizosfera as interações entre fungos e bactérias facilitam a degradação de vários compostos químicos, incluindo os exsudatos das raízes (BULLER et al., 2003). Como produto dessas interações o crescimento bacteriano pode ser favorecido pelo surgimento de nichos formados a partir de substâncias produzidas pelos fungos, fazendo com que a hifosfera, de fungos saprofíticos, e a micorrizosfera, no caso das micorrizas, tornem-se habitats favoráveis para o maior crescimento de bactérias em relação ao solo não rizosférico (BOER et al., 2005).

Essas interações facilitam o surgimento de ambientes favoráveis para os microrganismos, permitindo a expressão de características particulares que poderiam favorecer o desenvolvimento vegetal. Já, entre ectomicorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio a atividade da nitrogenase dessas últimas é favorecida pelo consumo do oxigênio associado à atividade respiratória dos fungos (LI; MASSICOTE; MORE, 1992). Da mesma maneira, os fungos interagem com as raízes das espécies vegetais fazendo com que mudem a quantidade e a qualidade dos exsudatos, o que, por sua vez, influencia a comunidade bacteriana circundante (AMORA-LAZCANO; VAZQUEZ; AZCON, 1998; JOHANSSON; PAUL; FINLAY, 2004).

No caso das bactérias, esses microrganismos também podem desenvolver interações positivas ou negativas com os fungos. Assim, algumas estirpes de *Pseudomonas putida* podem induzir a formação de corpos de frutificação e a esporulação em Basidiomicetos (CHO et al., 2003; RAINEY et al., 1990). No entanto, outros procariotos estão envolvidos na inibição do crescimento e da esporulação dos fungos no ambiente circundante mediante a produção de ácido cianídrico, antibióticos, enzimas líticas, substâncias voláteis e

fatores quelantes (HANDELSMAN; STABB, 1996; WHEATLEY, 2002), ou utilizando o fungo como substrato nutricional através do processo de micofagia (INBAR; CHET, 1991), sendo que os fungos também podem interagir da mesma maneira, utilizando as bactérias como fonte nutricional (DUFFY; SCHOUTEN; RAAIJMAKERS, 2003).

Alguns gêneros de bactérias podem ser endosimbiontes de fungos, como, por exemplo, entre o fungo micorrízico *Gigaspora margarita* e determinados gêneros do filo Proteobacteria, favorecendo a relação mutualista entre esses microrganismos (BIANCIOTTO et al., 2003).

Assim, a ampla diversidade de interações que podem acontecer entre bactérias e fungos pode contribuir para a manutenção do equilíbrio nos ecossistemas e potencialmente favorecer a produção agrícola.

2.6 Inoculantes microbianos à base de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio e fungos

Encontra-se bem estabelecida a utilização de inoculantes microbianos na agricultura e na horticultura para melhorar a nutrição da planta, o seu crescimento e a inibição de pragas e patógenos. Entre todos os inoculantes bacterianos, os mais conhecidos são aqueles constituídos por diferentes espécies de rizóbios, os quais têm sido comercializados há cem anos (HIRSCH, 2004). No Brasil, por exemplo, a utilização de espécies do gênero *Bradyrhizobium* como inoculante tem possibilitado aumentar os rendimentos na produção de soja (*Glycine max*) (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003).

As pesquisas em relação ao efeito sinérgico entre as estirpes de *Rhizobium* junto a outros microrganismos não são recentes (BROCKWELL; BOTTOMLEY, 1995). A dupla inoculação de *Rhizobium* e micorrizas arbusculares em alfalfa foi documentada por Smith e Daft (1977), os quais

demonstraram o efeito benéfico adicional das hifas do fungo na absorção de nutrientes em locais distantes da raiz da leguminosa que, de outra maneira, não estariam disponíveis para a planta.

Da mesma maneira, foi descrito o efeito sinérgico entre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos solubilizadores de fosfato não micorrízico. Por exemplo, Rice, Olsen e Legget (1995) evidenciaram que a associação entre *Rhizobium meliloti* e *Penicillium bilaii* incrementou a nodulação nas raízes de *Medicago sativa*. Portanto, estas associações podem contribuir para melhorar a produção agrícola (DUDEJA; KHURANA; KUNDU, 1981; MEHANA; WAHID, 2002; ZAIDI; KHAN; AMIL, 2003). Assim, o desenvolvimento de inoculantes baseados em fungos solubilizadores de fosfato e bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio poderiam ser uma alternativa para conseguir este propósito.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contribuição de processos microbianos para a nutrição de espécies vegetais pode favorecer a manutenção dos ecossistemas e a produção agrícola. As interações entre fungos solubilizadores de fosfato e as espécies vegetais podem suprir os requerimentos deste nutriente para essas últimas, especialmente em solos com pouca disponibilidade desse ânion. Isso é conseguido mediante mecanismos dependentes da diminuição do pH, da síntese de fosfatases ou da quelatação. Dentre as espécies com esta capacidade, aquelas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido amplamente estudadas. No entanto, a diversidade de gêneros capazes de solubilizar fosfato pode ser bem mais ampla do que a descrita, requerendo ser elucidada.

As interações mutualistas entre bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio capazes de disponibilizar esse elemento para o desenvolvimento em várias espécies de leguminosas são conseguidas mediante mecanismos específicos de interação molecular entre o procarioto e a planta.

Portanto, a inoculação de fungos solubilizadores de fosfato e de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio em solos com baixa disponibilidade desses dois elementos pode contribuir para o desenvolvimento e a melhoria na produção agrícola, porém, resulta ser necessário avaliar a compatibilidade entre esses microrganismos e os efeitos dessas associações sob condições controladas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. H. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 294-296, May 1994.
- AHMAD, N.; JHA, K. K. Solubilization of rock phosphate by microorganisms isolated from Bihar soils. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 14, n. 1, p. 85-95, 1968.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 1-9, May 2003.
- AMORA-LAZCANO, E.; VAZQUEZ, M. M.; AZCON, R. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 123-137, May 1998.
- BIANCIOOTTO, V. et al. *Candidatus Glomeribacter gigasporum* gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 1, p. 121-124, Jan. 2003.
- BOER, W. et al. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 29, n. 4, p. 795-811, Sept. 2005.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p. 683-697, Apr./May 1995.
- BULLER, J. L. et al. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6793-6800, Nov. 2003.
- CHO, Y. S. et al. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 218, n. 2, p. 271-276, Jan. 2003.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 8, p. 621-631, Aug. 2004.

DUDEJA, S. S.; KHURANA, A. L.; KUNDU, B. S. Effect of *Rhizobium* and phosphomicroorganisms on yield and nutrient uptake in chickpea. **Current Science**, Bangalore, v. 50, n. 11, p. 503-505, June 1981.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 501-538, Sept. 2003.

EL-AZOUNI, I. M. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine Max L.*) plants. **Journal of Applied Sciences Research**, Ma'an, v. 4, n. 6, p. 592-598, June 2008.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 58, n. 3, p. 352-386, Sept. 1994.

FOMINA, M. et al. Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. **Geomicrobiology Journal**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 351-366, July 2004.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELEMERIC, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, n. 1/2, p. 35-59, Aug. 2009.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 2, p. 280-300, June 2004.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 51-57, Apr. 1986.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 83-93, Aug. 2002.

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; CHAKABARTHY, P. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Bradyrhizobium*. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 29, n. 2, p. 28-31, Feb. 1991.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soil-borne pathogens. **The Plant Cell**, Arlington, v. 8, n. 10, p. 1855-1869, Oct. 1996.

HIRSCH, P. R. Release of transgenic bacterial inoculants: rhizobia as a case study. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 1/2, p. 1-10, Jan. 2004.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 389-395, Apr. 1992.

INBAR, J.; CHET, I. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne pathogens by this bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 973-978, Oct. 1991.

JOHANSSON, J. F.; PAUL, L. R.; FINLAY, R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 48, n. 1, p. 1-13, Apr. 2004.

JONES, K. M. et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium - Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 9, p. 619-633, Aug. 2007.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, n. 1, p. 136-139, Jan. 1982.

KUCEY, R. M. N. Increased Phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 12, p. 2699-2703, Dec. 1987.

_____. Phosphate: solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 671-678, Nov. 1983.

KUYKENDALL, L. D. Genus I. *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137^{VP}. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology volume two the Proteobacteria Part C the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. p. 438-443.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, mar. 2004.

LI, C. Y.; MASSICOTE, H. B.; MORE, L. V. H. Nitrogen fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 140, n. 1, p. 35-40, Feb. 1992.

LINDSTRÖM, K. et al. Differentiation of nitrogen-fixing legume root nodule bacteria. In: COOPER, J. E.; RAO, J. R. (Ed.). **Molecular techniques for soil and rizosphere microorganisms**. Wallingford: CABI, 2006. p. 236-258.

MEHANA, T. A.; WAHID, O. A. A. Associative effect of phosphate dissolving fungi, *Rhizobium* and phosphate fertilizer on some soils properties, yield components and the phosphorus and nitrogen concentration and uptake by *Vicia faba* L. under field conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Singapore, v. 5, n. 11, p. 1226-1231, Feb. 2002.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de *Leguminosae*. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 279-311.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 12, n. 6, p. 567-572, Nov. 1996.

NARSIAN, V.; PATEL, H. H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 559-565, Apr. 2000.

OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 7, p. 566-576, July 2004.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 211-218, Jan. 1998.

OSORIO, N. W.; HABTE, M. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in a oxisol. **Arid Land Research and Management**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-274, July 2001.

PUPOT, R. et al. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfate or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-Methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. **Biochemistry**, Nashville, v. 32, n. 39, p. 10430-1435, Oct. 1993.

RAINEY, P. B. et al. A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, Manchester, v. 94, n. 2, p. 191-195, Mar. 1990.

REDDY, V. K.; REDDY, S. M. Solubilization of tricalcium phosphate by some seedborne fungi of maize. **National Academy Science Letters**, Allahabad, v. 10, n. 5, p. 167-169, May 1987.

RICE, W. A.; OLSEN, P. E.; LEGGET, M. E. Co-culture of *Rhizobium meliloti* and a phosphorus solubilising fungus (*Penicillium bilaii*) in sterile peat. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p. 703-705, Apr./May 1995.

ROONEY, D. C.; CLIPSON, N. J. W. Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. **Microbial Ecology**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 4-13, Jan. 2009.

SCERVINO, J. M. et al. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 46, n. 7, p. 755-763, July 2010.

SETHI, R. P.; SUBBA-RAO, N. S. Solubilization of tricalcium phosphate and calcium phytate by soil fungi. **The Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 14, n. 3, p. 329-331, July 1968.

SINGH, S.; KAPOOR, K. Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 139-144, Jan. 1999.

SMITH, S. E.; DAFT, M. Interactions between growth, phosphate content and nitrogen fixation in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Medicago sativa*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 4, n. 3, p. 403-413, May 1977.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões, MG: I., Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 795-802, set./out. 2006.

SOUCHIE, E. L. et al. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, set. 2006.

VASSILEV, N. et al. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphate and P plant acquisition. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 263-271, Sept. 2001.

VENKATESWARLU, B. et al. Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. **Journal of the Indian Society of Soil Science**, New Delhi, v. 32, n. 2, p. 273-277, June 1984.

WAKELIN, S. A. et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. Closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 36-43, June 2004.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, n. 1/4, p. 357-364, Dec. 2002.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 655-665, May 1999.

XIAO, C. Q. et al. Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Dordrecht, v. 159, n. 2, p. 330-342, Nov. 2009.

_____. Optimization of rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 187-193, June 2008.

ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; AMIL, M. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **European Journal of Agronomy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 15-21, Feb. 2003.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****Solubilização de fosfato por diversos gêneros de fungos saprofiticos e sua
influência no crescimento de milho e de caupi****Normas da revista World Journal of Microbiology and Biotechnology
(versão submetida)**

Marco E. Gudiño G.¹, Lucas M. de Abreu², Leandro M. Marra³, Ludwig H. Pfenning⁴, Fatima M. de S. Moreira⁵

¹ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, pós-graduando em Microbiologia Agrícola Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, megudinog@gmail.com

² Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Micologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, lmabreu@gmail.com

³ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, pós-graduando em Ciências do Solo. Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, lmarciano3@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Micologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, ludwig@dfp.ufla.br

⁵ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, fmoreira@dcs.ufla.br

Autor para correspondência: Tel +55 35 38291348. E-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

Resumo

O fósforo é um dos nutrientes indispensáveis para as plantas, porém, no solo é um elemento pouco móvel e se encontra, predominantemente, em compostos insolúveis, sendo, portanto, um fator limitante à produção agrícola. Apesar da alta diversidade do Reino Fungi, relatos sobre a solubilização de fosfatos por fungos têm se restringido aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Isto, provavelmente, se deve às técnicas usualmente utilizadas para isolamento que favorecem fungos com rápida capacidade de esporulação. As técnicas de lavagem e filtração de partículas de solo permitem o isolamento de uma diversidade muito maior de gêneros. Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a eficiência de diversos isolados de fungos da Amazônia brasileira, pela técnica de lavagem e filtração de partículas de solo, em solubilizar fosfato de cálcio e avaliar a capacidade desses de promover o crescimento de milho e caupi em condições axênicas. A capacidade da solubilização foi verificada mediante determinação do índice de solubilização de fosfato após a incubação dos isolados, por 7 dias, a 25 °C, no meio Pikovskaya ágar. O delineamento experimental em casa de vegetação foi inteiramente casualizado com seis tratamentos para cada espécie vegetal, sendo dois dos isolados que apresentaram os maiores índices de solubilização (*Haematonectria ipomoeae* FSA381, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109) e quatro testemunhas, sendo, um isolado (*Acremonium polychromum* FSA115) que no *screening* não solubilizou fosfato de cálcio e três tratamentos que não receberam inoculação dos fungos: com nível alto de fosfato insolúvel [50 mg P-Ca₃(PO₄)₂-(HPins)], nível alto de fosfato solúvel [31 mg P-NH₄H₂PO₄-(HPs)] e nível baixo de fosfato solúvel [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄-(LPs)]. Foi avaliada a massa da matéria seca da raiz, da parte aérea e da totalidade da planta. Os fungos mostraram índices de solubilização de fosfato de cálcio entre 1,07 cm e 2,03 cm. Foi observada a

capacidade para solubilizar de P-Ca por vários gêneros, sem informações prévias na literatura com relação a essa característica. Os dois isolados solubilizadores promoveram o crescimento das raízes de caupi de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao fungo não solubilizador *Acremonium polychromum* FSA115 e aos tratamentos controle com HPins e com LPs. Já para a massa da matéria seca total das duas espécies vegetais não se obtiveram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos inoculados com os três isolados de fungos e foram similares ao controle com HPs.

Termos para indexação

Vigna unguiculata [L.] Walp., *Zea mays* L., *Haematonectria ipomoeae*, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, *Acremonium polychromum*, disponibilidade de fósforo, solubilização de fosfato.

Abreviações

PVK ágar: Pikovskaya ágar

MEA: extrato de malte ágar

SI: índice de solubilização

HPs: nível alto de fosfato solúvel

LPs: nível baixo de fosfato solúvel

HPins: nível alto de fosfato insolúvel

Introdução

O fósforo é um elemento indispensável para o desenvolvimento vegetal. No entanto, a disponibilidade deste elemento é bastante reduzida em

consequência do fato de que muitas das reservas de fósforo no solo encontram-se imobilizadas, ficando indisponíveis para as plantas ou porque uma parte dos fertilizantes utilizados à base de fosfatos passa rapidamente à forma insolúvel no solo. Isto faz que este elemento seja um dos fatores mais limitantes à produção agrícola (Lopes 1989).

Alguns dos microrganismos do solo, entre os quais se encontram fungos, apresentam a capacidade para solubilizar o fosfato a partir da forma inorgânica insolúvel mediante mecanismos dependentes da diminuição do pH (produção de ácidos orgânicos e reações de intercâmbio), síntese de fosfatases e por reações de quelação dos metais aos quais o ânion fosfato encontra-se ligado (Gadd 1999; Narsian e Patel 2000), aumentando a disponibilidade deste elemento para os vegetais.

Apesar da alta diversidade existente no Reino Fungi, os trabalhos sobre fungos solubilizadores de fosfato geralmente tratam dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Dos 56 artigos encontrados na base de dados ISI Web of Knowledge, em março de 2011, sobre este assunto, 48 tratavam de espécies destes gêneros e um número bem menor de artigos (8) tratava dos gêneros *Cladosporium* (Sethi e Subba-Rao 1968; Singh e Kapoor 1999), *Scytalidium*, *Stachybotrys*, *Tolypocladium* (Reddy e Reddy 1987), *Mortierella* (Osorio e Habte 2001), *Beauveria* (Fomina et al. 2004), *Mucor* (Xiao et al. 2008; Xiao et al. 2009) e *Talaromyces* (Scervino et al. 2010). Isto ocorre porque os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais frequentemente isolados pela técnica de diluição e posterior plaqueamento em consequência da sua esporulação abundante e crescimento rápido. A utilização da técnica de lavagem de partículas de solo permite isolar uma maior diversidade de fungos que crescem ativamente em forma de micélio nas partículas de solo (Pfenning e Abreu 2008, 2010).

O caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) e o milho (*Zea mays* L.) são duas espécies importantes no consumo cotidiano da sociedade em geral para as quais a disponibilidade de fósforo pode ser um fator limitante durante seu crescimento e produção. Tecnologias que utilizam processos biológicos para melhorar sua nutrição com consequente aumento de seu rendimento são relevantes tanto do ponto de vista econômico como ambiental.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de diversos gêneros e espécies de fungos, isolados pela técnica de lavagem e filtração de partículas de solo de diferentes sistemas de uso de solo da Amazônia brasileira, em solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido e determinar a influência dos isolados selecionados em promover o crescimento de caupi e milho, sob condições axênicas, utilizando fósforo insolúvel como única fonte de fosfato.

Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos, o primeiro no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e o segundo em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre novembro de 2010 e maio de 2011.

Solubilização de fosfato por fungos em meio Pikovskaya Ágar

Num primeiro passo, tentou-se a reativação de 82 isolados de fungos saprofitos do Filo Ascomycota que formam parte da Coleção Micológica de Lavras da UFLA em meio MEA 2% (extrato de malte ágar) (extrato de malte 20 g·L⁻¹, ágar 20 g·L⁻¹) e incubados, por 7 dias, a 25 °C. Esses fungos foram

isolados mediante lavagem e filtração de partículas de solo (De Bellis et al. 2007) e identificadas a partir de diferentes sistemas de uso de solos da Amazônia brasileira como parte do projeto Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity/BIOSBRASIL (<http://www.bgbd.net/>, <http://www.biosbrasil.ufla.br/>). Após este período, os fungos que apresentaram crescimento em meio MEA 2% foram inoculados no meio PVK ágar (1948) (0,5 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,1 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0,2 g·L⁻¹ NaCl, 0,2 g·L⁻¹ KCl, 0,002 g·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0,002 g·L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 5,0 g·L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂, 10,0 g·L⁻¹ glicose, 0,5 g·L⁻¹ extrato de levedura, ágar 15,0 g·L⁻¹) acrescentado de 0,03 g·L⁻¹ de rosa de bengala, segundo Nopparat et al. (2007).

A capacidade de solubilizar fosfato foi determinada após 7 dias de incubação, a 25 °C, mediante medição do diâmetro de um halo claro ao redor do crescimento. Com esse dado obteve-se o índice de solubilização (IS) segundo Berraquero et al. (1976): $\Phi 1 / \Phi 2$, em que $\Phi 1$ é o diâmetro, em centímetros, do halo e $\Phi 2$ o diâmetro, em centímetros, da colônia, com o propósito de realizar a comparação entre os isolados, em que IS < 2 cm: baixo índice de solubilização, IS médio com valores entre 2 cm e 4 cm, e IS > 4 cm, com elevado índice de solubilização. Utilizou-se como controle positivo de solubilização a estirpe *Acinetobacter* sp. UFLA0309 que apresenta alto índice de solubilização no meio PVK ágar. Foram testadas três repetições por isolado.

Efeito de fungos solubilizadores de fosfato no crescimento de caupi e de milho

A partir do experimento anterior selecionaram-se dois isolados que apresentaram os maiores IS (*Haematonectria ipomoeae* FSA381 e *Pochonia clamydosporea* var. *catenulata* FSA109) e o isolado *Acremonium polychromum* FSA115, que cresceu no meio Pikovskaya ágar, mas não desenvolveu halo de solubilização, como controle negativo, para verificar o efeito dos isolados

solubilizadores em promover o crescimento de caupi e de milho em vasos de Leonard.

O inóculo dos esporos dos fungos foi preparado utilizando-se a metodologia descrita por Sheng et al. (2011): discos de 0,5 cm de diâmetro do crescimento de cada um dos isolados foram suspensos em uma solução estéril de Tween 80 0,1% (v/v) e solução salina 0,85% (p/v) em proporção 1:1; a partir desta fizeram-se diluições utilizando-se o mesmo solvente, até atingir 1×10^8 conídios·mL⁻¹, verificado por contagem na câmara de Neubauer.

As sementes de caupi cultivar Gurgueia BR17 foram desinfetadas por imersão em etanol 95% por 1 minuto; depois, em hipoclorito de sódio 5%, por 2 minutos, seguido de seis lavagens em água destilada estéril. As sementes de milho cultivar BR206 foram desinfetadas da mesma maneira, com 20 lavagens prévias em água destilada estéril, com o propósito de retirar o fungicida que revestia as sementes comerciais utilizadas.

As sementes foram germinadas, por 72 horas, a 28 °C, no escuro, em placas de Petri de 150 mm x 15 mm com algodão e papel filtro umedecidos estéreis.

Após a germinação, as sementes foram plantadas em um substrato previamente autoclavado, composto por uma mistura de vermiculita e areia (2:1) na parte superior do vaso Leonard (Vincent 1970) com capacidade para 500 cm³. A parte inferior desse vaso continha 550 mL da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) [114,1 g·L⁻¹ NH₄H₂PO₄, 101,1 g·L⁻¹ KNO₃, 236,16 g·L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 120,4 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O] contendo 31 mg·L⁻¹ de fósforo. Para cada litro da solução adicionou-se 1 mL de solução de oligoelementos (2,86 g·L⁻¹ H₃BO₃, 1,81 g·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,22 g·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0,08 g·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,02 g·L⁻¹ H₂MoO₄·H₂O) e 1 mL da solução de Fe-EDTA (24,9 g·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 26,1 g·L⁻¹ EDTA).

Os vasos foram organizados na casa de vegetação mediante delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, constituídos por dois isolados de fungos solubilizadores de fosfato e um isolado de fungo não solubilizador, avaliados individualmente em caupi e em milho na presença de 50 mg de $P-Ca_3(PO_4)_2$ com nível baixo de fosfato solúvel [3,1 mg $P-NH_4H_2PO_4$ - (LPs)] e três tratamentos que não receberam inoculação dos fungos: com nível alto de fosfato insolúvel [50 mg $P-Ca_3(PO_4)_2$ - (HPins)], nível alto de fosfato solúvel [31 mg $P-NH_4H_2PO_4$ - (HPs)] e nível baixo de fosfato solúvel [3,1 mg $P-NH_4H_2PO_4$ - (LPs)]. Cada tratamento teve 4 repetições, tendo sido plantadas quatro sementes por vaso.

Para inoculação dos fungos, 1 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios $\cdot mL^{-1}$) foi vertido sobre cada semente germinada. Após 12 dias de crescimento, foi realizado o desbaste, ficando duas plantas por vaso e a superfície dos vasos foi coberta com uma fina camada de areia, parafina e clorofórmio na proporção 100:0.01:10 (w:w:v) para evitar contaminação e diminuir a perda de umidade por evaporação (Vincent 1970; Florentino et al. 2009). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura entre 25 °C a 30 °C, acrescentando-se a solução de Hoagland e Arnon uma vez por semana. A coleta das plantas foi realizada após 45 dias de crescimento, com o propósito de avaliar a massa da matéria seca da parte aérea, a massa da matéria seca das raízes e a massa da matéria seca da totalidade da planta.

Análise estatística

A comparação dos tratamentos nos dois experimentos foi realizada mediante a análise de variância e posterior agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para todas as variáveis analisadas, utilizando-se o programa SISVAR 4.0 (Ferreira 2008).

Resultados

Solubilização de fosfato por fungos em meio Pikovskaya Ágar

Cinquenta e sete isolados de fungos saprofiticos pertencentes ao filo Ascomycota que foram reativados no meio MEA 2% foram avaliados no meio de cultura de PVK ágar. Vinte e dois isolados não solubilizaram fosfato ou não cresceram sob as condições avaliadas (Tabela 1) e 35 apresentaram diferentes valores de IS, entre 1,07 cm e 2,03 cm, tendo três desses apresentado maior IS estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação aos outros: *Haematonectria ipomoeae* FSA381 (IS=1,8500 cm), isolado a partir de roça de macaxeira e banana; *Eleutherascus lectardii* FSA257a (IS=1,9500 cm), isolado de roça de bananeira e *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109 (IS=2.0333 cm), isolado de floresta (Tabela 2).

Tabela 1 Isolados de fungos saprófitos pertencentes ao filo Ascomycota que não solubilizaram fosfato ou não cresceram (NG) no meio de cultura Pikoskaya Agar, após 7 dias de incubação, a 25°C

Isolado	Gênero e espécie	Diâmetro da colônia (cm)
FSA291a	<i>Plectosporium tabacinum</i>	NG
FSA104	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	NG
FSA204	<i>Chaetomium funicola</i>	NG
FSA155a	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	NG
FSA248	<i>Virgaria nigra</i>	NG
FSA219	<i>Cylindrocladium floridanum</i>	NG
FSA386	<i>Pseudallescheria boydii</i>	NG
FSA221	<i>Gliocladiopsis sumatrensis</i>	NG
FSA387	<i>Pseudallescheria boydii</i>	NG
FSA240	<i>Gonytrichum macrocladum</i>	3,33
FSA297	<i>Acremonium polychromum</i>	4,00
FSA282	<i>Sagenomella alba</i>	4,67
FSA392	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	9,33
FSA318	<i>Virgaria nigra</i>	12,33
FSA237	<i>Gonytrichum macrocladum</i>	13,67
FSA343	<i>Fusarium solani</i>	14,33
FSA145	<i>Scolecobasidium constrictum</i>	16,33
FSA368	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	17,33
FSA115	<i>Acremonium polychromum</i>	20,00
FSA321	<i>Fusarium solani</i>	20,67
FSA144	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	28,67
FSA378a	<i>Trichoderma harzianum</i>	50,67

Tabela 2 Média de três repetições dos índices de solubilização (IS) dos isolados de fungos saprófitos pertencentes ao filo Ascomycota, procedentes de diferentes sistemas de uso do solo, avaliados no meio de Pikovskaya ágar. ⁽¹⁾

Isolado	Gênero/espécie	IS (cm)	Sistema de uso do solo de origem
FSA216	<i>Fusarium solani</i>	1,0733 ^d	Capoeira em estágio inicial (aproximadamente 2 anos)
FSA255	<i>Gilmaniella humicola</i>	1,0833 ^d	Pastagem
CML1944	<i>Clonostachys rosea</i>	1,0866 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA385	<i>Haematonectria ipomoeae</i>	1,0933 ^d	Capoeira em estágio inicial (aproximadamente 2 anos)
CML1984	<i>Clonostachys sporodochialis</i>	1,1166 ^d	Capoeira em estágio inicial
FSA247a	<i>Acremonium furcatum</i>	1,1300 ^d	Floresta
FSA342	<i>Fusarium solani</i>	1,1400 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA384	<i>Fusarium equiseti</i>	1,1400 ^d	Capoeira em estágio inicial (aproximadamente 2 anos)
CML1915	<i>Clonostachys solani</i>	1,1600 ^d	Roça de bananeira
FSA119	<i>Myrothecium roridum</i>	1,1833 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA209	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1,2000 ^d	Roça de mandioca
FSA339	<i>Fusarium solani</i>	1,2000 ^d	Roça de macaxeira
FSA341	<i>Fusarium solani</i>	1,2000 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
CML1913	<i>Clonostachys candelabrum</i>	1,2066 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA311	<i>Paecilomyces carneus</i>	1,2066 ^d	Floresta
FSA270	<i>Rhinoctadiella atrovirens</i>	1,2066 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA348	<i>Fusarium solani</i>	1,2200 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA275	<i>Xepicula leucotricha</i>	1,2233 ^d	Roça de mandioca

Tabela 2, conclusão

FSA219	<i>Cylindrocladium floridanum</i>	1,2266 ^d	Roça de macaxeira e banana
FSA298	<i>Cylindrocarpon cf obtusisporum</i>	1,2300 ^d	Pastagem
FSA113	<i>Acremonium maseei</i>	1,2500 ^d	Roça
FSA231	<i>Cylindrocladiella infestans</i>	1,2733 ^d	Capoeira em estágio inicial
FSA349	<i>Fusarium solani</i>	1,2833 ^d	Capoeira
CML1914	<i>Clonostachys rosea</i>	1,2833 ^d	Capoeira em estágio de regeneração
FSA415	<i>Humicola fuscoatra</i>	1,3033 ^d	Capoeira
FSA344	<i>Fusarium solani</i>	1,4366 ^c	Roça de macaxeira
CML1943	<i>Clonostachys rosea</i>	1,4566 ^c	Capoeira em estágio de regeneração
FSA329	<i>Fusarium solani</i>	1,4600 ^c	Pastagem
FSA247	<i>Gonytrichum macrocladum</i>	1,5000 ^c	Floresta
FSA161	<i>Acremonium furcatum</i>	1,5533 ^c	Floresta
FSA332	<i>Fusarium solani</i>	1,6566 ^c	Roça de mandioca
FSA250	<i>Virgaria nigra</i>	1,6666 ^c	Floresta
FSA381	<i>Haematonectria ipomoeae</i>	1,8500 ^b	Roça de macaxeira e banana
FSA257a	<i>Eleutherascus lectardii</i>	1,9500 ^b	Roça de bananeira
FSA109	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	2,0333 ^b	Floresta
UFLA0309 ⁽²⁾	<i>Acinetobacter sp.</i>	4,1667 ^a	Floresta tropical subcadocifólia

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não têm diferença entre si, pelo teste Scott-Knott, a 0,05 de significância

⁽²⁾ Estirpe bacteriana utilizada como controle positivo

Nas espécies *Fusarium solani*, *Pochonia clamydospria* var. *catenulata*, *Virgaria nigra*, *Cylindrocladium floridanum* e *Gonytrichum macrocladum* encontraram-se isolados com capacidade de solubilizar e de não solubilizar fosfato de cálcio (Tabelas 1 e 2).

Vinte e um isolados pertencentes aos gêneros *Gilmaniella*, *Clonostachys*, *Acremonium*, *Myrothecium*, *Lasiodiplodia*, *Paecilomyces*, *Rhinochadiella*, *Xepicula*, *Cylindrocladium*, *Cylindrocarpon*, *Gonytrichum*, *Virgaria*, *Eleutherascus* e *Pochonia* apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio no meio Pikovskaya ágar. Com relação ao sistema de uso do solo a partir do qual foram isolados os fungos, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os IS e o sistema de uso de origem (Tabela 3).

Tabela 3 Média do índice de solubilização por 35 isolados de fungos (ver Tabela 2 para identificação) no meio Pikovskaya Agar, em relação aos diferentes sistemas de uso do solo da Amazônia do Brasil

Sistema de uso do solo	IS dos fungos isolados (cm)
Capoeira	1,2000 ^{a*}
Pastagem	1,2600 ^a
Roça	1,4366 ^a
Floresta	1,5200 ^a

* Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não têm diferença entre si, pelo teste Scott-Knott, a 0,05 de significância

Efeito de fungos solubilizadores de fosfato no crescimento de caupi e de milho

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados. No caupi, todos os parâmetros nos controles sem inoculação se comportaram como esperado, ou seja, maior crescimento em HPs, seguido do tratamento com HPins e menor crescimento em LPs. Para o milho, este comportamento só foi verificado na massa da matéria seca das raízes. Na massa da matéria seca da parte aérea e da totalidade da planta não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os controles com HPs e com HPins (Figura 1).

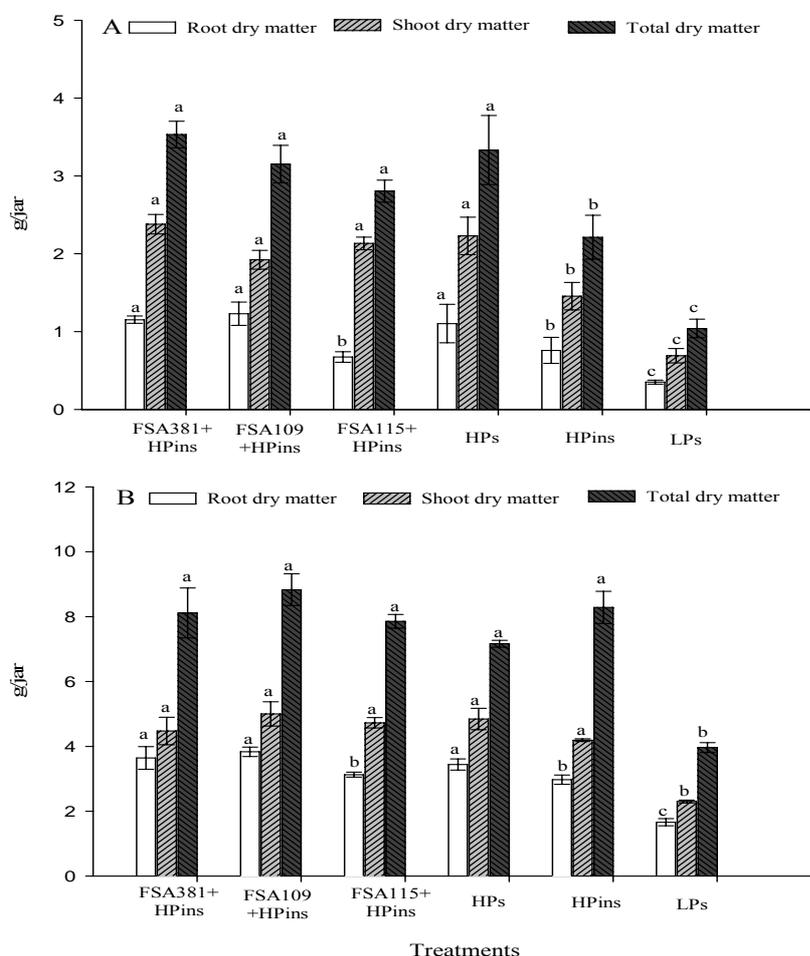


Figura 1 Massa da matéria seca, em gramas, por vaso, da raiz, da parte aérea e da totalidade da planta de caupi (A) e de milho (B), nos tratamentos com os isolados solubilizadores FSA381 e FSA109 e com o isolado FSA381 e FSA109 e com o isolado FSA115 não solubilizador, em relação aos tratamentos controle: nível alto de fosfato solúvel [31 mg P-NH₄H₂PO₄-(HPs)]; nível alto de fosfato insolúvel [50 mg P-Ca₃(PO₄)₂-(HPins)] e nível baixo de fosfato solúvel [3,1 mg P- NH₄H₂PO₄-(LPs)]. Colunas identificadas com diferentes letras têm diferença estatisticamente significativa entre si, pelo teste Scott-Knott, a 0,05 de significância. As barras referem-se ao erro padrão

A inoculação com os fungos solubilizadores (*Haematonectria ipomoeae* FSA381, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109) promoveu o crescimento das raízes de caupi e de milho em relação ao fungo não solubilizador *Acremonium polychromum* FSA115 e aos tratamentos controle sem inoculação com HPins e com LPs e foram similares ao tratamento com HPs (Figura 1).

Já para a massa da parte aérea e massa total das duas espécies não houve efeito diferenciado dos fungos solubilizadores em relação ao fungo não solubilizador, embora haja uma tendência de este último induzir menor crescimento em relação aos isolados solubilizadores. No entanto, tanto a massa da matéria seca da parte aérea como a massa da matéria seca total de caupi inoculado com as três espécies de fungos aumentaram em relação ao controle que recebeu apenas HPins, indicando a contribuição dos fungos solubilizadores e do não solubilizador para o crescimento vegetal, apesar de a contribuição dos fungos solubilizadores ter sido maior.

Discussão

Os IS de fosfato encontrados neste trabalho (1,07-2,03), no meio de PVK ágar, estão na faixa observada para fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* isolados a partir de rizosfera de *Cicer arietinum* em estudos anteriores (Yadav et al. 2011). Já El-Azouni (2008) encontrou IS entre 2,42 e 3,15 para *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum* isolados a partir de uma área de culturas não especificadas. A capacidade variável dos isolados em solubilizar fosfato pode ser explicada como sendo consequência da variedade e da quantidade de ácidos orgânicos que são produzidos pelos fungos (Whitelaw et al. 1999), dependendo do gênero, da espécie e, dentro desta, dos distintos isolados (Narsian e Patel 2000), conforme confirmado neste trabalho.

Neste trabalho mostrou-se que a diversidade de fungos solubilizadores no solo pode ser bem mais elevada, visto que foram relatados, pela primeira vez, quatorze gêneros com essa característica. Além disso, observou-se que gêneros de fungos solubilizadores diferentes de *Penicillium* e *Aspergillus* também são capazes de promover o crescimento vegetal.

A capacidade de solubilizar fosfato das espécies de fungos avaliadas não teve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com relação ao sistema de uso do solo a partir do qual foram isolados, contrariando os resultados apresentados por Moratto et al. (2005). Estes autores encontraram maior eficiência na solubilização de *Trichocladium canadiense*, *Mucor* sp. e *Penicillium* sp. isolados a partir de solos em descanso e de floresta do que a partir de solos com cultura de batata na serra Colombiana. Provavelmente, isso ocorreu devido ao elevado uso de agroquímicos na cultura de batata, que teve efeito deletério nos microrganismos. Nos sistemas de uso do solo estudados neste trabalho não houve emprego de nenhum tipo de insumo (Fidalgo et al. 2005). Além disso, na região de estudo, as áreas com sistemas agrícolas são relativamente pequenas em relação às áreas de floresta preservadas, o que contribui para preservar a biodiversidade, a redundância funcional e a resiliência dos processos biológicos. Isso já foi observado, nas mesmas áreas, para outros grupos de microrganismos, como procariotos (Jesus et al. 2009), entre eles bactérias fixadoras de N_2 (Lima et al. 2009) e fungos micorrízicos arbusculares (Silva et al. 2009; Stürmer e Siqueira 2011).

A capacidade para disponibilizar uma fonte de fosfato pelos diferentes isolados pode diferir, dependendo das condições geradas pela rizosfera da espécie vegetal com a qual o microrganismo estabelece a relação (Moreira e Siqueira 2006) ou pela acidificação da rizosfera dependente das raízes (Ryan e Delhaize 2001).

A ausência de diferença significativa na massa da matéria seca de milho entre o tratamento controle com HPins e HPs pode ter acontecido por consequência da elevada produção de ácidos orgânicos na rizosfera da cultivar BR206 (Parentoni et al. 1999), o que faz com que essas plantas se tornem resistentes à toxidez por alumínio nos solos (Dinkelaker et al. 1989; Jones e Darrah 1994; Miyasaka et al. 1991) o que, provavelmente, ocasionou um efeito significativo na solubilização no tratamento HPins.

A capacidade dos três isolados de fungos em estimular o crescimento das duas espécies vegetais avaliadas variou, dependendo da espécie vegetal e do isolado. Apesar de o efeito dos fungos solubilizadores ser significativamente maior para a massa da matéria seca das raízes, também houve efeito do fungo não solubilizador na parte aérea do caupi. Provavelmente, o isolado não solubilizador contribuiu para o crescimento vegetal por um mecanismo não identificado neste trabalho.

O incremento na massa da matéria seca da parte aérea, da raiz e da totalidade da planta após inoculação com fungos solubilizadores de fosfato foi descrito em estudos anteriores. Jain et al. (2010) encontraram incrementos na massa da matéria seca da parte aérea de *Vigna radiata* cv. RMG492 após a inoculação de um isolado de *Aspergillus awamori* solubilizador de fosfato. Reyes et al. (2002) encontraram aumento na massa da matéria seca de milho após a inoculação de isolados de *Penicillium rugulosum* solubilizadores de fosfato.

Verificou-se o potencial de vários gêneros de fungos saprofitos do Filo Ascomycota diferentes de *Penicillium* e *Aspergillus* em solubilizar fosfato e estimular o crescimento de caupi e das raízes do milho sob condições axênicas. Considerando a complexidade, a heterogeneidade e a dinâmica do sistema edáfico, o próximo passo é testar esta habilidade no campo.

Portanto, a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio pelos fungos isolados da Amazônia difere segundo o gênero, a espécie e o isolado, independentemente do sistema do solo a partir do qual foram isolados, e a associação entre as plantas os fungos solubilizadores e não solubilizador no meio PVK, nas condições testadas, podem estimular o crescimento de milho e de caupi.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de bolsas aos autores.

Referências

Berraquero FR, Baya AM, Ramos CA (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharm Tomo XVII*: 399-406

De Bellis T, Kernaghan G, Widden P (2007) Plant Community influences on soil microfungus assemblages in boreal mixed-wood forests. *Mycologia* 99: 356-367

Dinkelaker B, Römheld V, Marschner, H (1989) Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ* 12: 285-292

El-Azouni IM, (2008) Effect of Phosphate Solubilizing Fungi on Growth and Nutrient Uptake of Soybean (*Glycine max* L.) plants. *J Appl Sci Res* 4: 592-598

Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Sympos* 6: 36-41

- Fidalgo ECC, Coelho MR, Araújo FO, Moreira FMS, Santos HG, Santos MLM, Huising J (2005) Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto (Conservation and sustainable management and below-ground biodiversity: phase I), Município de Benjamin Constant (AM). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 71, Embrapa Solos. BiosBrasil CSM/BGBD. http://vsites.unb.br/ib/zoo/bios/doc/BPD_71.pdf. Accessed 3 November 2011
- Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, da Silva K, Moreira FMS (2009) *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci Agric* 66: 667-676
- Fomina M, Alexander IJ, Hillier S, Gadd GM (2004) Zinc Phosphate and Pyromorphite Solubilization by Soil Plant-Symbiotic Fungi. *Geomicrobiology Journal* 21: 351-366
- Gadd GM (1999) Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. *Adv Microb Ecol* 41: 47-92
- Hoagland DR, Arnon DT (1950) The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experimental Station
- ISI Web of Knowledge, <http://apps.webofknowledge.com/> Accessed 23 March 2011)
- Jain R, Saxena J, Sharma V (2010) The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Appl Soil Ecol* 46: 90-94
- Jesus E, Marsh TL, Tiedje JM, Moreira FMS (2009) Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon Soils. *The ISME Journal* 3: 1004-1011
- Jones DL, Darrah PR, (1994) Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rizosphere. *Plant Soil* 166: 247-257

- Lima AS, Nóbrega RSA, Barberi A, Silva K, Ferreira DF, Moreira FMS (2009) Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil* 319: 127-145
- Lopes AS (1989) Manual de Fertilidade do Solo. Anda, São Paulo
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, Foy CD (1991) Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans: Root Exudation of Citric Acid. *Plant Physiol* 96: 737-743
- Moratto C, Martinez LJ, Valencia H, Sánchez J (2005) Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agron Colomb* 23: 299-309.
- Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e Bioquímica do Solo, 2nd edn. Editora UFLA, Lavras
- Narsian V, Patel HH (2000) *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol Biochem* 32: 559-565
- Nopparat C, Jatupornpipat M, Rittiboon A (2007) Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from Kanchanaburi. *KMITL Sci Technol J* 7: 137-146
- Osorio NW, Habte M, (2001) Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P solubilizing fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in a Oxisol. *Arid Land Res Manag* 15: 263-274
- Parentoni SN, Gama EEG, Santos MX, Lopes MA, Alves VMC, Bahia Filho AFC, Vasconcelos CA, Magnavaca R, Pacheco CAP, Meirelles WF, Guimarães PEO, da Silva AE, Filho WN, Moro JR, Viana RT, Pitta GVE, França GE, Purcino AAC, Souza IRP, Marriel IE, Machado AT, Correa LA, Oliveira AC, Paiva E, 1999. Adaptação de Milho a Solos Ácidos; Tolerância a Toxidez de Alumínio e Eficiência no Uso de Nutrientes no Programa de Pesquisa da Embrapa-Milho e Sorgo. *Memorias de La XVIII Reunión Latinoamericana del Maíz*, pp 179-199.

Pfenning LH, Abreu LM (2008) Saprophytic and Plant Pathogenic Soil Fungi. In: Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE (Ed) Handbook of Tropical Soil Biology. Sampling & Characterization of Below-ground Biodiversity. Earthscan, London, pp 149-174.

Pfenning LH, Abreu LM (2010) Fungos do solo como saprófitos e patógenos de plantas. In: Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE (Eds) Manual de Biologia dos Solos Tropicais: Amostragem e Caracterização da Biodiversidade. Editora UFPA, Lavras, pp 173-204.

Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiol 17: 362-370

Reddy VK, Reddy SM (1987) Solubilization of tricalcium phosphate by some seedborne fungi of maize. Natl Acad Sci Lett 10: 167-169

Reyes I, Bernier L, Antoun H (2002) Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. Microbial Ecol 44: 39-48

Ryan PR, Delhaize E (2001) Function and mechanism of organic acid exudation from plant roots. Annu Rev Plant Phys 52: 527-560

Scervino JM, Mesa MP, Mónica ID, Recchi M, Sarmiento MN, Godeas A (2010) Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fert Soils 46: 755-763

Sethi RP, Subba-Rao NS (1968) Solubilization of tricalcium phosphate and calcium phytate by soil fungi. Journal Gen App Microbiol 14: 329-331

Sheng STH, Brandl MT, Hernlem B, Eng JG, Sarreal, SBL (2011) Fluorescent Viability Strains to Probe the Metabolic Status of Aflatoxigenic Fungus in Dual Culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. Mycopathologia 171: 133-138

Silva GA, Siqueira JO, Stürmer SL (2009) Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares isolados de solos sob diferentes sistemas de uso na região do Alto Solimões na Amazônia. *Acta Amazon* 39: 477-488

Singh S, Kapoor K (1999) Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol Fert Soils* 28: 139-144

Stürmer SL, Siqueira JO (2011) Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza* 21: 255-267

Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem* 31: 655-665

Xiao CQ, Chi RA, Huang XH, Zhang WX, Qiu GZ, Wang DZ (2008) Optimization of rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecol Eng* 33: 187-193

Xiao C, Chi R, He H, Qiu G, Wang D, Zhang W (2009) Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *Appl Biochem Biotech* 159: 330-342

Yadav J, Verma JP, Tiwari KN (2011) Plant Growth Promoting Activities of Fungi and their Effect on Chickpea Plant Growth. *Asian J Biol Sci* 4: 291-299

ARTIGO 2**Interações entre fungos solubilizadores de fosfato e *Bradyrhizobium* sp. no crescimento de caupi****Normas da revista World Journal of Microbiology and Biotechnology
(versão preliminar)**

Marco E. Gudiño G¹., Lucas M. de Abreu², Fabio L. Olivares³, Ludwig H. Pfenning⁴, Fatima M. de S. Moreira⁵

¹ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, pós-graduando em Microbiologia Agrícola Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, megudinog@gmail.com

² Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Micologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, lmabreu@gmail.com

³ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Caixa Postal 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, fabioliv@uenf.br

⁴ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Micologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, ludwig@dfp.ufla.br

⁵ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, fmoreira@dcs.ufla.br

Autor para correspondência: Tel +55 35 38291348. E-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

Resumo

O fósforo e o nitrogênio são dois nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento vegetal. Portanto, a carência deles é um fator limitante à produção agrícola. As interações entre os microrganismos permitem a manutenção dos sistemas biológicos e, dependendo da associação, contribuem ao manejo agrícola sustentável. Este trabalho foi realizado com os objetivos de testar a compatibilidade entre 57 isolados de diferentes espécies de fungos a partir de diferentes sistemas de uso do solo da Amazônia brasileira e as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84 e INPA03-11B, aprovadas como inoculantes para caupi, e determinar a efetividade de dois destes isolados de fungos com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e de um incapaz de solubilizá-lo em meio PVK ágar em associação com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA03-84 e INPA03-11B em promover o crescimento de caupi em diferentes condições de nutrição mineral de fósforo e de nitrogênio, utilizando 50 mg de fósforo [P-Ca₃(PO₄)₂] como fonte de fosfato insolúvel e baixas concentrações de fósforo solúvel [3,1 mg de P-NH₄H₂PO₄] e de nitrogênio disponível [21 mg N-NO₃] sob condições axênicas. A compatibilidade entre os microrganismos foi verificada mediante a técnica de cultura dupla, utilizando a fórmula de Whipps e o índice de inibição de crescimento (GI), após incubação no meio à temperatura de 79 °C a 25 °C, por 5 dias, e mediante observação microscópica do crescimento no meio 79 sem ágar, a 25 °C e 120 rpm, por 10 dias, entre as estirpes bacterianas e 3 isolados fúngicos solubilizadores de fosfato (*Haematonectria ipomoeae* FSA381, *Eleutherascus lectardii* FSA257a e *Pochonia clamydosporia* var. *catenulata* FSA109) e um isolado não solubilizador (*Acremonium polychromum* FSA115). O delineamento experimental em casa de vegetação foi inteiramente casualizado, com 28 tratamentos em arranjo fatorial 7 x 2 x 2, sendo 6 inoculantes + 1 tratamento

sem inoculação, com duas concentrações de nitrogênio disponível e duas concentrações de fósforo solúvel, sendo: com nível alto de fosfato solúvel e de nitrogênio disponível [31 mg P-NH₄H₂PO₄ - 210 mg N-NO₃ - (HPs-HNd)]; com nível baixo de fosfato solúvel e nível alto de nitrogênio disponível [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄ - 210 mg N-NO₃ - (LPs-HNd)]; com nível alto de fosfato solúvel e nível baixo de nitrogênio disponível [31 mg P-NH₄H₂PO₄ - 21 mg N-NO₃ - (HPs-LNd)] e com nível baixo de fosfato solúvel e de nitrogênio disponível [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄ - 21 mg N-NO₃ - (LPs-LNd)]. Todos os tratamentos com nível baixo de fosfato solúvel receberam 50 mg de P-Ca₃(PO₄)₂ - (HPins) como fonte de fosfato insolúvel. Foram avaliados o número e a massa da matéria seca dos nódulos; a massa da matéria seca da parte aérea, das raízes e da totalidade da planta; a eficiência relativa na parte aérea; o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas e o acúmulo de fósforo na parte aérea, nas raízes e na totalidade das plantas. Não houve inibição no crescimento nos testes realizados em placa (GI=0), embora o isolado *Eleutherascus lectardii* FSA257a tenha sido inibido pelas duas estirpes bacterianas durante o período de crescimento no meio líquido após observação microscópica durante o período de incubação. Os tratamentos que receberam os inoculantes com nível baixo de fosfato solúvel e de nitrogênio disponível [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄ - 21 mg N-NO₃ - (LPs-LNd)] e com alto nível de fósforo insolúvel [50 mg de fósforo P-Ca₃(PO₄)₂ - (HPins)] tiveram diferenças significativamente maiores (p<0,05) para a eficiência relativa na parte aérea e para a massa da matéria seca da parte aérea em relação aos tratamentos que não receberam inoculação, mostrando o efeito desses microrganismos na promoção do crescimento do caupi sob essas condições.

Termos para indexação

Vigna unguiculata (L.) Walp., *Haematonectria ipomoeae*, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, *Acremonium polychromum*, *Eleutherascus lectardii*, compatibilidade, solubilização de fosfato.

Abreviações

PVK ágar: Pikovskaya ágar

MEA: extrato de malte ágar

SI: índice de solubilização

HPs: nível alto de fosfato solúvel

LPs: nível baixo de fosfato solúvel

HPins: nível alto de fosfato insolúvel

Introdução

Os microrganismos estabelecem diferentes relações simbióticas entre eles e com os outros seres vivos. Algumas dessas associações podem promover a produção agrícola ao disponibilizar nutrientes para os vegetais e favorecer a melhoria na qualidade do solo (Seneviratne et al. 2010), embora essas capacidades sejam dependentes da compatibilidade entre os membros da relação e com o ambiente edáfico (Abd-Alla e Omar 2001).

O nitrogênio e o fósforo são dois elementos indispensáveis para o desenvolvimento vegetal. A principal reserva de nitrogênio encontra-se na biosfera na forma diatômica (N₂) e sob essa conformação química não pode ser utilizado pelas espécies vegetais. A disponibilização deste elemento nas leguminosas é conseguida mediante o processo de fixação biológica, realizado

por algumas espécies de procariotos capazes de formar nódulos nas raízes das plantas hospedeiras em que a enzima nitrogenase catalisa a reação de redução de N_2 a amônia. Entre esses microrganismos encontram-se os pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Moreira e Siqueira 2006).

Muitas das reservas de fósforo no solo estão imobilizadas, ficando indisponíveis para as plantas. Além disso, uma parte dos fertilizantes utilizados à base de fosfatos passa rapidamente à forma insolúvel, tornando este um fator limitante à produção agrícola (Lopes 1989). Entre os microrganismos do solo, alguns gêneros de fungos apresentam a capacidade para solubilizar o fosfato a partir da forma inorgânica insolúvel, mediante mecanismos dependentes da diminuição do pH (produção de ácidos orgânicos e reações de intercâmbio), síntese de fosfatases e por reações de quelação dos metais aos quais o ânion fosfato encontra-se ligado (Gadd 1999; Narsian e Patel 2000) aumentando a disponibilidade deste elemento para os vegetais.

No Brasil, o feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma espécie importante de consumo na sociedade, porém, esta leguminosa é cultivada sob condições de baixo uso de tecnologia e em solos deficientes em nitrogênio e em fósforo (Lacerda et al. 2004). Portanto, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a compatibilidade entre as estirpes de *Bradyrhizobium* sp., UFLA03-84 e INPA03-11B, aprovadas como inoculantes para caupi pelo Ministério de Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA) (Lacerda et al. 2004; Soares et al. 2006) e fungos isolados pela técnica de lavagem e filtração de partículas de solo de diferentes sistemas de uso de solo da Amazônia brasileira, e determinar a efetividade de dois destes isolados de fungos com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio no meio PVK ágar e de um incapaz de fazê-lo nessas condições, em associação com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA03-84 e INPA03-11B, em promover o crescimento de caupi em diferentes condições de nutrição mineral de fósforo e de nitrogênio,

utilizando 50 mg de fósforo [P-Ca₃(PO₄)₂] como fonte de fosfato insolúvel e baixa concentração de nitrogênio disponível [1,4 mg de N-NH₄H₂PO₄], sob condições axênicas.

Material e métodos

Foram realizados dois experimentos, o primeiro no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e o segundo em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre março e outubro de 2011.

Estirpes de bactérias e de fungos

As estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84 e INPA03-11B foram selecionadas por sua capacidade de promover o crescimento de feijão caupi em condições de campo (Lacerda et al. 2004; Soares et al. 2006) e aprovadas pelo MAPA como inoculantes para caupi. Essas estirpes foram inoculadas no meio 79 (Fred e Waksman 1928) (extrato de levedura 0,4 g·L⁻¹, manitol 10 g·L⁻¹, solução de K₂HPO₄ (10%) 1 mL·L⁻¹, solução de KH₂PO₄ (10%) 4 mL·L⁻¹, solução de MgSO₄·7H₂O(10%) 2 mL·L⁻¹, solução de NaCl (10%) 1 mL·L⁻¹, solução de azul de bromotimol (0,5%) em 0,2 N de KOH 5 mL·L⁻¹, ágar 15 g·L⁻¹) e incubadas, por 7 dias, a 28°C.

Cinquenta e sete isolados de fungos saprofíticos do filo Ascomycota, que formam parte da Coleção Micológica de Lavras da UFLA, dentre os quais três apresentam maiores índices de solubilização (*Haematonectria ipomoeae* FSA381, *Eleutherascus lectardii* FSA257a, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109) e um isolado incapaz de solubilizar fosfato de cálcio no meio PVK ágar (*Acremonium polychromum* FSA115), foram selecionados e

incubados, por 7 dias, a 25 °C, em MEA 2% (extrato de malte ágar) (extrato de malte 20 g·L⁻¹, ágar 20 g·L⁻¹).

Avaliação da compatibilidade *in vitro*

Utilizou-se a técnica de cultura dupla (Safdi et al. 2001) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio 79. Cada uma das estirpes das bactérias foi inoculada mediante uma estria no centro da placa e outra em sentido perpendicular à primeira, formando uma cruz.

Quatro discos de 5 mm, cortados a partir do bordo do crescimento de 7 dias do fungo no meio MEA 2%, foram colocados em cada um dos quadrantes, sendo a distância entre a estria da bactéria e o bloco contendo o fungo de 2,5 cm. As placas foram incubadas, a 25 °C, por cinco dias. A porcentagem de compatibilidade entre os dois microrganismos depois da incubação foi calculada mediante a fórmula de Whipps (1987): $(R1-R2)/R1 \times 100$, em que R1 é o crescimento radial do fungo, mensurado em mm, na direção oposta do crescimento da bactéria e R2 representa o crescimento radial do fungo, em mm, em direção do crescimento bacteriano. A inibição de crescimento (GI) foi determinada utilizando-se uma escala: 0-3, em que 0 = não inibição de crescimento (microrganismos compatíveis); 1 = 1% a 25% de inibição de crescimento; 2 = 26% a 50% de inibição de crescimento e 3 = 51% a 75% de inibição de crescimento. Foram testadas quatro repetições para cada isolado de fungo.

Também foi feita a avaliação da compatibilidade entre os isolados *Eleutherascus lectardii* FSA257a, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109, *Haematonectria ipomoeae* FSA381 e *Acremonium polychromum* FSA115 e as duas estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA03-84 e INPA03-11B. Para isso, 1 mL de uma suspensão de 1×10^8 conídios, preparada a partir do

crescimento no meio MEA 2% e 1 mL de 1×10^9 UFC de cada estirpe bacteriana foram inoculados em 200 mL do meio 79 líquido. A avaliação do crescimento foram realizadas mediante observação microscópica (lente objetiva de 40x de aumento) dos dois microrganismos em 50 campos, a cada dois dias, durante o período de incubação, por 10 dias, a 25 °C e 120 rpm. Cada um desses microrganismos foi inoculado no meio 79 líquido e mantido sob as mesmas condições de incubação como tratamentos controle. Foram testadas quatro repetições para cada isolado de fungo.

Promoção de crescimento de caupi por fungos solubilizadores de fosfato e *Bradyrhizobium* sp. estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B

A partir do experimento anterior selecionaram-se dois dos isolados de fungos compatíveis com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-84 e INPA 03-11B e capazes de solubilizar fosfato de cálcio. O isolado *Acremonium polychromum* FSA115, incapaz de solubilizar fosfato de cálcio no meio PVK ágar (Artigo 1), também foi selecionado.

O inóculo dos esporos dos fungos foi preparado utilizando-se a metodologia descrita por Sheng et al. (2011): discos de 0,5 cm de diâmetro do crescimento de cada um dos isolados foram suspensos em uma solução estéril de Tween 80 0,1% (v/v) e solução salina 0,85% (p/v) na proporção 1:1. A partir dessa suspensão fizeram-se diluições utilizando-se o mesmo solvente até atingir 1×10^8 conídios·mL⁻¹, verificado por contagem na câmara de Neubauer.

O inóculo das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-84 e INPA 03-11B foi preparado mediante incubação de cada estirpe no meio 79, a 25 °C, 120 rpm, por 4 dias, até atingir 1×10^9 UFC·mL⁻¹.

As sementes de caupi cultivar Gurgueia BR17 foram desinfetadas por imersão em etanol 95%, por um minuto, depois em hipoclorito de sódio 5%, por 2 minutos, seguindo-se seis lavagens em água destilada estéril.

As sementes foram germinadas, por 72 horas, a 28 °C, no escuro, em placas de Petri de 150 mm x 15 mm, com algodão e papel filtro umedecidos estéreis.

Após a germinação, as sementes foram plantadas em um substrato previamente autoclavado, composto por uma mistura de vermiculita e areia (2:1), na parte superior do vaso Leonard (Vincent 1970) com capacidade para 500 cm³. A parte inferior desse vaso continha 550 mL da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com a seguinte composição por litro: 114,1 g NH₄H₂PO₄, 101,1 g KNO₃, 236,16 g Ca(NO₃)₂, 120,4 g MgSO₄·7H₂O equivalentes a 31 mg P-NH₄H₂PO₄ - 210 mg N-NO₃ - (HPs-HNd). Para cada litro da solução adicionou-se 1 mL da solução de oligoelementos (2,86 g·L⁻¹ H₃BO₃, 1,81 g·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,22 g·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0,08 g·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,02 g·L⁻¹ H₂MoO₄·H₂O) e 1 mL da solução de Fe-EDTA (24,9 g·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 26,1 g·L⁻¹ EDTA).

Os vasos foram organizados na casa de vegetação mediante delineamento inteiramente casualizado com 28 tratamentos, em arranjo fatorial 7 x 2 x 2, sendo 6 inoculantes + 1 tratamento sem inoculação, dois níveis de nitrogênio disponível (210 mg·L⁻¹ N-NO₃ e 21 mg·L⁻¹ N-NO₃) e dois níveis de fósforo solúvel (31 mg·L⁻¹ P-NH₄H₂PO₄ e 3,1 mg·L⁻¹ P-NH₄H₂PO₄). Vinte e quatro tratamentos receberam inoculação microbiana à base de cada estirpe bacteriana e cada isolado de fungo. Os tratamentos com 3,1 mg·L⁻¹ P-NH₄H₂PO₄ solúvel foram acrescidos de 50 mg de P-Ca₃(PO₄)₂-(HPins); os quatro tratamentos restantes não receberam inoculação microbiana, porém, tiveram diferentes níveis de nutrição mineral: 1) com níveis altos de fosfato solúvel e de nitrogênio disponível [31 mg P-NH₄H₂PO₄ - 210 mg N-NO₃ - (HPs-HNd)]; 2)

com nível baixo de fosfato solúvel e nível alto de nitrogênio disponível [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄ - 210 mg N-NO₃ - (LPs-HNd)]; 3) com nível alto de fosfato solúvel e nível baixo de nitrogênio disponível [31 mg P-NH₄H₂PO₄ - 21 mg N-NO₃ - (HPs-LNd)] e 4) com níveis baixos de fosfato solúvel e de nitrogênio disponível [3,1 mg P-NH₄H₂PO₄ - 21 mg N-NO₃ - (LPs-LNd)]. Para cada tratamento, foram realizadas três repetições, tendo sido plantadas quatro sementes por vaso.

Para a inoculação das estirpes das bactérias e dos isolados dos fungos, 1 mL do crescimento bacteriano (1×10^9 UFC·mL⁻¹) e 1 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios·mL⁻¹) foram vertidos sobre cada semente germinada. Após 12 dias de crescimento, foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso e a superfície dos vasos foi coberta com uma fina camada de areia, parafina e clorofórmio, na proporção de 100:0.01:10 (w:w:v), para evitar contaminação e diminuir a perda de umidade por evaporação (Vincent 1970; Florentino et al. 2009). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura entre 25 °C -30 °C, sendo acrescentada a solução de Hoagland e Arnon uma vez por semana. A coleta das plantas foi realizada após 45 dias de crescimento, com o propósito de avaliar o número de nódulos (NN), a massa da matéria seca dos nódulos (MSN), a massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), a massa da matéria seca das raízes (MSR), a massa da matéria seca da totalidade da planta (MST), a eficiência relativa na parte aérea (ERPA) mediante a fórmula: $ERPA = [(MSPA \text{ de cada tratamento} \times 100) / MSPA \text{ da testemunha com HNd+HPs}]$. O teor de nitrogênio, determinado pelo método semimicro Kjeldahl (Fawcett 1954) e o teor de fósforo, calculado segundo o método descrito por Malavolta et al. (2007) da parte aérea e das raízes das plantas, foram usados para determinar o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas (ANPA) e acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), nas raízes (APR) e na totalidade (APT) das plantas. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA.

Análise Estatística

A comparação dos tratamentos em casa de vegetação foi realizada mediante a análise de variância e o posterior agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para todos os valores das variáveis, tendo os valores da variável NN sido previamente transformados pela fórmula $(x+0,5)^{0,5}$, mediante o programa R 2.13.2 (R Development Core Team 2011).

Resultados

Avaliação da compatibilidade *in vitro*

Os valores da GI entre cada isolado fúngico e as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84 e INPA03-11B foram iguais a 0 em todas as repetições, mostrando serem compatíveis entre eles. No entanto, o teste de compatibilidade no caldo 79 entre os isolados *Acremonium polychromum* FSA115, *Eleutherascus lectardii* FSA257a, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* FSA109 e *Haematonectria ipomoeae* FSA381 e cada estirpe bacteriana mostrou ausência de crescimento do isolado *Eleutherascus lectardii* FSA257a com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-84 e INPA 03-11B, após a avaliação microscópica, o que não aconteceu com os outros três isolados de fungos na presença das duas estirpes bacterianas. Os tratamentos controle tiveram crescimento de cada isolado fúngico e de cada estirpe bacteriana sob as mesmas condições de incubação.

Promoção de crescimento de caupi por fungos solubilizadores de fosfato e *Bradyrhizobium* sp. estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B

A ausência de nodulação nos tratamentos não inoculados em qualquer uma das condições de nutrição de fósforo e de nitrogênio corrobora o fato de que não houve contaminação do experimento. Todos os parâmetros nos controles sem inoculação se comportaram como esperado, ou seja, significativamente menores com relação aos tratamentos com inoculação, com exceção das variáveis APR e APT com LNd-HPs (Tabela 1).

À exceção do NN, todos os tratamentos tiveram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre eles para todas as variáveis avaliadas (APÊNDICE A). Houve diferenças na disponibilidade de fósforo para as plantas, dependendo de cada um dos tratamentos. Com LNd-LPs+HPins, os vasos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA115 tiveram maior APT ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos. No entanto, todos os vasos que receberam os inóculos tiveram maiores APPA e APR ($p < 0,05$), excetuando-se aqueles do tratamento INPA03-11B+FSA109 em relação ao tratamento que não teve inoculação. Já com LNd+HPs, o tratamento INPA03-11B+FSA109 teve maior APT ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos, enquanto o APPA foi maior ($p < 0,05$) nos tratamentos INPA03-11B+FSA109, UFLA03-84+FSA109 e UFLA03-84+FSA381 (Tabela 1).

No tratamento INPA03-11B+FSA381 com HPs o APPA foi intermediário em relação aos outros tratamentos, enquanto com LPs+HPins essa variável foi menor ($p < 0,05$) do que nos outros tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 Média dos valores de acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), na raiz (APR) e na totalidade da planta (APT) em função da inoculação com as estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio e os isolados de fungos solubilizadores de fosfato FSA109 e FSA381 e do isolado do fungo não solubilizador de fosfato FSA115 *in vitro* em relação ao alto (HNd) e baixo (LNd) nível de nitrogênio disponível e aos níveis de fósforo solúvel em alta (HPs) e baixa concentração com alta concentração de fósforo insolúvel (LPs+HPins)⁽¹⁾

Tratamento	LNd					
	LPs+HPins			HPs		
	APPA (mg/vaso)	APR (mg/vaso)	APT (mg/vaso)	APPA (mg/vaso)	APR (mg/vaso)	APT (mg/vaso)
INPA03-11B+FSA109	1,84 ^a	0,9 ^b	4,98 ^c	8,68 ^a	2,32 ^b	20,54 ^a
INPA03-11B+FSA115	3,11 ^a	1,6 ^a	11,12 ^a	3,98 ^c	1,32 ^c	12,66 ^c
INPA03-11B+FSA381	0,9 ^b	0,49 ^c	2,58 ^d	5,82 ^b	1,13 ^c	12,48 ^c
Sem Inoculação	0,16 ^b	0,46 ^c	1,22 ^d	4,15 ^c	4,72 ^a	18,75 ^a
UFLA03-84+FSA109	2,15 ^a	1,27 ^a	6,43 ^c	9,32 ^a	0,57 ^d	12,45 ^c
UFLA03-84+FSA115	2,29 ^a	1,31 ^a	7,48 ^b	5,42 ^b	1,19 ^c	15,84 ^b
UFLA03-84+FSA381	2,32 ^a	1,34 ^a	8,25 ^b	9,04 ^a	0,34 ^d	11,88 ^c

Tabela 1, conclusão

	HNd					
	LPs+Hpins			HPs		
INPA03-11B+FSA109	1,5 ^{b*}	0,93 ^a	4,73 ^a	12,82 ^b	0,42 ^f	15,17 ^e
INPA03-11B+FSA115	1,49 ^b	1,11 ^a	5,49 ^a	13,9 ^a	5,49 ^a	41,57 ^a
INPA03-11B+FSA381	1,27 ^b	0,35 ^b	3,16 ^b	2,82 ^c	0,17 ^f	4,36 ^f
Sem Inoculação	0,15 ^c	0,26 ^b	0,8 ^b	11,75 ^c	1,07 ^d	20,51 ^d
UFLA03-84+FSA109	1,59 ^b	0,83 ^a	4,41 ^a	11,79 ^b	1,13 ^c	21,8 ^c
UFLA03-84+FSA115	2,1 ^a	0,99 ^a	5,77 ^a	12,2 ^b	1,03 ^e	21,35 ^c
UFLA03-84+FSA381	1,48 ^b	0,38 ^b	2,88 ^b	12,62 ^b	3,77 ^b	31,22 ^b

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada inóculo, não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade

* Variável analisada mediante o teste de Tukey, a 95% de significância

Com HNd-LPs+HPins, os tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA115, UFLA03-84+FSA109 e UFLA03-84+FSA115 tiveram maiores APR e APT ($p<0,05$) em relação aos outros tratamentos. Já os vasos inoculados com as estirpes UFLA03-84+FSA115 foram os únicos com APPA maior ($p<0,05$) em relação aos outros tratamentos. Com HNd-HPs, os vasos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA115 tiveram maiores APPA, APR e APT ($p<0,05$) em relação aos vasos com os outros inóculos (Tabela 1).

A MSN nos tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA115 e UFLA03-84+FSA115 com LNd-LPS+HPins foi maior ($p<0,05$) em relação aos tratamentos INPA03-11B+FSA381, UFLA03-84+FSA109 e UFLA03-84+FSA381. Além disso, o tratamento INPA03-11B+FSA109 também teve maior NN ($p<0,05$). No entanto, no tratamento UFLA03-84+FSA381 o ANPA foi maior ($p<0,05$) do que nos outros tratamentos, embora o NN e a MSN tenham sido intermediários em relação aos vasos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA381 e UFLA03-84+FSA109. Já o NN e a MSN nos tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA381 e UFLA03-84+FSA115 com LNd+HPs foram maiores ($p<0,05$) em relação aos tratamentos INPA03-11B+FSA115 e UFLA03-84+FSA109. Embora o NN no tratamento UFLA03-84-FSA381 não tenha tido diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) em relação aos tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA381 e UFLA03-84+FSA115 o ANPA desse tratamento foi maior ($p<0,05$) em relação aos outros tratamentos (Tabela 2)

Tabela 2 Média dos valores de número de nódulos (NN), massa da matéria seca de nódulos (MSN) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea da planta (ANPA) em função da inoculação com as estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio e os isolados de fungos solubilizadores de fosfato FSA109 e FSA381 e do isolado do fungo não solubilizador de fosfato FSA115 *in vitro* em relação ao alto (HNd) e baixo (LNd) nível de nitrogênio disponível e aos níveis de fósforo solúvel em alta (HPs) e baixa concentração com alta concentração de fósforo insolúvel (LPs+HPins)⁽¹⁾

Tratamento	LNd					
	LPs+HPins			HPs		
	NN	MSN (mg/vaso)	ANPA (mg/vaso)	NN	MSN (mg/vaso)	ANPA (mg/vaso)
INPA03-11B+FSA109	165 ^a	176,5 ^a	28,46 ^c	103,33 ^a	272 ^a	63,51 ^b
INPA03-11B+FSA115	120 ^b	207,5 ^a	57,08 ^b	53,33 ^b	165 ^b	38,91 ^c
INPA03-11B+FSA381	38,33 ^c	74,5 ^b	17,13 ^d	78 ^a	288,5 ^a	5,17 ^d
Sem Inoculação	0 ^d	0 ^c	2,51 ^e	0 ^c	0 ^c	9,18 ^d
UFLA03-84+FSA109	65,67 ^c	73 ^b	48,5 ^b	40,67 ^b	151 ^b	71,88 ^b
UFLA03-84+FSA115	85,33 ^b	147,5 ^a	54,95 ^b	91,33 ^a	296,5 ^a	46,45 ^c
UFLA03-84+FSA381	106,67 ^b	105 ^b	79,68 ^a	63 ^a	136,5 ^b	103,65 ^a

Tabela 2, conclusão

	HNd					
	LPs+Hpins			HPs		
INPA03-11B+FSA109	114,33 ^a	57 ^{a*}	50,74 ^a	90 ^a	174,5 ^a	135,65 ^a
INPA03-11B+FSA115	86,33 ^a	33,67 ^b	46,12 ^a	75,33 ^a	185 ^a	126,02 ^b
INPA03-11B+FSA381	37,33 ^b	31 ^b	31,79 ^b	22,33 ^b	19,5 ^c	27,33 ^e
Sem Inoculação	0 ^b	0 ^c	12,91 ^c	0 ^b	0 ^c	51,25 ^e
UFLA03-84+FSA109	47,33 ^b	27,5 ^b	52,33 ^a	105 ^a	115 ^b	110,08 ^c
UFLA03-84+FSA115	105,33 ^a	34,5 ^b	53,61 ^a	37 ^b	42 ^c	76,01 ^d
UFLA03-84+FSA381	34 ^b	24 ^b	27,12 ^b	66 ^a	179 ^a	140,86 ^a

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada inóculo não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade

* Variável analisada mediante o teste de Tukey, a 95% de significância

O NN e o ANPA foram maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA0311B+FSA115 e UFLA03-84+FSA115 com HNd-LPs+HPins em relação aos outros tratamentos, enquanto o tratamento UFLA03-84+FSA109 também teve aumento estatisticamente significativo somente para o ANPA sob essas condições de nutrição mineral. Com HNd-HPs, o NN e o MSN foram maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos INPA03-11B+FSA109, INPA03-11B+FSA115 e UFLA03-84+FSA381 do que os outros tratamentos. No entanto, o ANPA foi maior ($p < 0,05$) somente para os tratamentos INPA03-11B+FSA109 e UFLA03-84+FSA381 (Tabela 2).

A ERPA, a MSPA, a MSR e a MST foram maiores ($p < 0,05$) em todos os tratamentos com LNd-LPs+HPins, excetuando-se aqueles inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA109 e INPA03-11B+FSA381, em relação aos tratamentos que não receberam inoculação. A MSPA dos tratamentos INPA03-11B+FSA109, UFLA03-84+FSA109 e UFLA03-84+FSA381 com LNd-HPs foi maior ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos, enquanto a ERPA foi maior ($p < 0,05$) somente para os tratamentos INPA03-11B+FSA109 e UFLA03-84+FSA381. Já os vasos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA109 tiveram respostas maiores ($p < 0,05$) para todas variáveis avaliadas, quando comparadas com os outros tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 Média dos valores de eficiência relativa na parte aérea (ERPA) massa da matéria seca na parte aérea (MSPA), na raiz (MSR) e na totalidade da planta (MST), em função da inoculação com as estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio e os isolados de fungos solubilizadores de fosfato FSA109 e FSA381 e do isolado do fungo não solubilizador de fosfato FSA115 *in vitro* em relação ao alto (HNd) e baixo (LNd) nível de nitrogênio disponível e aos níveis de fósforo solúvel em alta (HPs) e baixa concentração com alta concentração de fósforo insolúvel (LPs+HPins)⁽¹⁾

Tratamento	LNd							
	LPs+HPins				HPs			
	ERPA (%)	MSPA (g/vaso)	MSR (g/vaso)	MST (g/vaso)	ERPA (%)	MSPA (g/vaso)	MSR (g/vaso)	MST (g/vaso)
INPA03-11B+FSA109	93,9 ^b	1,04 ^b	0,55 ^b	1,59 ^b	154,93 ^a	1,65 ^a	0,65 ^a	2,3 ^a
INPA03-11B+FSA115	146,95 ^a	1,43 ^a	0,73 ^a	2,16 ^a	65,73 ^d	0,85 ^b	0,38 ^b	1,23 ^c
INPA03-11B+FSA381	59,62 ^c	0,6 ^c	0,26 ^c	0,86 ^c	102,82 ^c	0,9 ^b	0,28 ^b	1,18 ^c
Sem Inoculação	34,74 ^d	0,37 ^c	0,34 ^c	0,72 ^c	61,97 ^d	0,66 ^b	0,43 ^b	1,09 ^c
UFLA03-84+FSA109	131,46 ^a	1,35 ^a	0,8 ^a	2,15 ^a	124,65 ^b	1,25 ^a	0,32 ^b	1,56 ^b
UFLA03-84+FSA115	148,36 ^a	1,58 ^a	0,7 ^a	2,28 ^a	115,02 ^b	1,07 ^b	0,58 ^a	1,66 ^b
UFLA03-84+FSA381	153,76 ^a	1,55 ^a	0,69 ^a	2,24 ^a	172,53 ^a	1,6 ^a	0,28 ^b	1,88 ^b

Tabela 3, conclusão

	HNd							
	LPs+Hpins				HPs			
INPA03-11B+FSA109	110,56 ^b	1,07 ^b	0,45 ^c	1,52 ^b	256,34 ^a	2,4 ^b	0,35 ^e	2,75 ^c
INPA03-11B+FSA115	110,8 ^b	1,18 ^b	0,64 ^b	1,82 ^b	263,85 ^a	2,81 ^a	1,39 ^a	4,2 ^a
INPA03-11B+FSA381	85,92 ^c	0,92 ^b	0,44 ^c	1,36 ^c	59,39 ^d	0,52 ^d	0,14 ^f	0,66 ^c
Sem Inoculação	27,7 ^e	0,3 ^c	0,29 ^d	0,58 ^d	100 ^d	1,06 ^d	0,48 ^d	1,54 ^e
UFLA03-84+FSA109	103,52 ^b	1,07 ^b	0,57 ^b	1,64 ^b	206,57 ^b	2,07 ^b	0,61 ^c	2,68 ^c
UFLA03-84+FSA115	160,8 ^a	1,56 ^a	0,94 ^a	2,5 ^a	151,64 ^c	1,62 ^c	0,53 ^c	2,15 ^d
UFLA03-84+FSA381	52,58 ^d	0,56 ^c	0,48 ^c	1,04 ^c	246,95 ^a	2,63 ^a	0,98 ^b	3,61 ^b

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada inoculo, não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade

Com HNd-LPs+HPins, o tratamento UFLA03-84+FSA115 teve maiores ERPA, MSPA, MSR e MST ($p < 0,05$), embora os vasos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA115 e UFLA03-84+FSA109 tenham tido desenvolvimento vegetal considerável, no entanto, menor ($p < 0,05$) do que nos vasos inoculados com as estirpes UFLA03-84+FSA115. Com HNd+HPs, o tratamento INPA03-11B+FSA115 teve maiores ($p < 0,05$) MSR e MST em relação aos outros tratamentos. Já a ERPA e a MSPA do tratamento INPA03-11B+FSA115 não tiveram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com a ERPA dos tratamentos INPA03-11B+FSA109 e UFLA03-84+FSA381 e a MSPA do tratamento UFLA03-84+FSA381, respectivamente (Tabela 3).

Discussão

A variabilidade nos resultados dos testes de compatibilidade do isolado *Eleutherascus lectardii* FSA257a com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. poderia ser devido à variação nas propriedades de difusão dos compostos antifúngicos produzidos pelas duas estirpes bacterianas. A avaliação em placa de Petri sob a metodologia empregada favorece a inibição de crescimento mediada por compostos voláteis, enquanto no meio líquido a inibição pode haver acontecido por compostos facilmente solúveis, porém, incapazes de difundir no ágar em placa de Petri como antibióticos ou sideróforos. A produção de substâncias antifúngicas solúveis por estirpes de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio em leguminosas que possam agir no controle biológico já foi evidenciada anteriormente (Bardin et al. 2004; Drapeau et al. 1973).

A aquisição de $P-PO_4$ nos tratamentos com LPs+HPins inoculados com o isolado *Acremonium polychromum* FSA115 e as duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84 e INPA03-11B, conforme evidenciado nos

incrementos significativos do APPA e do APR, sugere a capacidade desse isolado para solubilizar fosfato de cálcio, embora no meio PVK ágar não tenha desenvolvido halo de solubilização após 7 dias de incubação. Nos tratamentos inoculados com a estirpe INPA03-11B a solubilização poderia ser atribuída ao fungo devido à incapacidade dessa estirpe para solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido, o que não acontece com a estirpe UFLA03-84 (Marra et al. 2011). A capacidade do isolado FSA115 para solubilizar é explicada pela variabilidade no início da síntese de ácidos orgânicos com capacidade de solubilizar P-PO₄ em função dos gêneros, das espécies e, inclusive, dos isolados de uma mesma espécie de fungo (Narsian e Patel 2000). Da mesma maneira, essa capacidade pode variar dependendo da metodologia e do meio de cultura empregados na triagem de microrganismos solubilizadores de fosfato (Nautiyal 1999) e da disponibilidade e do tipo de açúcares disponíveis na rizosfera para os microrganismos (Deubel et al. 2007) ao considerar a variabilidade de compostos produzidos pelas raízes.

A capacidade de *Bradyrhizobium* sp. estirpes INPA03-11B e UFLA03-84 para disponibilizar nitrogênio eficientemente ao caupi sob condições de campo com baixa disponibilidade de nitrogênio mineral foi anteriormente descrita (Lacerda et al. 2004; Soares et al. 2006) e verificada neste estudo, embora em associação com fungos solubilizadores de fosfato. Para a estirpe UFLA03-84, junto ao isolado *Haematonectria ipomoeae* FSA381 com LNd, tanto com LPs+HPins como com HPs, o ANPA foi maior ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos (Tabela 2). Da mesma maneira, os tratamentos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA109 e INPA03-11B+FSA115 com HNd-LPs+HPins e com HNd-HPs tiveram maior NN (Tabela 2), sugerindo que, ao aumentar a disponibilidade de fosfato para a planta, que pode ser adquirido por solubilização mediante a atividade de um microrganismo ou a partir de uma fonte diretamente assimilável, o número de nódulos formados pela estirpe

INPA03-11B nas raízes de caupi aumentou. Além disso, o ANPA também foi maior ($p < 0,05$) nos tratamentos inoculados com as estirpes INPA03-11B+FSA109 e INPA03-11B+FSA115 com HPs e com LPs+HPins devido a uma provável atividade sinérgica entre a bactéria e o fungo. Seneviratne e Jayasinghearachchi (2005) e Seneviratne et al. (2010) evidenciaram o aumento na nodulação, na atividade da enzima nitrogenase bacteriana e o no teor de nitrogênio em *Glycine max* em presença de uma fonte insolúvel de fosfato e de $N-NO_3$ no solo após coinoculação da estirpe *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e de um isolado de *Penicillium* sp. em relação aos tratamentos sem inoculação.

Assim, com LPs+HPins, tanto com LNd como com HNd, o isolado *Acremonium polychromum* FSA115 junto às estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA 03-84 e INPA03-11B favoreceu o maior desenvolvimento vegetal do caupi. No entanto, com HPs, a coinoculação entre a estirpe UFLA03-84 e o isolado *Haematonectria ipomoeae* FSA381 teve esse efeito sob as duas condições de nitrogênio mineral testadas. Já para o tratamento inoculado com as cepas INPA03-11B+FSA109 com LNd-HPs, o aumento no desenvolvimento vegetal (Tabela 3) teve relação com os incrementos significativos ($p < 0,05$) no acúmulo de fósforo e na nodulação (Tabelas 1 e 2).

Na base desses dados, a capacidade diferenciada para estimular o crescimento vegetal entre fungos solubilizadores de fosfato e bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio em leguminosas variou entre os tratamentos em função da disponibilidade de nitrogênio mineral e de fósforo solúvel, conforme reportado anteriormente em outro estudo por Abd-Alla e Omar (2001), evidenciando a variabilidade nas interações entre os microrganismos para promover o desenvolvimento de caupi em relação à disponibilidade de fósforo e de nitrogênio para essa espécie vegetal. No entanto, são necessárias posteriores pesquisas de campo, com o propósito de verificar a efetividade da coinoculação

desse de fungos solubilizadores de fosfato e de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio ao considerar a complexidade do sistema edáfico.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas aos autores.

Referências

Abd-Alla MH, Omar SA (2001) Survival of Rhizobia/Bradyrhizobia and a rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agro-industrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. *J Plant Nutr* 24: 261-272

Bardin SD, Huang HC, Pinto J, Amundsen EJ, Erickson RS (2004) Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Can J Bot* 82: 291-296

Deubel A, Gransee A, Merbach W (2007) Tricalcium-phosphate solubilizing efficiency of rizosphere bacteria depending on the P-nutritional status of the host plant. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (Ed) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Salamanca, Spain, 16-19 July 2002. Springer, Dordrecht, pp 257-260.

Drapeau R, Forti JA, Gagnon C (1973) Antifungal activity of *Rhizobium*. *Can J Bot* 51: 681-682

Fawcet JK (1954) The semi-micro Kjeldahl method for the determination of nitrogen. *J Med Lab Technol* 12: 1-22

- Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, da Silva K, Moreira FMS (2009) *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci Agric* 66: 667-676
- Fred EB, Waksman SA (1928) *Laboratory Manual of General Microbiology*. McGraw-Hill, New York
- Gadd GM (1999) Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. *Adv Microb Physiol* 41: 47-92
- Hoagland DR, Arnon DT (1950) *The water culture methods for growing plants without soil*. Berkeley: California Agriculture Experimental Station
- Lacerda AM, Moreira FMS, Andrade, MJB, Soares ALL (2004) Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. *Revista Ceres* 51: 67-82
- Lopes AS (1989) *Manual de Fertilidade do Solo*. Anda, São Paulo
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1997) *Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e Aplicações*. Potafos, Piracicaba
- Marra LM, de Oliveira SM, Soares CRFS, Moreira FMS (2011) Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Sci Agric* 68: 603-609
- Moreira FMS, Siqueira JO (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, 2nd edn. Editora UFPA, Lavras
- Narsian V, Patel HH (2000) *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol Biochem* 32: 559-565
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265-270
- R Development Core Team (2011) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Viena, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org> (Acesso: 01 junho 2011)

- Safdi N, Chérif M, Fliss I, Boudabbous A, Antoun H (2001) Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J Plant Pathol* 83: 101-118
- Seneviratne G, Jayasinghearachchi HS (2005) A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biol Biochem* 37:1975-1978
- Seneviratne G, Weerasekara MLMAW, Seneviratne KACN, Zavahir JS, Kecskés ML, Kennedy IR (2010) Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. In: Maheshwari DK (ed) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, pp 81-95
- Sheng STH, Brandl MT, Hernlem B, Eng JG, Sarreal SBL (2011) Fluorescent Viability Strains to Probe the Metabolic Status of Aflatoxigenic Fungus in Dual Culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. *Mycopathologia* 171: 133-138
- Soares LAL, Resende PAJP, Avelar FPA, Martins VHM, Silva LA, Bastos AMJ, Moreira FMS (2006) Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). *I-CAUPI. Revista Brs Ciênc Solo* 30: 795-802
- Vincent JM (1970) *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Whipps JM (1987) Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol* 107: 127-142

APÊNDICES

Apêndice A Quadros da análise de variância para as variáveis acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA), na raiz (APR) e na totalidade da planta (APT)

APPA:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	134,52	22,42	41,21	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	1113,69	1113,69	2047,21	2,2 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	85,84	85,84	157,74	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P	6	76,20	12,70	23,35	1,31 ⁻¹³
Tra:N	6	66,02	11,00	20,22	2,01 ⁻¹²
P:N	1	128,91	128,91	236,97	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P:N	6	96,12	16,02	29,45	1,22 ⁻¹⁵
Resíduos	56	30,46	0,54		
CV		14,1%			

APR:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	24,71	4,12	83,93	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	16,65	16,65	339,36	2,2 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	0,11	0,11	2,35	0,13
Tra:P	6	20,44	3,40	69,42	2,2 ⁻¹⁶
Tra:N	6	29,43	4,90	99,96	2,2 ⁻¹⁶
P:N	1	1,71	1,71	34,85	2,17 ⁻⁷
Tra:P:N	6	42,03	7,00	142,78	2,2 ⁻¹⁶
Resíduos	56	2,75	0,04		
CV		16,8%			

APT:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	950,3	158,4	70,32	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	3920,9	3920,9	1740,98	2,2 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	143,1	143,1	63,54	8,61 ⁻¹¹
Tra:P	6	388,2	64,7	28,72	2,05 ⁻¹⁵
Tra:N	6	528,5	88,1	39,11	2,2 ⁻¹⁶
P:N	1	469,6	469,6	208,50	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P:N	6	1098,9	183,1	81,32	2,2 ⁻¹⁶
Resíduos	56	126,1	2,3		
CV		12,7%			

Apêndice B Quadros da análise de variância para as variáveis número de nódulos (NN), massa da matéria seca de nódulos (MSN) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA)

NN:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	47,75	7,96	392,39	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	0,09	0,09	4,42	0,04
Nitrogênio(N)	1	0,14	0,14	6,80	0,01
Tra:P	6	0,23	0,04	1,93	0,09
Tra:N	6	0,38	0,06	3,11	0,01
P:N	1	0,01	0,02	0,79	0,377
Tra:P:N	6	0,96	0,16	7,89	3,5 ⁻⁶
Resíduos	56	1,14	0,02		
CV		9,38%			

MSN:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	214556	35759	40,25	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	114294	114294	128,64	3,88 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	146877	146877	165,32	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P	6	24369	4062	4,57	0,0007
Tra:N	6	86816	14469	16,23	9,56 ⁻¹¹
P:N	1	35	35	0,03	0,84
Tra:P:N	6	93167	15528	17,49	2,80 ⁻¹¹
Resíduos	56	49734	888		
CV		27%			

ANPA:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	50169	8361,4	224,54	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	21028	21028,4	564,69	2,2 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	10614	10614,4	285,03	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P	6	13651	2275,1	61,09	2,2 ⁻¹⁶
Tra:N	6	5601	933,5	25,07	3,24 ⁻¹⁴
P:N	1	12545	12544,6	336,88	2,2 ⁻¹⁶
Trat:P:N	6	4976	829,3	22,27	3,27 ⁻¹³
Resíduos	56	2085	37,2		
CV		10,3%			

Apêndice C Quadros da análise de variância para as variáveis eficiência relativa na parte aérea (ERPA) massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca da totalidade da planta (MST)

ERPA:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	119916	19986	119,35	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	46918	46918	280,19	2,2 ⁻¹⁶
Nitrogênio(N)	1	14683	14683	87,68	4,68 ⁻¹³
Tra:P	6	39042	6507	38,86	2,2 ⁻¹⁶
Tra:N	6	20919	3486	20,82	1,17 ⁻¹²
P:N	1	39086	39086	233,42	2,2 ⁻¹⁶
Tra:P:N	6	45244	7541	45,93	2,2 ⁻¹⁶
Resíduos	56	9377	167		
CV		10,34%			

MSPA:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	12,74	2,12	37,53	2,2 ⁻¹⁶
P	1	4,51	4,51	79,88	2,28 ⁻¹²
N	1	1,61	1,61	28,57	1,71 ⁻⁶
Tra:P	6	4,05	0,67	11,94	1,37 ⁻⁸
Tra:N	6	1,56	0,26	4,59	0,0007
P:N	1	4,39	4,39	77,67	3,61 ⁻¹²
Tra:P:N	6	4,41	0,73	13,00	3,79 ⁻⁹
Resíduos	56	3,17	0,05		
CV		18,7%			

MSR:

Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	2,16	0,36	49,96	2,2 ⁻¹⁶
Fósforo(P)	1	0,02	0,02	3,51	0,06
Nitrogênio(N)	1	0,17	0,17	24,41	7,38 ⁻⁶
Tra:P	6	0,58	0,09	13,20	2,96 ⁻⁹
Tra:N	6	0,78	0,13	18,14	1,45 ⁻¹¹
P:N	1	0,35	0,35	49,47	3,04 ⁻⁹
Tra:P:N	6	1,56	0,26	35,99	2,2 ⁻¹⁶
Resíduos	56	0,40	0,007		
CV		15,6%			

Apêndice C, conclusão

MST:					
Resposta	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento(Tra)	6	2,16	0,36	49,96	$2,2^{-16}$
Fósforo(P)	1	0,02	0,02	3,51	0,06
Nitrogênio(N)	1	0,17	0,17	24,41	$7,38^{-6}$
Tra:P	6	0,58	0,09	13,20	$2,96^{-9}$
Tra:N	6	0,78	0,13	18,14	$1,45^{-11}$
P:N	1	0,35	0,35	49,47	$3,04^{-9}$
Tra:P:N	6	1,56	0,26	35,99	$2,2^{-16}$
Resíduos	56	0,40	0,007		
CV		15,6%			