

**CHARLES NARLOCH**

**“INTERAÇÃO MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES  
DE FOSFATOS - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS  
E O CRESCIMENTO DE *Pinus taeda* L.”**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como requisito parcial à obtenção do grau  
de Mestre. Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Universidade Federal de  
Santa Catarina. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Vetúria Lopes de Oliveira. Co-orientador:  
Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho.

**FLORIANÓPOLIS**

**2002**

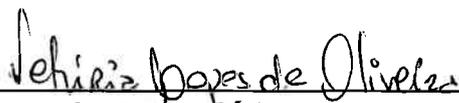
**"INTERAÇÃO MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE  
FOSFATOS - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E O  
CRESCIMENTO DE *Pinus taeda* L."**

POR

**CHARLES NARLOCH**

Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pela Orientadora e membros da  
Comissão Examinadora.

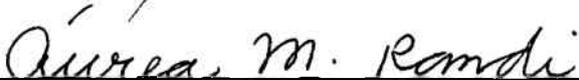
Comissão Examinadora:



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> **Veturia Lopes de Oliveira**  
MIP/CCB/UFSC



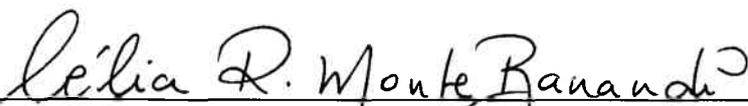
Prof. Dr. **Germano Nunes Silva Filho**  
MIP/CCB/UFSC



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> **Aurea Maria Randi**  
BOT/CCB/UFSC



Prof. Dr. **Carlos Henrique Lemos Soares**  
BQA/CCB/UFSC



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> **Célia Regina Monte Barandi** - MIP/CCB/UFSC  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, maio de 2002.

**à vó Frida**

***"Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo.  
Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens,  
além daquele que há em sua própria alma.  
Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave.  
Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo".***  
**Hermann Hesse**

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Vetúria Lopes de Oliveira e ao Professor Dr. Germano Nunes Silva Filho, pela amizade e orientação irrestritas, desde a graduação;
- À Professora Dra. Áurea Maria Randi e ao Professor Dr. Carlos Henrique Lemos Soares, pela contribuição na determinação de ácidos e hormônios vegetais;
- Ao Professor Dr. Paulo Emílio Lovato, pela orientação inicial;
- Ao Professor Dr. Artur Smânia Junior, pela utilização dos equipamentos do Laboratório de Antibióticos;
- Ao químico Dr. Alessandro Branco e à bióloga Suzana Johann, pelo auxílio nos procedimentos de extração de hormônios vegetais;
- Ao Laboratório de Uso Comum do Centro de Ciências Biológicas, pelo uso dos equipamentos de HPLC;
- À bióloga Dra. Isabella Canha dos Santos e ao Eng. Agr. Luiz Afonso Borges de Souza, pela amizade, ajuda, estímulo, interesse e compreensão;
- Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas: Betina, Dan, Djoni, Elsimar, Elza, Leyza, Luciano, Márcio, Melissa e Pedro, pela convivência agradável e constante ajuda;
- Às amigas do mestrado: Ana Carla, Elaine, Juliane, Patrícia e Sandra, pelos bons momentos vividos;
- Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia, pelo uso das instalações;
- À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;
- Ao FUNPESQUISA, pelo financiamento das pesquisas;
- Ao Eng. Químico Marcelo dos Santos Azevedo, pela convivência e incentivo;
- *Em especial à minha família:*
- À minha irmã, Mauren, pelo carinho e companhia;
- Ao meus sobrinhos, Mariana e Maurício, pelo carinho e ajuda incansável na montagem e desmontagem dos experimentos;
- À minha mãe, Ivone, pelo apoio, dedicação, amor, carinho e compreensão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>NOMENCLATURA</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>1.1 - A PRODUÇÃO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NO BRASIL</b> .....	3
<b>1.2 - O CICLO DO FÓSFORO</b> .....	9
<b>1.3 - A PROBLEMÁTICA DO FÓSFORO NA NUTRIÇÃO VEGETAL</b> .....	10
<b>1.4 - MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS</b> .....	13
1.4.1 - Isolamento e seleção .....	18
1.4.2 - População no solo e na rizosfera .....	18
1.4.3 - Promoção do crescimento vegetal .....	19
1.4.4 - Efeitos da inoculação sobre o crescimento vegetal .....	22
1.4.5 - Potencial de uso biotecnológico .....	23
<b>1.5 - MECANISMOS DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS</b> .....	23
1.5.1 - Produção de ácidos por microrganismos quimiorganotróficos .....	24
1.5.2 - Outros mecanismos .....	27
1.5.3 - Influência das fontes de C e N na solubilização de fosfatos .....	30
1.5.4 - Genética da solubilização de fosfatos .....	30
<b>1.6 - ECTOMICORRIZAS</b> .....	31
1.6.1 - Conceito e importância .....	31
1.6.2 - Morfologia e ocorrência .....	32
1.6.3 - Interações na micorrizosfera .....	36
1.6.4 - Biodegradação mineral por ectomicorrizas .....	38
1.6.5 - Potencial de uso biotecnológico .....	39

## **CAPÍTULO 2**

<b>MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO SIMULTÂNEO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>

## **CAPÍTULO 3**

<b>INTERAÇÃO MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM MEIO DE CULTURA .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
3.2.1 - Avaliação do crescimento em meio sólido .....	53
3.2.2 - Solubilização de fosfato em meio líquido .....	54
<b>3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
3.3.1 - Avaliação do crescimento em meio sólido .....	57
3.3.2 - Avaliação do crescimento e solubilização em meio líquido .....	61
<b>3.4 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>

## **CAPÍTULO 4**

<b>INOCULAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> L. ....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>4.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
4.2.1 - Microrganismos e produção do inóculo .....	79
4.2.2 - Plantio e inoculação .....	80
4.2.3 - Coleta e avaliação das plantas .....	82
<b>4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>4.4 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>

<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUBSTÂNCIAS INDÓLICAS POR MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS</b>	102
<b>5.1 - INTRODUÇÃO</b>	102
<b>5.2 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	103
5.2.1 - Produção de ácidos orgânicos	103
5.2.2 - Produção de ácido indol-3-acético	105
<b>5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	115
5.3.1 - Produção de ácidos orgânicos	115
5.3.2 - Produção de ácido indol-3-acético	119
<b>5.4 - CONCLUSÕES</b>	125
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	126
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	130
<b>ANEXOS</b>	149

## LISTA DE TABELAS

1.1 - Principais espécies de bactérias solubilizadoras de fosfatos .....	14
1.2 - Principais espécies de fungos solubilizadores de fosfatos .....	15
2.1 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados do solo ou da rizosfera de cultivos de espécies vegetais perenes em Santa Catarina .....	42
2.2 - Fungos ectomicorrízicos isolados de plantações florestais em Santa Catarina .....	42
2.3 - Composição dos meios testados no cultivo de microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos .....	43
3.1 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados do solo ou da rizosfera de cultivos de espécies vegetais perenes em Santa Catarina .....	53
3.2 - Fungos ectomicorrízicos isolados de plantações florestais em Santa Catarina .....	53
3.3 - Produção de matéria seca (g) de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias .....	64
3.4 - Porcentagem de fósforo (%P) na matéria seca de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias .....	66
3.5 - Quantidade total de fósforo (mg) na matéria seca de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias .....	68
3.6 - pH do meio GEL inoculado com MSF e fECM e incubado a 25°C por 15 dias .....	68
4.1 - Matéria seca da parte aérea (g) de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	86
4.2 - Matéria seca da raiz (g) de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	87

4.3 - Matéria seca total (g) de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	87
4.4 - Comprimento radicular (m) de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	92
4.5 - Colonização micorrízica (%) de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	94
4.6 - Porcentagem de fósforo na parte aérea de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	96
4.7 - Quantidade total de fósforo (mg) na parte aérea de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) .....	97
5.1 - Produção de ácido indol-3-acético em meio GEL cultivado com fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) .....	122

## LISTA DE FIGURAS

1.1 - Exportação de produtos agroflorestais brasileiros no ano 2000 .....	4
1.2 - Participação dos produtos de papel e celulose nas exportações agroflorestais brasileiras entre os anos de 1996 e 2000 (%) .....	5
1.3 - Consumo de carvão vegetal de origem de florestas nativas e florestamentos no Brasil entre os anos de 1990 e 1999 (%) .....	6
1.4 - Participação dos Estados brasileiros na produção de madeira cultivada para processamento mecânico, em 1999 .....	7
1.5 - Principais Estados brasileiros exportadores de móveis de madeira (%) .....	8
1.6 - Participação dos principais produtos nas exportações catarinenses do primeiro bimestre de 2002 (%) .....	8
1.7 - Ciclo do fósforo no solo .....	10
1.8 - Formas de retenção do fósforo no solo .....	12
1.9 - Formas de atuação dos microrganismos solubilizadores de fosfatos na promoção do crescimento vegetal .....	20
1.10 - Oxidação extracelular da glicose a ácido glicônico e ácido 2-cetoglicônico por bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> .....	26
1.11 - Mecanismos envolvidos na solubilização microbiana de fosfatos .....	29
1.12 - Ectomicorriza em eucalipto e pínus .....	33
1.13 - Alguns gêneros de fungos ectomicorrízicos encontrados em plantações de <i>Pinus</i> e <i>Eucalyptus</i> em Santa Catarina .....	35
2.1 - Crescimento de microrganismos solubilizadores de fosfatos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA .....	45
2.2 - Crescimento de fungos ectomicorrízicos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA .....	46
2.3 - Aspecto de crescimento de fungos ectomicorrízicos nos meios GEL, GMM, MNM e GMA .....	49

3.1 - Forma de inoculação conjunta e medida do crescimento de fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) em meio de cultura .....	54
3.2 - Procedimento para separação e quantificação do micélio e do meio ..	55
3.3 - Crescimento de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) após 6 dias de confrontação a 25°C nos meios GEL e GMM .....	58
3.4 - Aspecto de crescimento de fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF), após 6 dias de confrontação em meio GEL .....	61
3.5 - Quantidade de fósforo no meio GEL inoculado isoladamente com MSF e fECM .....	62
3.6 - Quantidade de fósforo no meio GEL (g L <sup>-1</sup> ) inoculado com fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) .....	63
3.7 - Quantidade de fósforo no meio GEL (g L <sup>-1</sup> ) inoculado com MSF e fECM .....	65
3.8 - Análise de regressão entre fósforo e pH no meio GEL inoculado com MSF isoladamente .....	69
3.9 - Análise de regressão entre a porcentagem de P, quantidade total de P e pH do meio GEL inoculado com fECM isoladamente .....	70
4.1 - Produção de inóculo líquido concentrado de fungos solubilizadores de fosfatos .....	80
4.2 - (A): Aspecto das culturas de MSF aos 5 dias de incubação em meio GEL. (B): Aspecto do inóculo líquido concentrado de MSF após trituração ou ressuspensão .....	81
4.3 - Aspecto do inóculo e da inoculação dos fECM em <i>Pinus taeda</i> L. ....	83
4.4 - Procedimento de avaliação das plantas de <i>Pinus taeda</i> L., após 150 dias de crescimento em casa-de-vegetação .....	84
4.5 - Avaliação da colonização radicular pela técnica das interseções de GIOVANETTI & MOSSE (1980) modificada por BRUNDRETT et al. (1996) .....	85

4.6 - Aspecto das plantas de <i>P. taeda</i> inoculadas com o isolado MSF-262 ( <i>Penicillium</i> sp.) individualmente e simultaneamente com fECM .....	89
4.7 - Aspecto das plantas de <i>P. taeda</i> inoculadas com o isolado UFSC-Cg02 ( <i>Cenococcum geophilum</i> ) individualmente e simultaneamente com MSF .....	90
4.8 - Interações entre MSF e fECM com respostas positivas à inoculação conjunta sobre o crescimento das plantas de <i>P. taeda</i> L. ....	91
4.9 - Interações entre MSF e fECM com respostas negativas à inoculação conjunta sobre o crescimento das plantas de <i>P. taeda</i> L. ....	91
4.10 - Análise de regressão entre as médias de matéria seca total e de comprimento radicular de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com fECM e MSF .....	93
4.11 - Aspecto das raízes de <i>Pinus taeda</i> L. (A) Planta inoculada com os isolados UFSC-Cg02 + MSF-195. (B) Planta não inoculada. Aumento de 40X. ....	95
4.12 - Análise de regressão entre as médias de P no meio GEL cultivado com fungos solubilizadores de fosfatos (potencial relativo à biomassa) e de P total na parte aérea de mudas de <i>Pinus taeda</i> L. inoculadas com os mesmos isolados .....	98
5.1 - Técnica para determinação de ácidos orgânicos em meio de cultura, por HPLC, adaptada de BOLAN et al (1994) .....	106
5.2 - Cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos em HPLC .....	107
5.3 - Curva de calibração para determinação de substâncias indólicas por espectrofotometria a 530 nm .....	109
5.4 - Extração de substâncias indólicas, por metodologia adaptada de STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984) .....	111
5.5 - Cromatograma do padrão de 10 mg L <sup>-1</sup> de ácido indol-3-acético em HPLC .....	112
5.6 - Curva de calibração para determinação de AIA por HPLC .....	113
5.7 - Técnica para determinação de AIA, adaptada de POKOJSKA-BURDZIEJ (1984), RANDI & CROZIER (1991), SARWAR & KREMER (1995) e CATTELAN (1999) .....	114

<b>5.8 - Cromatograma da testemunha não inoculada em HPLC .....</b>	<b>116</b>
<b>5.9 - Cromatograma do caldo de cultura do isolado UFSC-Rh106 (<i>Rhizopogon vulgaris</i>) em HPLC .....</b>	<b>117</b>
<b>5.10 - Cromatogramas de substâncias indólicas produzidas pelos fECM e MSF, obtidos por TLC .....</b>	<b>120</b>
<b>5.11 -Cromatograma do extrato de caldo de cultura do isolado MSF-195 (<i>Aspergillus</i> sp.) em HPLC .....</b>	<b>124</b>

## RESUMO

O aumento da demanda por produtos florestais é uma realidade no Brasil e no mundo. Com as restrições ao aumento das áreas reflorestadas, as pesquisas atuais buscam aumentar a produtividade das plantações. A baixa disponibilidade de fósforo (P) no solo determina o uso de intensa adubação com fosfatos solúveis em larga escala, onerando os custos de produção. Além disso, parte desses fosfatos é convertida a formas insolúveis, indisponíveis às plantas. Diversos microrganismos do solo atuam na ciclagem do P, entre eles os solubilizadores de fosfatos (MSF) e os fungos ectomicorrízicos (fECM). Os MSF, geralmente fungos e bactérias de vida livre no solo, disponibilizam os fosfatos de baixa solubilidade. Os fECM favorecem a absorção de P e, em alguns casos, podem atuar como solubilizadores. Além disso, ambos podem produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal. A possibilidade de utilização desses microrganismos em inoculações conjuntas é uma alternativa às práticas atuais para aumento da produtividade. Para tanto, são necessários estudos sobre a compatibilidade entre esses microrganismos, que possibilitem sua aplicação como inóculo em sistemas de produção de plantas. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar as interações entre MSF e fECM e seu efeito sobre o crescimento e absorção de P em *Pinus taeda* L. Inicialmente, observou-se que os meios GEL e GMM são adequados ao crescimento conjunto de MSF e fECM. Quatro fECM e oito MSF foram estudados em meio sólido e líquido, avaliando-se o efeito do cultivo simultâneo sobre o crescimento e solubilização de fosfato. As interações de neutralismo predominaram, indicando a possibilidade de inoculação conjunta. Em meio GEL, todos os MSF e fECM (isoladamente ou em combinação) solubilizaram fosfato de cálcio. Não houve correlação entre a solubilização e o pH. Dois fECM apresentaram potencial de solubilização superior aos obtidos pela maioria dos MSF. Algumas interações apresentaram aumento na quantidade de P solubilizado, e houve efeito sinérgico na interação UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) + MSF-262 (*Penicillium* sp.). O estudo em casa de vegetação demonstrou que MSF e fECM, inoculados isoladamente ou em combinação, são capazes de promover a absorção de P e o crescimento de *P. taeda*. Houve correlação positiva entre o P solubilizado em meio de cultura e o P absorvido pelas plantas. Resultados obtidos por TLC, espectrofotometria e HPLC demonstraram que os isolados MSF-195, MSF-251 (*Aspergillus* spp.), UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) e UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) produziram substâncias indólicas em meio GEL com L-triptofano. Entretanto, não houve correlação entre a produção de matéria seca e a produção de AIA. Para os parâmetros de solubilização e absorção de fósforo por mudas de *P. taeda*, os melhores resultados foram obtidos com as combinações UFSC-Cg02 + MSF-262, UFSC-Cg02 + MSF-239, UFSC-Cg02 + MSF-310A e UFSC-Su155 + MSF-310A.

## ABSTRACT

Increasing the production of reforestation areas is a real necessity in Brazil and worldwide. However, because of the restrictions imposed upon the use of new areas, research is focusing in improving the productivity of reforested land. The low disponibility of soil P requires the application of soluble phosphates, with higher production costs. Besides, an important portion of the P applied may be converted into insoluble forms, less available to plants. Many soil microorganisms are active in P cycling, including phosphate solubilizing microorganisms (PSM) and mycorrhizal fungi. The PSM, most of them free-living soil fungi and bacteria, are able to transform soil P to products available to plants. Ectomycorrhizal fungi (ECMf) increase P-uptake by plants and its solubilization. Both types of microorganisms may also produce plant growth promoting substances. The application of these microorganisms in controlled inoculation is an alternative to traditional fertilization practices to augment reforestation productivity. Studies concerning the compatibility between these different microorganisms are necessary before their application as mixing inoculum in plant production systems. In this context, this study aims to determine the interactions between PSM and ECMf and their effect on growth and P-uptake by *Pinus taeda* L. seedlings. The first assay revealed that GEL and GMM are adequate media to double cultivating ECMf and PSM. Four ECMf and eight PSM were studied on solid and liquid media concerning their mutual effects and on phosphate solubilization. Most of the combinations between these two types of microorganisms showed neutral interaction. In GEL medium, PSM and ECMf (alone or in combination) were able to solubilize calcium phosphate. No correlation between P-solubilizing and pH of the medium was observed. Two ECMf presented higher P-solubilization potential than some PSM. Some ECMf-PSM combinations induced a higher quantity of solubilized P, and a synergetic effect was observed when the isolates UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) + MSF-262 (*Penicillium* sp.) were cultivated together. In greenhouse, inoculation of *P. taeda* with PSM and ECMf, alone or in combination, promoted higher P-uptake and plant growth than the non-inoculated control. There was a significant correlation between P-solubilized in GEL medium and P-uptake by plants. According to the results obtained by TLC, spectrophotometry and HPLC techniques, the isolates MSF-195, MSF-251 (*Aspergillus* spp.), UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) and UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) produced indol-3-acetic acid (IAA) in GEL medium supplied with L-tryptophan. No correlation was observed between IAA production and dry matter. In terms of P-solubilizing and P-uptake by plants, the best results were obtained with the combination of UFSC-Cg02 + MSF-262, UFSC-Cg02 + MSF-239, UFSC-Cg02 + MSF-310A and UFSC-Su155 + MSF-310A.

## NOMENCLATURA

Ø	Diâmetro
µg	Micrograma(s)
µm	Micrômetro(s)
ABRACAWE	Associação Brasileira de Carvão Vegetal
AIA	Ácido indol-3-acético
Al	Alumínio
BAM	Bactéria(s) auxiliar(es) da micorrização
°C	Grau(s) Celsius
Ca	Cálcio
cm	Centímetro(s)
CSIRO	<i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization - Austrália</i>
d	Densidade
ECM	Ectomicorriza(s)
Eq.	Equivalente(s)
Fe	Ferro
fECM	Fungo(s) ectomicorrízico(s)
FMA	Fungo(s) micorrízico(s) arbuscular(es)
g	Força centrífuga
g	Gramas(s)
GEL	Meio glicose extrato de levedura
GMA	Meio GEL + MNM Aditivo
GMM	Meio GEL + MNM Médio
h	Hora(s)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IBDF	Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICEPA	Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina - Instituto Cepa/SC
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais
K	Potássio
kg	Quilograma(s)
L	Litro(s)

*continua...*

M	Molar
m	Metro(s)
MA	Micorriza(s) arbuscular(es)
MARX270	Isolado de <i>Pisolithus tinctorius</i>
MDIC	Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior
mg	Miligrama(s)
min	Minutos(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar
MNM	Meio Melin-Norkrans modificado
Mps	Fenótipo <i>Mineral phosphate solubilization</i>
MSF	Microrganismo(s) solubilizador(es) de fosfatos
N	Normal ; nitrogênio
N.D.	Não determinado
N.S.	Não significativo
nm	Nanômetro(s)
P	Probabilidade
P	Fósforo
P.A.	Para análise
P-B	Solução de molibdato de amônio
P-C	Solução de ácido-1-amino-2-naftol-sulfônico
Pi	Fósforo inorgânico
Rf	Distância de referência
s	Segundo(s)
SBS	Sociedade Brasileira de Silvicultura
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
TLC	Cromatografia de camada delgada
UV/VIS	Ultravioleta visível

## INTRODUÇÃO

Grande parte da demanda mundial de madeira é suprida pelo desmatamento de florestas nativas. Nos trópicos, estima-se que cerca de dez milhões de hectares de florestas são removidos anualmente. As conseqüências são drásticas, e vão desde a extinção de espécies até a erradicação de ecossistemas inteiros, afetando o equilíbrio ecológico e ocasionando sérias alterações no clima do planeta.

Os setores de produção que buscam suprir sua demanda a partir de florestamentos com espécies exóticas ou nativas, ainda são insuficientes no Brasil. Na região Sul, os florestamentos com pínus e eucaliptos respondem pela maior parte da demanda local de madeira, mas o constante aumento do consumo mundial de produtos florestais exige uma ampliação dessa oferta a curto prazo.

A importância do setor florestal é inegável e não se limita às características sócio-econômicas. Se puderem expandir sua produção de forma racional e controlada, os florestamentos poderão contribuir para que novas áreas de florestas nativas não sejam eliminadas.

Entre as tecnologias desenvolvidas nas últimas décadas, para otimizar a produtividade vegetal, destacam-se as biotecnológicas, por oferecer alternativas econômicas e adequadas à produção racional. Os sistemas de micropropagação e a utilização de microrganismos benéficos ao crescimento vegetal são exemplos dessa nova realidade. Nesse sentido, o Brasil ocupa uma posição de destaque por ser detentor de uma tecnologia florestal das mais avançadas do planeta.

Um dos fatores que limita a produção de essências florestais no Brasil é a fertilidade do solo, onde o fósforo representa um dos maiores problemas, em decorrência de sua baixa disponibilidade. A adubação com fosfatos solúveis é utilizada em larga escala na produção de mudas, onerando os custos. A maior parte desses é convertida a formas insolúveis, indisponíveis aos vegetais.

Diversos grupos de microrganismos do solo vêm sendo estudados por seu papel importante na ciclagem desse macronutriente, entre eles os solubilizadores

de fosfatos e os fungos micorrízicos. Os microrganismos solubilizadores de fosfatos, de vida livre no solo, disponibilizam fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade. Os fungos ectomicorrízicos favorecem a absorção de nutrientes e podem, também, apresentar capacidade de solubilizar fosfatos. Além disso, ambos podem promover o crescimento das plantas pela produção de hormônios vegetais e vitaminas ou, ainda, atuar na fração orgânica do fósforo através da produção de fosfatases.

Estudos sobre a utilização de inoculantes contendo microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos, para a produção de plantas cultivadas, são raros. A definição de uma metodologia que torne isso possível, e que permita incrementar a produção de pinus, pode se constituir numa importante alternativa às práticas convencionais. Para tanto, tornam-se necessários estudos sobre a compatibilidade entre os diferentes tipos de microrganismos, o cultivo em diferentes substratos, os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal e, finalmente, os métodos de inoculação em viveiro ou a campo.

Os estudos detalhados nesta dissertação baseiam-se na hipótese de que os microrganismos pertencentes às coleções dos Laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas da Universidade Federal de Santa Catarina apresentam potencial para promover o crescimento vegetal por diferentes mecanismos, com a possibilidade de serem utilizados conjuntamente na forma de inoculantes desenvolvidos para a produção de mudas de pinus. Este trabalho teve como objetivos selecionar meios de cultura que possibilitem o crescimento conjunto de microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos; estudar a compatibilidade entre isolados desses grupos; verificar os mecanismos envolvidos nos processos de solubilização de fosfato e na promoção do crescimento de plantas, através da determinação da produção microbiana de ácidos orgânicos e hormônios vegetais; e verificar o efeito da inoculação com microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos sobre o crescimento, absorção de fósforo e colonização micorrízica de mudas de *P. taeda*, em condições de casa-de-vegetação.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DA LITERATURA**

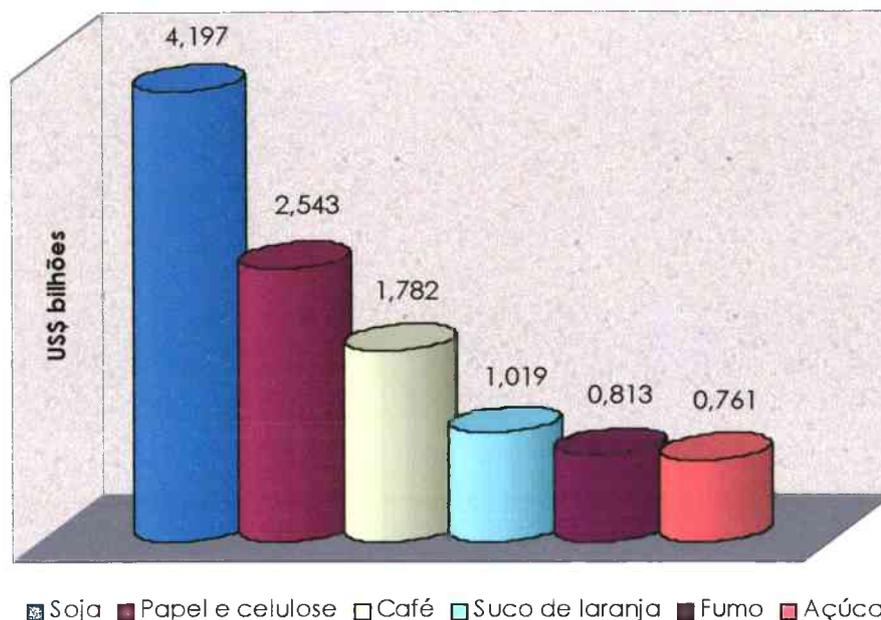
#### **1.1 - A PRODUÇÃO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NO BRASIL**

Os florestamentos com espécies exóticas foram estimulados a partir da década de 60, através de incentivos fiscais e pela criação do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), extinto em 1987 (HOEFLICH, SCHAITZA, MATOS, 2000). Essas políticas governamentais promoveram uma rápida ampliação da área plantada com pinus e eucaliptos, mas não evitaram o desmatamento de florestas nativas, nem a ocupação de áreas com potencial para a produção de alimentos. Atualmente, a expansão tem sido melhor orientada, voltada às áreas já desmatadas, com baixa fertilidade do solo e impróprias para a produção agrícola (MELFI, CERRI, POGGIANI, 2000).

Dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS) indicam que o setor florestal emprega 2 milhões de pessoas no Brasil. Como segmento econômico, é responsável por um faturamento anual de US\$ 21 bilhões. Contribui com cerca de US\$ 2 bilhões anuais em impostos, 10% das exportações e 4% do produto interno bruto do País (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2002). Em 2000, o setor de papel e celulose contribuiu com US\$ 2,5 bilhões às exportações brasileiras (Figura 1.1), o que representa um montante superior aos obtidos pelas exportações de café, açúcar, fumo ou suco de laranja, e inferior apenas à exportação de soja (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2002). Considerando outros produtos florestais, como madeira e carvão, as exportações totais desse setor ultrapassaram os US\$ 3,3 bilhões.

O desenvolvimento da silvicultura no Brasil nas últimas décadas e as condições naturais favoráveis possibilitaram ganhos de produtividade e o encurtamento dos ciclos de rotação das florestas cultivadas, conseguindo-se,

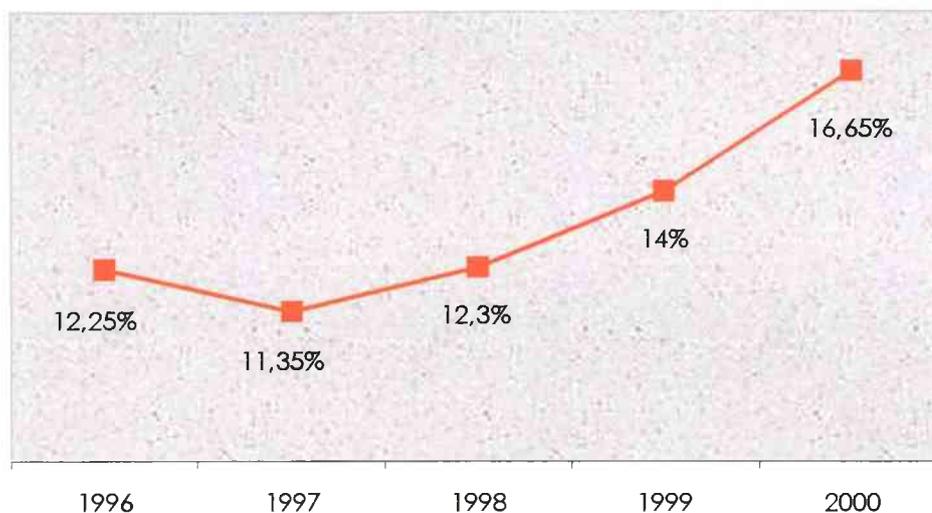
com isso, reduzir os custos de produção. O menor custo da madeira florestada no Brasil, em relação aos países do hemisfério norte, cria vantagens importantes nos custos de produção industrial, chegando a ser até 25% mais baixo, no caso da celulose (TORESAN, 2002). Com isso, desde 1996 a participação dos produtos de papel e celulose vem apresentando uma tendência de crescimento nas exportações agroflorestais brasileiras, chegando a mais de 16,5% do total, no ano 2000 (Figura 1.2).



**Figura 1.1 - Exportação de produtos agroflorestais brasileiros no ano 2000 (US\$ bilhões). Fonte: SECEX/MDIC. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2002).**

Além da importância sócio-econômica, os florestamentos com pinus e eucaliptos constituem uma real necessidade à produção de madeira serrada, móveis, chapas de compensado, aglomerado, lenha, carvão vegetal, papel, celulose, tecidos e resinas. No Brasil, a demanda de madeira é de 250 milhões de  $m^3$  ano<sup>-1</sup> (HOEFELICH, SCHAITZA, MATTOS, 2000). Grande parte ainda é suprida pelas florestas nativas, especialmente quando se considera a exploração de madeira-de-lei. Entretanto, com a constante pressão internacional pela

preservação das florestas nativas brasileiras, houve, na última década, uma mudança considerável de comportamento que tende a reverter definitivamente esse panorama.

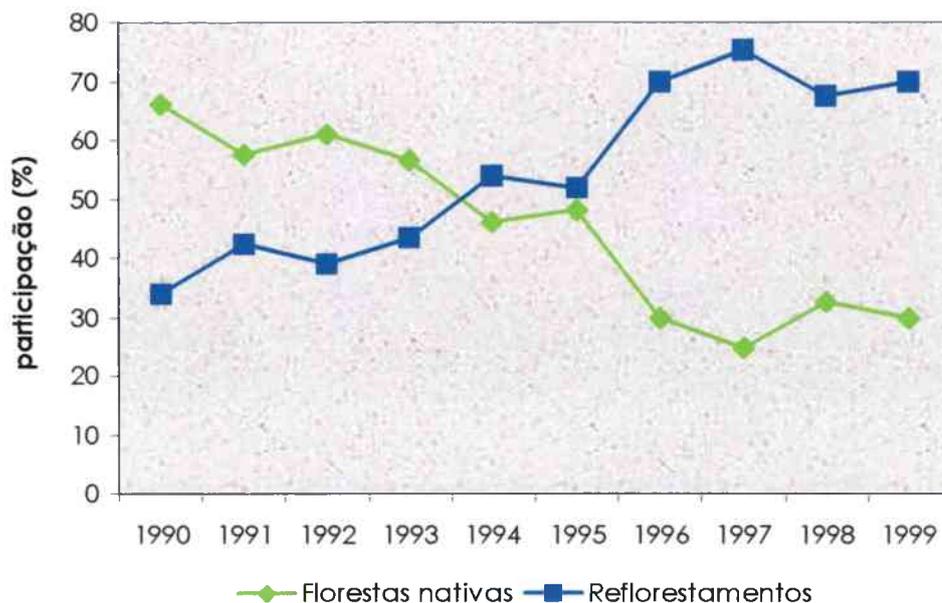


**Figura 1.2 - Participação dos produtos de papel e celulose nas exportações agroflorestrais brasileiras entre os anos de 1996 e 2000 (%). Fontes: SECEX/MDIC. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2002).**

Entre 1990 e 1999, por exemplo, houve uma inversão na participação das florestas nativas na produção de carvão vegetal, com a substituição das mesmas pelas florestas plantadas (Figura 1.3). O mesmo acontece com a produção de papel e celulose, onde toda a madeira utilizada atualmente no Brasil provém da silvicultura (TORESAN, 2002). Desde 1998, a produção de madeira cultivada para processamento mecânico é maior que o volume extraído das florestas nativas. Os Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo foram responsáveis, em 1999, por 90% desta produção (Figura 1.4), predominando a madeira de pínus.

O Estado de Santa Catarina possui aproximadamente 5% de seu território coberto com florestas plantadas, principalmente com pínus e eucaliptos. É o

maior produtor e exportador de móveis de madeira do País (Figura 1.5) e o terceiro maior na produção de papel e celulose. Dos 360 mil hectares reflorestados no Estado até 1999, 88% são ocupados por espécies de pinus (TORESAN, 2002). A excelência das condições de clima para o desenvolvimento florestal caracteriza Santa Catarina como uma das regiões de maior produtividade florestal do Brasil. Em 1995, o Estado obteve a mais alta produtividade do País na produção de pinus (TORESAN, 2002).

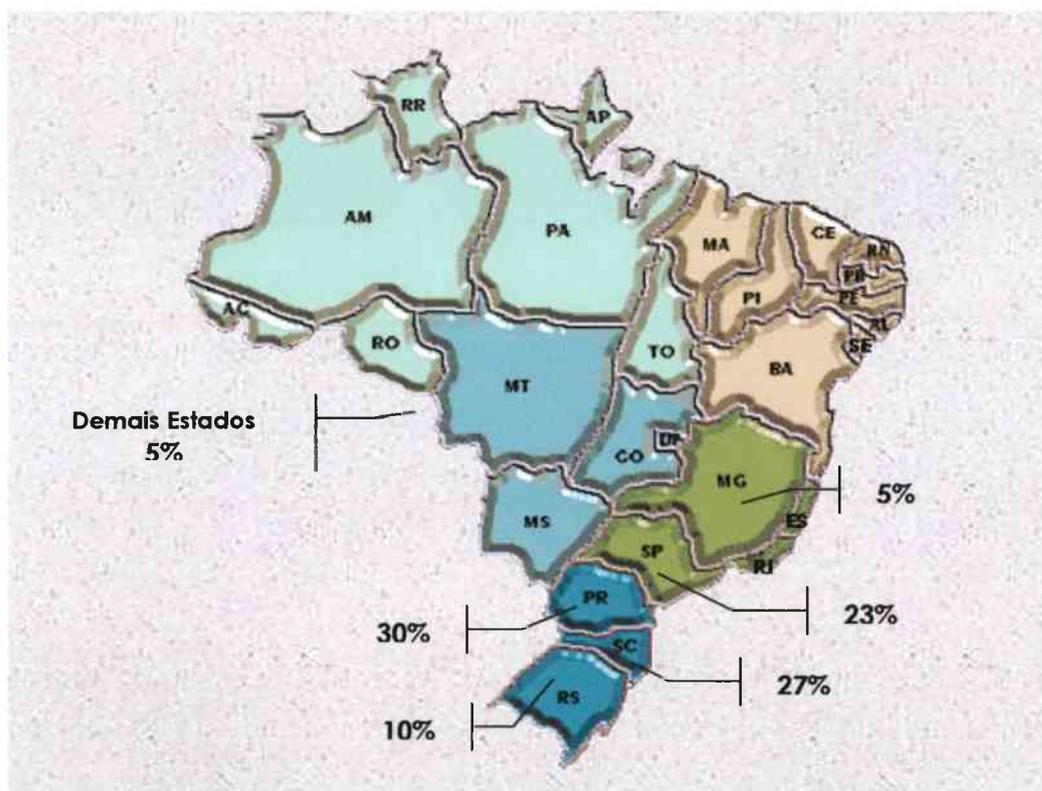


**Figura 1.3 - Consumo de carvão vegetal de origem de florestas nativas e florestamentos no Brasil entre os anos de 1990 e 1999 (%). Fonte: ABRACAVE (INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS/IPEF, 2002a).**

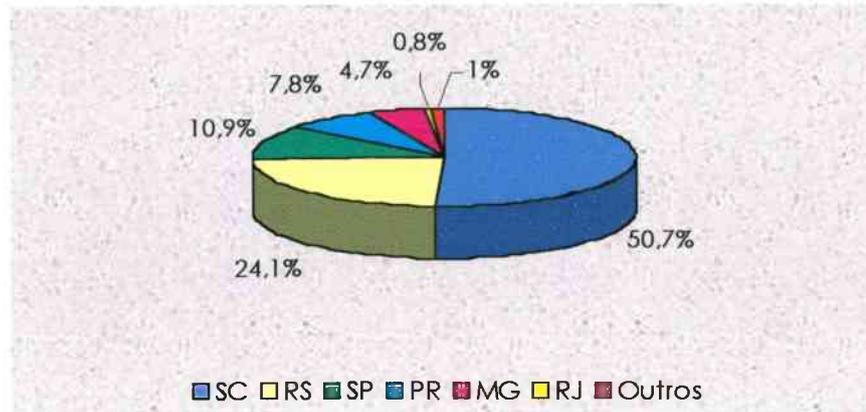
Nos últimos anos, houve um crescimento nas exportações florestais catarinenses, confirmando a tendência de sua importância na pauta das exportações do Estado. Em 1993, as exportações do setor representavam 14,6% do total exportado, e em 2000, este percentual chegou a 22,9% (TORESAN, 2002). Analisando as exportações catarinenses do primeiro bimestre de 2002 (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2002), observa-se a manutenção desta participação dos produtos florestais, que responderam por

21,7% do total de exportações nesse período, sendo superior às exportações de produtos dos setores metal-mecânico, têxtil e cerâmico (Figura 1.6).

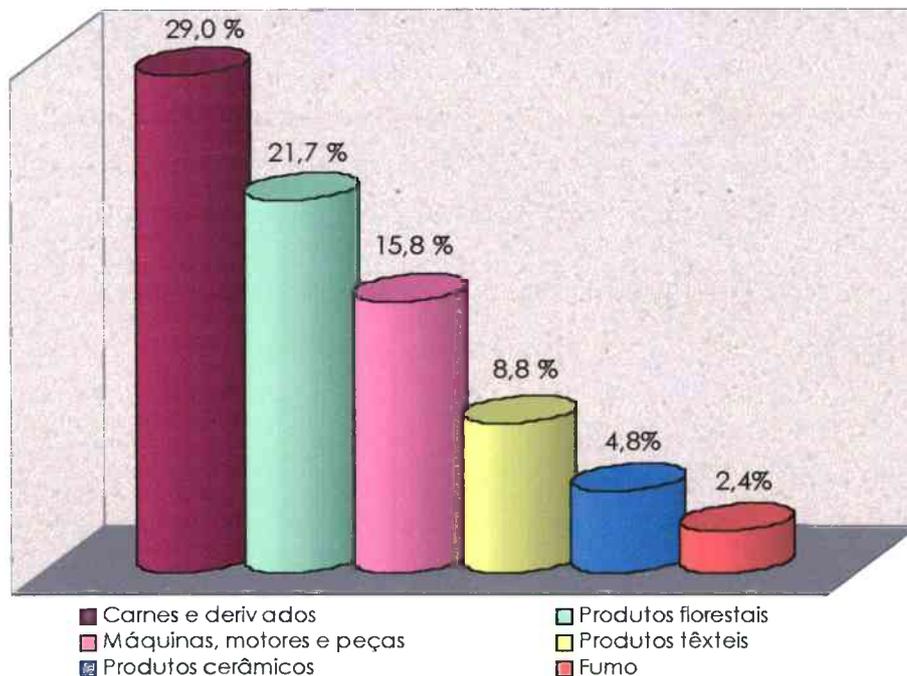
O estudo de processos biotecnológicos economicamente viáveis, que incrementem a produtividade e a lucratividade das plantas de pinus, no viveiro e no plantio definitivo, pode contribuir para a competitividade dos produtos florestais brasileiros no mercado internacional. Assim, pode-se evitar o avanço em áreas próprias para o cultivo de alimentos e a ampliação das áreas desmatadas no País, contribuindo para a preservação das espécies nativas.



**Figura 1.4 - Participação dos Estados brasileiros na produção de madeira cultivada para processamento mecânico, em 1999. Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA/IBGE (2001).**



**Figura 1.5 - Principais Estados brasileiros exportadores de móveis de madeira (%). Fonte: Dados de 1997, INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS/ IPEF (2002b).**



**Figura 1.6 - Participação dos principais produtos nas exportações catarinenses do primeiro bimestre de 2002 (%). Fonte: SECEX (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2002).**

## 1.2 - O CICLO DO FÓSFORO

O fósforo é um elemento essencial à vida, pois a maioria dos processos metabólicos de qualquer organismo depende da presença desse elemento. Está envolvido nas vias de transferência de energia - nas moléculas de ATP e NADPH<sup>+</sup>; replicação e transcrição do material genético - nas moléculas de DNA e RNA; e como constituinte das membranas celulares.

A disponibilidade de fósforo no solo está relacionada às transformações químicas e biológicas desse elemento (Figura 1.7). A decomposição da matéria orgânica por microrganismos é a principal fonte de manutenção do ciclo. Eles imobilizam uma parcela do fósforo mineralizado e liberam a maior parte para a solução do solo. A quantidade de fósforo disponível em solução é muito menor que as existentes nas outras frações, correspondendo, em média, a 0,01% do total (BRADY, 1989). Quando se aplicam fertilizantes solúveis, os íons fosfato são inicialmente liberados na solução do solo e ficam em equilíbrio com a fração lábil, que repõe o fósforo à medida que as plantas o utilizam. Da fração lábil, os íons fosfato são convertidos a fosfatos insolúveis, por adsorção na superfície de um sólido ou por precipitação. O fosfato passa progressivamente da fração lábil à não-lábil, tornando-se cada vez menos disponível às plantas (MALAVOLTA & PONCHIO, 1987). O retorno à fração lábil é pequeno e extremamente lento, mas pode ser otimizado e acelerado por mecanismos de solubilização pela microbiota do solo.

Além da baixa solubilidade, a concentração de fósforo no solo é afetada pelas perdas por erosão. Em todo o mundo, estima-se que cerca de 3,5 milhões de toneladas de fósforo atinjam os oceanos a cada ano, causando sérios desequilíbrios, devido aos processos de eutrofização (MALAVOLTA, 1992). Perdas de fósforo do solo por lixiviação ou percolação são consideradas desprezíveis, exceto sob altas concentrações de fertilizantes solúveis (RAIJ, 1991).

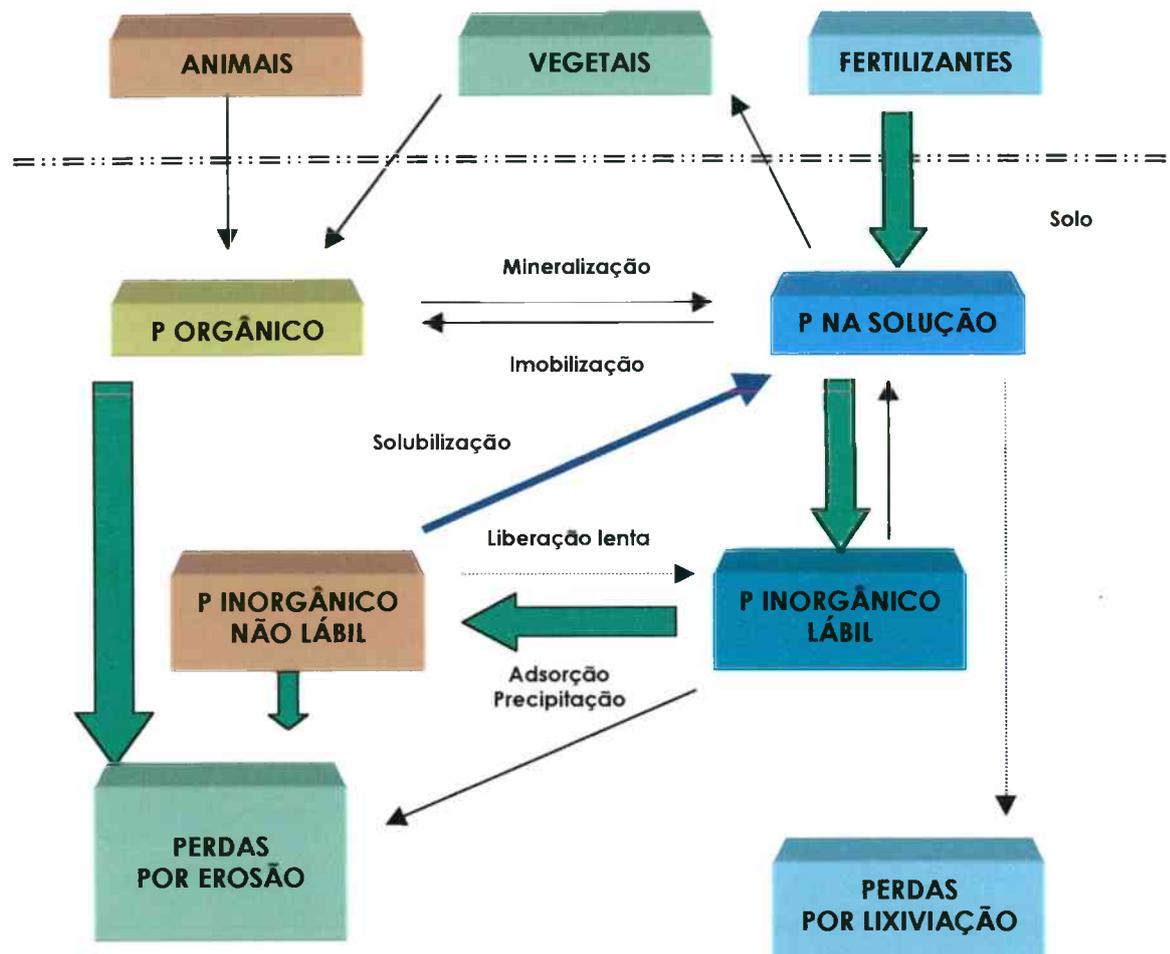


Figura 1.7 - Ciclo do fósforo no solo (adaptado de NAHAS, 1999).

### 1.3 - A PROBLEMÁTICA DO FÓSFORO NA NUTRIÇÃO VEGETAL

Nas plantas, o fósforo atua na fotossíntese, na respiração, na transferência e armazenamento de energia, na divisão celular, no crescimento das células, entre outros processos. É absorvido principalmente na forma iônica monovalente de ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), mas pode ser absorvido também na forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$ , em solos neutros e alcalinos. A maioria das plantas cultivadas em sistemas agrícolas e florestais contém entre 0,05 e 0,5% de fósforo em seus tecidos, encontrado em compostos orgânicos como fitinas, fosfolípidios, ácidos nucleicos, açúcares

fosforilados, coenzimas e outros compostos, além de ser encontrado na forma de ortofosfato inorgânico, principalmente nos vacúolos (ALEXANDER, 1980).

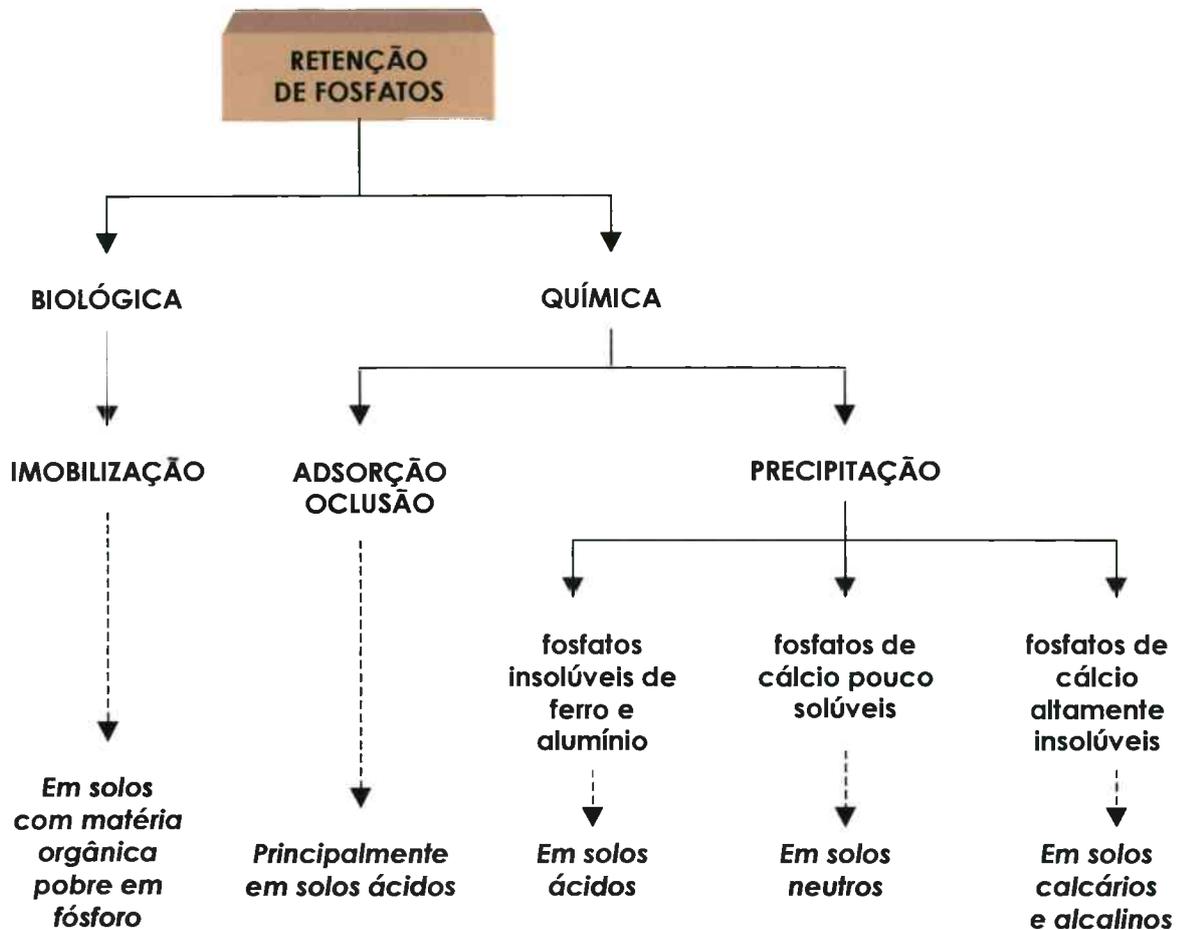
A maior parte do fósforo existente nos solos das regiões tropicais e subtropicais se encontra sob formas indisponíveis aos vegetais (RAIJ, ROSAND, LOBATO, 1982). Uma parcela se encontra na matéria orgânica e depende dos processos de mineralização para se tornar disponível. Porém, quando a matéria orgânica apresenta alto teor de carbono e baixa concentração de fósforo, este elemento é imobilizado pelos microrganismos do solo.

Na fração inorgânica, o fósforo da solução do solo torna-se rapidamente indisponível por diferentes formas de retenção. A retenção, também denominada "fixação", ocorre por adsorção e oclusão a partículas sólidas, ou por precipitação, quando se formam os fosfatos insolúveis (Figura 1.8). A adsorção e oclusão ocorrem principalmente em solos ácidos e se constituem, de modo geral, nas primeiras formas de retenção. A adsorção é um processo rápido, onde o fosfato fica adsorvido à superfície dos óxidos de ferro e alumínio e aos colóides do solo. A oclusão, um pouco mais lenta, é a penetração difusiva do fosfato no corpo das partículas coloidais, sendo considerada uma substituição isomórfica onde os fosfatos ocupam os locais deixados por partículas de sílica (MALAVOLTA, 1976).

A precipitação, ao contrário das outras formas de retenção, é o processo que origina os compostos mais estáveis, quando os ortofosfatos reagem, por afinidade, com os cátions do solo, formando fosfatos insolúveis. Nos solos ácidos, são formados fosfatos de ferro e alumínio. Nos neutros, são formados fosfatos de cálcio parcialmente solúveis, e nos solos calcários e alcalinos, formam-se os fosfatos insolúveis de cálcio (FASSBENDER, 1977).

Para as plantas, a baixa disponibilidade de fósforo solúvel no solo reduz o crescimento e, conseqüentemente, o rendimento de matéria seca por área (ALEXANDER, 1980). A aplicação de fertilizantes tem sido largamente utilizada, principalmente com fosfatados solúveis em água. Porém, em solos ácidos, a maior parte desses - até 90% - transforma-se em formas não disponíveis aos vegetais (FASSBENDER, 1977). Em vista disso, as quantidades de fosfatos solúveis aplicadas às culturas agrícolas são muito maiores do que a necessidade real

desse elemento pelas plantas. Além dos altos custos envolvidos nessa prática, devem ser considerados os problemas relacionados às perdas no meio ambiente e, também, o desperdício de um recurso natural não renovável.



**Figura 1.8 - Formas de retenção do fósforo no solo** (adaptado de WHITELAW, 2000).

Os fosfatos solúveis são produzidos industrialmente a partir de fosfatos minerais de baixa solubilidade, também chamados de fosfatos naturais ou fosfatos de rocha. No Brasil, apesar de serem utilizadas algumas reservas nacionais de apatitas para a produção de superfosfatos, o custo de produção é

elevado (ESPINOZA, OLIVEIRA, CONTINI, 1985), pois é necessária a importação dos ácidos sulfúrico e fosfórico, utilizados no processo de solubilização. A produção apresenta um baixo índice de aproveitamento (LOBO, 1987), com perda de 40% do fósforo na fase de concentração e eliminação de impurezas (GIULIETTI, WEYNE, GUARDIANI, 1987).

O uso de fosfatos naturais na agricultura brasileira ainda é bastante reduzido, representando apenas 6% do total de fertilizantes fosfatos utilizados (LOBO, 1986). O custo unitário é menor que o dos fosfatos solúveis, porém, a solubilidade é baixa, o que diminui sua eficiência (LOPES & GOEDERT, 1987; BRAGA et al., 1991). Por essa razão, os fosfatos naturais precisam ser adicionados em quantidades bem maiores do que os fosfatos solúveis, o que implica em maior volume a ser transportado e maior custo.

As reservas brasileiras de fosfatos naturais, de origem predominantemente ígnea, estão concentradas principalmente nos Estados de Minas Gerais e Goiás (ESPINOZA, OLIVEIRA, CONTINI, 1985), mas Santa Catarina possui uma jazida no município de Anitápolis. Se forem mantidas as formas atuais de utilização dos fosfatos naturais brasileiros, com as perdas envolvidas nos processos de produção de fertilizantes solúveis, há possibilidade de que essas jazidas sejam esgotadas a curto prazo (ALBUQUERQUE, 1986). Sendo o fósforo um macronutriente insubstituível e as jazidas não renováveis, devem-se empregar todos os esforços para propiciar uma utilização racional de suas fontes, visando o prolongamento da vida útil dessas reservas (RIEDER, 1986).

#### **1.4 - MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS**

Diversos microrganismos do solo apresentam a capacidade de solubilizar fosfatos e, em conseqüência, promover o crescimento das plantas. As principais espécies de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) citadas na literatura são apresentadas nas Tabelas 1.1 e 1.2.

Tabela 1.1 - Principais espécies de bactérias solubilizadoras de fosfatos.

<b>Espécie relatada</b>	<b>Fosfato solubilizado</b>	<b>Referência</b>
<i>Achromobacter</i> sp. ( <i>Alcaligenes</i> sp.)	apatita	SPERBER (1958a)
<i>Acinetobacter</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	DOMEY (1987) citado por LEINHOS & VACEK (1994)
<i>Agrobacterium</i> sp. <i>A. radiobacter</i>	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	GONZALEZ-EGUIARTE & BAREA (1975) BELIMOV, SEREBRENNIKOVA, STEPANOK (1999)
<i>Arthrobacter</i> sp.	apatita $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$	SPERBER (1958a) BANIK & DEY (1982)
<i>Azospirillum</i> sp.	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TORO, AZCON, HERRERA (1996) DEUBEL, GRANSEE, MERBACH (2000)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	VARMA & MATHUR (1989)
<i>Bacillus</i> sp.	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$	GONZALEZ-EGUIARTE & BAREA (1975) BANIK & DEY (1982)
<i>B. brevis</i> ( <i>Brevibacillus brevis</i> )	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	PAUL & SUNDARA-RAO (1971)
<i>B. cereus</i>	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	FREITAS, BANERJEE, GERMIDA (1997)
<i>B. circulans</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	VENKATESWARLU, RAO, RAINA (1984)
<i>B. firmus</i>	hidroxiapatita e fosfatos de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$	BAJPAI & SUNDARA-RAO (1971) ARORA & GAUR (1979) BANIK & DEY (1982)
<i>B. licheniformis</i> , <i>B. macerans</i> ( <i>Paenibacillus macerans</i> )	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfatos de rocha	DATTA, BANIK, GUPTA (1982)
<i>B. megaterium</i>	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{FePO}_4$ e $\text{AlPO}_4$	TAHA et al. (1969) BANIK & DEY (1982)
<i>B. polymyxa</i> ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ), <i>B. pulvificiens</i> ( <i>P. larvae</i> subsp. <i>pulvificiens</i> )	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , hidroxiapatita e fosfatos de rocha	ARORA & GAUR (1979)
<i>B. pumilus</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	PAUL & SUNDARA-RAO (1971)
<i>B. sphaericus</i>	fosfato de rocha	FREITAS, BANERJEE, GERMIDA (1997)
<i>B. subtilis</i>	fosfato de rocha $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TAHA et al. (1969) PAUL & SUNDARA-RAO (1971)
<i>B. thuringiensis</i>	fosfato de rocha	FREITAS, BANERJEE, GERMIDA (1997)
<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>B. japonicum</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	MIKANOVÁ & KUBÁT (1994b)
<i>Brevibacterium</i> sp.	apatita	SPERBER (1958a)
<i>Enterobacter</i> sp.	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$	CHABOT, ANTOUN, CESCAS (1993) TORO, AZCON, HERRERA (1996)
<i>E. agglomerans</i>	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hidroxiapatita	LAHEURTE & BERTHELIN (1988) KIM, McDONALD, JORDAN (1997)
<i>Erwinia</i> sp.	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , apatita, hidroxiapatita, fluorapatita, fosfatos de Fe, Mn e Mg	DUFF, WEBLEY, SCOTT (1963)
<i>E. herbicola</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	GOLDSTEIN, ROGERS, MEAD (1993)
<i>Escherichia</i> sp.	apatita $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , hidroxiapatita e fosfatos de rocha	SPERBER (1958b) ARORA & GAUR (1979)
<i>Flavobacterium</i> sp.	apatita $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	SPERBER (1958a) BELIMOV, SEREBRENNIKOVA, STEPANOK (1999)

continua...

<b>Espécie relatada</b>	<b>Fosfato solubilizado</b>	<b>Referência</b>
<i>Micrococcus</i> sp.	fosfato de rocha Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	TAHA et al. (1969) BANIK & DEY (1982)
<i>Micromonospora</i> sp.	apatita	SPERBER (1958a)
<i>Mycobacterium</i> sp.	apatita	SPERBER (1958a)
<i>Nocardia</i> sp.	apatita	SPERBER (1958b)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	DEUBEL, GRANSEE, MERBACH (2000)
<i>Proteus</i> sp.	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	MOLLA & CHOWDHURY (1984)
<i>Pseudomonas</i> sp.	fosfato de rocha Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> hidroxiapatita e CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	TAHA et al. (1969) MOLLA & CHOWDHURY (1984) ILLMER & SCHINNER (1992) TORO, AZCON, HERRERA (1996) NAHAS (1996)
<i>P. cepacia</i> ( <i>Burkholderia cepacia</i> ) <i>P. fluorescens</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fosfatos de rocha fosfato de zinco Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> apatita, FePO <sub>4</sub> , fosfatos de Mn e Mg	DI SIMINE, SAYER, GADD (1998) DEUBEL, GRANSEE, MERBACH (2000) DUFF, WEBLEY, SCOTT (1963)
<i>Rahnella aquatilis</i>	hidroxiapatita	KIM, JORDAN, KRISHNAN (1997)
<i>Rhizobium</i> sp. <i>R. leguminosarum</i> var. <i>phaseoli</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	MIKANOVA & KUBÁT (1994a) CHABOT, ANTOUN, CESCAS (1996)
<i>Sarcina</i> sp.	apatita fosfato de rocha	SPERBER (1958a) TAHA et al. (1969)
<i>Serratia</i> sp.	apatita Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SPERBER (1958a) MOLLA & CHOWDHURY (1984)
<i>Streptomyces</i> sp.	fosfato de rocha Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	TAHA et al. (1969) BANIK & DEY (1982)
<i>Thiobacillus</i> sp.	fosfato de rocha	RAJAN (1981)
<i>Xanthomonas maltophilia</i> ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	fosfato de rocha	FREITAS, BANERJEE, GERMIDA (1997)

**Tabela 1.2 - Principais espécies de fungos solubilizadores de fosfatos.**

<b>Espécie relatada</b>	<b>Fosfato solubilizado</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	MOLLA & CHOWDHURY (1984)
<i>A. aculeatus</i> , <i>A. amstelodemi</i> <i>A. awamori</i>	fosfato de rocha, AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , hidroxiapatita e fosfatos de rocha	CARVALHO, EIRA, PELLEGRINO (1969) GUPTA et al. (1994) BARTHAKUR (1978)
<i>A. candidus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	AGNIHOTRI (1970) BANIK & DEY (1982)
<i>A. carbonarum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fosfato de rocha	GAUR, MEERA MADAN, OSTWAL (1973)
<i>A. clavatus</i> , <i>A. fischeri</i> <i>A. flavus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> fluorapatita, hidroxiapatita	GUPTA et al. (1994) CHHONKAR & SUBBA-RAO (1967) AGNIHOTRI (1970)

continua...

<b>Espécie relatada</b>	<b>Fosfato solubilizado</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	fosfato de rocha	GAUR, MEERA MADAN, OSTWAL (1973)
<i>A. foetidus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fosfatos de rocha	SALIH et al. (1989)
<i>A. fumigatus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fosfato de rocha	GAUR, MEERA MADAN, OSTWAL (1973)
<i>A. japonicus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	BANIK & DEY (1982)
<i>A. nidulans</i>	fosfato de rocha	SINGAL, GUPTA, SAXENA (1994)
<i>A. niger</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> apatita	CHHONKAR & SUBBA-RAO (1967) SPERBER (1958a)
<i>A. ochraceus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita, hidroxiapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>A. tamaritii</i>	fosfatos de rocha	ARORA & GAUR (1979)
<i>A. terreus</i>	Co <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , MnPO <sub>4</sub> , Zn <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SAYER, RAGGETT, GADD (1995)
<i>A. terricola</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>A. ustus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	GUPTA et al. (1994)
<i>A. wentii</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	CHHONKAR & SUBBA-RAO (1967)
		GUPTA et al. (1994)
		AGNIHOTRI (1970)
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fosfato de rocha	GAUR, MEERA MADAN, OSTWAL (1973)
<i>Beltraniella humicola</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Chondrogaster angustisporus</i>	fosfato de cálcio	PASSOS, SILVA FILHO, OLIVEIRA (2000)
<i>Curvularia</i> sp.	fosfato de rocha	BARDIYA & GAUR (1974)
<i>C. lunata</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Cylindrocladium</i> sp.	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita, hidroxiapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>Eupenicillium shearii</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita, hidroxiapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>F. solani</i>	AlPO <sub>4</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fluorapatita AlPO <sub>4</sub>	BARTHAKUR (1978) AGNIHOTRI (1970) BARTHAKUR (1978)
<i>Gliocladium</i> sp.	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fluorapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>Gliomastix murorum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	FePO <sub>4</sub> e Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	LEYVAL & BERTHELIN (1986)
<i>Humicola fuscoatra</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Laccaria bicolor</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, hidroxiapatita e fitato cálcico	NGUYEN et al. (1992)
<i>L. laccata</i>	FePO <sub>4</sub> e Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	LEYVAL & BERTHELIN (1986)
<i>Masoniella grisea</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SINGH, MISHRA, KAPOOR (1982)
<i>Mortierella longicollis</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	AGNIHOTRI (1970)
<i>M. nana</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e hidroxiapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>Mucor flavus</i>	AlPO <sub>4</sub>	BARTHAKUR (1978)
<i>Myrothecium roridum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Paecilomyces</i> sp.	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SILVA FILHO & VIDOR (2000)
<i>P. fusisporus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SINGH, MISHRA, KAPOOR (1982)
<i>Papulaspora mytiline</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SINGH, MISHRA, KAPOOR (1982)

continua...

<b>Espécie relatada</b>	<b>Fosfato solubilizado</b>	<b>Referência</b>
<i>Paxillus involutus</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> FePO <sub>4</sub>	LEYVAL & BERTHELIN (1986) LEYVAL & BERTHELIN (1988)
<i>Penicillium</i> sp.	apatita CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, AlPO <sub>4</sub> , FePO <sub>4</sub> e fosfato de rocha	SPERBER (1958a) CARVALHO, EIRA, PELLEGRINO (1969)
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita, hidroxiapatita hidroxiapatita, AlPO <sub>4</sub> e fosfato de rocha	AGNIHOTRI (1970) ILLMER, BARBATO, SCHINNER (1995)
<i>P. bilaii</i>	fosfato de rocha CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	ASEA, KUCEY, STEWART (1988) DOWNEY & KESSEL (1990)
<i>P. digitatum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , hidroxiapatita, fosfatos de rocha	ARORA & GAUR (1979)
<i>P. fuscum</i>	fosfato de rocha	ASEA, KUCEY, STEWART (1988)
<i>P. implicatum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>P. janthinellum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	AGNIHOTRI (1970)
<i>P. lilacinum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	CHHONKAR & SUBBA-RAO (1967)
<i>P. mineoluteum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>P. nigricans</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	GUPTA et al. (1994)
<i>P. pinophilum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	VENKATESWARLU, RAO, RAINA (1984)
<i>P. purpurogenum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>P. radicum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	WHITELAW, HARDEN, HELYAR (1999)
<i>P. rugulosum</i>	hidroxiapatita, AlPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub>	REYES et al. (1999)
<i>P. simplicissimum</i>	AlPO <sub>4</sub> Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , Co <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , MnPO <sub>4</sub> e Zn <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	BARTHAKUR (1978) SAYER, RAGGETT, GADD (1995)
<i>P. solitum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>P. variable</i>	fosfato de rocha	VASSILEV, FENICE, FEDERICI (1996)
<i>P. veridicatum</i>	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O e fosfatos de rocha	NAHAS (1996)
<i>Phoma exigua</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Pisolithus microcarpus</i>	fosfato de cálcio	PASSOS, SILVA FILHO, OLIVEIRA (2000)
<i>P. tinctorius</i>	fosfatos de rocha	GOMES, OLIVEIRA, SILVA FILHO (1992)
<i>Rhizopus</i> sp.	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	CHABOT, ANTOUN, CESCAS (1996)
<i>Robillarda sessilis</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Scleroderma aurantium</i>	FePO <sub>4</sub> e Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	LEYVAL & BERTHELIN (1986)
<i>S. citrinum</i>	fosfato de cálcio	PASSOS, SILVA FILHO, OLIVEIRA (2000)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , fluorapatita, hidroxiapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Spegazzinia tessartha</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Suillus luteus</i>	FePO <sub>4</sub> e apatita	RITTER & LYR (1965)
<i>S. variegatus</i>	apatita	WALLANDER (2000)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	SURANGE (1985)
<i>Trichoderma</i> sp.	fosfato de rocha	BARDIYA & GAUR (1974)
<i>T. hamatum</i>	AlPO <sub>4</sub>	BARTHAKUR (1978)
<i>T. viride</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fluorapatita	AGNIHOTRI (1970)
<i>Verticillium alboatrum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e fluorapatita	AGNIHOTRI (1970)

#### **1.4.1 - Isolamento e seleção**

Os MSF são isolados a partir de amostras do solo e cultivados em meio de cultura sólido contendo um fosfato insolúvel. O fosfato insolúvel turva o meio e, quando há solubilização, observa-se a formação de um halo transparente ao redor da colônia.

A maioria dos estudos utiliza fosfatos de cálcio para um primeiro isolamento, mas alguns problemas podem ocorrer em decorrência dessa metodologia. NAUTIYAL (1999) observou que muitos isolados, sem a formação de halos transparentes em meio sólido, foram capazes de solubilizar fosfatos em meio líquido. Tem sido observado que muitos isolados, principalmente bactérias, perdem a capacidade de solubilização em cultivos subseqüentes (SPERBER, 1958b; KUCEY, 1983; ILLMER & SCHINNER, 1992). Se o objetivo for a solubilização dos fosfatos naturais existentes em solos ácidos, seria mais adequado isolar os MSF em meio contendo fosfatos insolúveis de Fe e Al. O isolamento com fosfatos de Ca é adequado quando se objetiva solubilizar fosfatos naturais existentes em solos alcalinos ou os fosfatos de cálcio de baixa solubilidade formados após a adição de fertilizantes solúveis.

#### **1.4.2 - População no solo e na rizosfera**

As populações de microrganismos solubilizadores de fosfatos de vida livre estão entre  $10^4$  a  $10^7$  propágulos  $g^{-1}$  de solo, variando conforme as condições de fertilidade, pH, temperatura e manejo do solo, e o método utilizado para avaliação (SILVA FILHO & VIDOR, 1984; DOYLE, SCHARF, SILVA FILHO, 1990; EIRA, 1992; SILVA FILHO et al., 1993). Podem representar 0,1 a 50% da microbiota do solo (KUCEY, 1983; CHABOT, ANTOUN, CESCAS, 1993), sendo particularmente abundantes na rizosfera, devido à presença dos exsudatos das plantas (SPERBER, 1958a; LOUW & WEBLEY, 1959), e em solo com cobertura vegetal permanente (NUERNBERG, VIDOR, STAMMEL, 1984; SILVA FILHO & VIDOR, 1984). As espécies vegetais também parecem afetar as populações de MSF no solo, sendo estas maiores em leguminosas que em gramíneas (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982).

Em viveiros de pínus e eucaliptos, SILVA FILHO et al. (1993) observaram populações entre  $10^4$  a  $10^6$  propágulos  $g^{-1}$  de solo ou substrato, aumentando para até  $10^7$  com o crescimento das plantas, entre os 45 e 120 dias após a semeadura. Em florestas adultas, a população variou entre  $10^4$  a  $10^6$  por grama de solo, e apresentou uma baixa variação sazonal. Nesse estudo, foram obtidos mais de 500 isolados, sendo que as bactérias representaram a maior parte, com 85% do total, contra 15% de fungos. No entanto, apenas 41% das bactérias mantiveram a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultura.

### **1.4.3 - Promoção do crescimento vegetal**

A promoção do crescimento vegetal proporcionada pelos MSF pode se dar a partir de atividades diversas, diretas e/ou indiretas, especialmente na rizosfera (Figura 1.9). A atuação mais conhecida e estudada é a **solubilização de fosfatos** inorgânicos existentes ou adicionados no solo (SPERBER, 1958b), como hidroxiapatitas, fluorapatitas, fosfatos dicálcico e tricálcico, e fosfatos de ferro e alumínio. Ao solubilizar o fósforo e liberá-lo para a solução do solo, os MSF contribuem para melhorar a nutrição vegetal e, conseqüentemente, aumentar a produtividade.

Alguns MSF solubilizam uma única fonte de fósforo, enquanto que outros solubilizam duas ou mais, apresentando diferentes potenciais de solubilização para cada fonte (LOUW & WEBLEY, 1959; CHONNKAR & SUBBARAO, 1967; CARVALHO, EIRA, PELLEGRINO, 1969; AGNIHOTRI, 1970; PAUL & SUNDARA-RAO, 1971; ARORA & GAUR, 1979; BANIK & DEY, 1982; RAO, VENKATESWARLU, KAUL, 1982; SALIH et al., 1989; NAHAS & ASSIS, 1992a; ILLMER & SCHINNER, 1992; MIKANOVÁ & KUBAT, 1994a). Comparando diferentes grupos de microrganismos solubilizadores de fosfatos, ARORA & GAUR (1979) e KUCEY (1987) concluíram que os fungos são mais ativos do que as bactérias. A eficiente ação solubilizadora de fosfatos por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* tem sido relatada por inúmeros autores (CARVALHO, EIRA, PELLEGRINO, 1969; KUCEY, 1987; ASEA, KUCEY, STEWART, 1988).

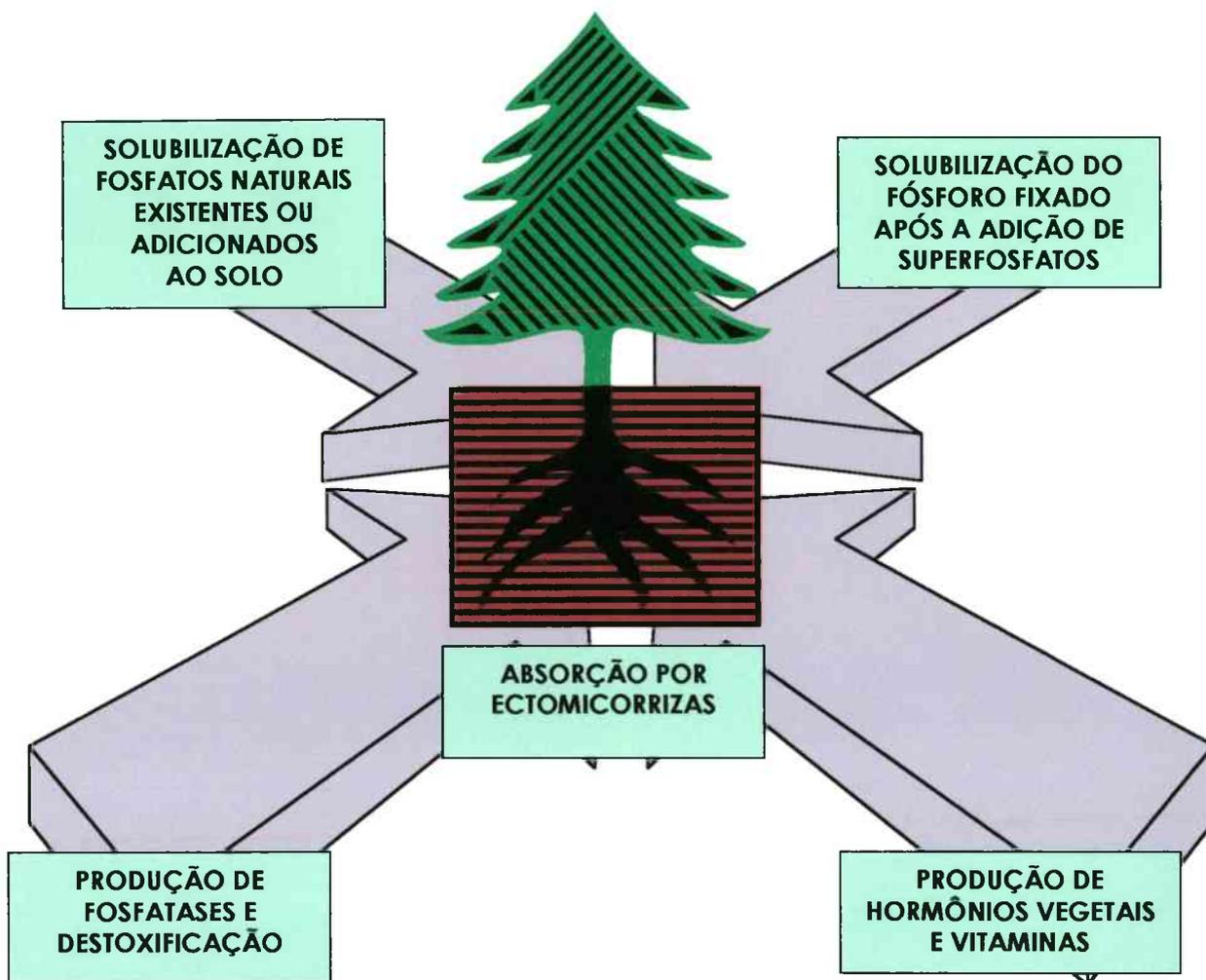


Figura 1.9 - Formas de atuação dos microrganismos solubilizadores de fosfatos na promoção do crescimento vegetal.

Além da solubilização dos fosfatos de rocha, alguns MSF podem **solubilizar o fósforo retido após a utilização de superfosfatos** (CHABOT, ANTOUN, CESCAS, 1996), otimizando a eficiência da aplicação dos mesmos (KUNDU & GAUR, 1984). NARLOCH et al. (2002), estudando as respostas do rabanete à adição do superfosfato triplo e inoculação com MSF, obtiveram produção de matéria seca

das plantas inoculadas sob baixa concentração de superfosfato semelhante à obtida por tratamentos com dosagens maiores, sem inoculação.

Muitos MSF apresentam grande capacidade de **produção de fosfatases**, enzimas responsáveis pela mineralização do fósforo orgânico (CASIDA, 1959; DUFF, SARATH, PLAXTON, 1994; NAHAS, CENTURION, ASSIS, 1994). Entre as principais fosfatases, incluem-se fitases, nucleases e fosfolipases. As fitases agem no hexafosfato de inositol, removendo os grupamentos fosfato um a um até a liberação do inositol. As nucleases degradam os ácidos nucleicos no solo, despolimerizando as moléculas de DNA e RNA de organismos em decomposição. As fosfolipases agem nos fosfolipídios das membranas celulares, liberando o fosfato por hidrólise (ALEXANDER, 1980). As raízes das plantas também podem produzir fosfatases que, juntamente com as fosfatases microbianas, atuam na mineralização da matéria orgânica e podem contribuir para a nutrição vegetal.

Alguns MSF podem ainda produzir **hormônios vegetais**, como citocininas, giberelinas, ácido indol-3-acético, entre outros (GONZALES-EGUIARTE & BAREA, 1975; STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ, 1984; LEINHOS, 1994; LEINHOS & VACEK, 1994), e **vitaminas**, como riboflavina, niacina e vitamina B<sub>12</sub> (BAYA, BOEHTLING, RAMOS-CORMENZANA, 1981; STRZELCZYK & ROZYCKI, 1985), contribuindo para a promoção do crescimento das plantas.

Recentemente, verificou-se que alguns MSF apresentam capacidade de **destoxificação** do solo e podem ser utilizados em programas de **biorremediação** de resíduos com contaminação de metais e de outras substâncias (DIXON-HARDY et al., 1998). Isso é possível porque esses microrganismos apresentam capacidade de solubilização de fontes metálicas de fósforo como, por exemplo, os fosfatos de cobalto ou de zinco.

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) também têm sido estudados como MSF. Além de favorecer a **absorção do fósforo** e de outros nutrientes, pelo aumento da área e do volume de solo explorado a partir de suas hifas, eles têm a capacidade de solubilizar diferentes fosfatos inorgânicos (LEYVAL & BERTHELIN, 1986; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991; TAM & GRIFFITHS, 1993).

#### **1.4.4 - Efeitos da inoculação sobre o crescimento vegetal**

Estudos têm demonstrado que a inoculação do solo ou da rizosfera com microrganismos solubilizadores de fosfatos pode promover o crescimento dos vegetais (TAHA et al., 1969; RALSTON & McBRIDE, 1976; KUNDU & GAUR, 1984; KUCEY, 1987; LEYVAL & BERTHELIN, 1989; SILVA FILHO et al., 1991, 1992; CHABOT, ANTOUN, CESCAS, 1993, 1996; MIKANOVÁ & KUBÁT, 1994a). A inoculação com MSF tem sido realizada em solos sem adubação, adubados com fosfatos de rocha, ou com fosfatos solúveis, demonstrando que esses últimos podem ser substituídos, total ou parcialmente, pela inoculação (KUNDU & GAUR, 1984; NARLOCH et al., 2002). A maioria dos autores obtém como resultado da inoculação maior produção de matéria seca e um incremento na absorção de fósforo verificado através da quantidade total no tecido das plantas testadas. Numa revisão dos resultados dos últimos cinqüenta anos, WHITELAW (2000) cita incrementos que variam de 2 a 93% na produção de matéria seca, e de 3 a 383% na absorção de fósforo de plantas inoculadas com fungos solubilizadores de fosfatos. VIDHYASEKARAN et al. (1973), por exemplo, obtiveram incrementos na ordem de 80% sobre o peso da matéria seca e 98% sobre a quantidade de fósforo absorvido por grãos de amendoim inoculado com *Penicillium digitatum* e *Aspergillus awamori*. Entretanto, outros autores, como KUCEY (1987), FREITAS, BANERJEE, GERMIDA (1997) e NARLOCH et al. (2002), obtiveram maior produtividade sem apresentar maior absorção de fósforo pelas plantas, sugerindo o envolvimento de outros fatores na promoção do crescimento vegetal.

Diversos autores têm demonstrado efeitos positivos através da inoculação mista com fungos micorrízicos arbusculares (KUCEY, 1987; PAULINO & AZCON, 1987; YOUNG, 1990; KIM, JORDAN, McDONALD, 1998; OMAR, 1998; SINGH & KAPOOR, 1998 e 1999) e bactérias fixadoras de nitrogênio (KUNDU & GAUR, 1984; MIKANOVÁ & KUBÁT, 1994a; DUBEY, 1996). Na maioria dos casos, os efeitos positivos da inoculação mista têm sido superiores aos obtidos pela inoculação isolada.

#### **1.4.5 - Potencial de uso biotecnológico**

Além da utilização direta em inoculantes para plantas cultivadas, os MSF têm sido relatados pelo seu alto potencial biotecnológico para a utilização industrial. Alguns têm sido testados na produção microbiana de fosfatos solúveis, solubilizando fosfatos de rocha em sistemas de fermentação. São testes que utilizam princípios da fermentação sólida em subprodutos agro-industriais, ou fermentação líquida em cultivo contínuo. Utilizando vinhaça como fonte de carbono, NAHAS, BANZATTO, ASSIS (1990) obtiveram uma solubilização de até 79% do fósforo total da fluorapatita por *Aspergillus niger*. Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizaram-se resíduos de beterraba-açucareira e da produção do óleo de oliva (VASSILEV et al., 1995, 1997a). Nos estudos de fermentação em cultivo contínuo, BOJINOVA et al. (1997) obtiveram um máximo de 90% de solubilização da fosforita tunisiana utilizando *A. niger* sob incubação em um período de 10 dias.

Técnicas de imobilização de células de MSF, especialmente em espuma de poliuretano, têm sido testadas na solubilização microbiana de fosfatos, tanto em biorreatores de cultivo contínuo (VASSILEV & VASSILEVA, 1992; VASSILEV, FENICE, FEDERICI, 1996; VASSILEV et al., 1997a, 1997b; VASSILEV, VASSILEVA, AZCÓN, 1997; VASSILEVA et al., 1998) quanto em solo, como inoculantes de plantas cultivadas (VASSILEV et al., 1997b; VASSILEVA et al., 1999).

### **1.5 - MECANISMOS DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS**

A ampla diversidade de microrganismos relatados, envolvendo procariotos e eucariotos, autótrofos e heterótrofos, aeróbios e anaeróbios, de vida livre ou associados diretamente às raízes das plantas, exige cautela na discussão dos mecanismos de solubilização de fosfatos inorgânicos. Não se pode esperar que exista um único mecanismo para explicar uma característica existente em microrganismos tão distintos.

Os mecanismos de solubilização de fosfatos estão relacionados a compostos intermediários constitutivos do metabolismo primário que, liberados no solo, promovem as diversas reações de solubilização do fósforo insolúvel. Apesar de a baixa disponibilidade de fósforo ser um fator de estímulo à liberação desses metabólitos primários no solo, ela não é o único fator envolvido, pois os produtos da respiração aeróbica e anaeróbica também podem promover a solubilização.

### **1.5.1 - Produção de ácidos por microrganismos quimiorganotróficos**

A capacidade solubilizadora dos MSF quimiorganotróficos tem sido associada à produção de ácidos orgânicos, como cítrico, oxálico, málico, fumárico, succínico, láctico, glicólico, glicônico, entre outros intermediários do metabolismo dos carboidratos (SPERBER, 1958a; CUNNINGHAM & KUIACK, 1992; KIM, McDONALD, JORDAN, 1997). Além de agirem como acidificantes, também podem funcionar como agentes quelantes e complexantes, formando compostos com cálcio, ferro e alumínio (SPERBER, 1958b; DINKELAKER, ROMHELD, MARSCHNER, 1989; WHITELAW, 2000). BOLAN et al. (1994) verificaram que a adição de ácidos orgânicos ao solo, especialmente os tricarbóxílicos, pode aumentar a solubilização de fosfatos. Analisando a rizosfera de plantas jovens de *Pinus sylvestris* e *Fagus silvatica*, inoculadas com fungos ectomicorrízicos e bactérias solubilizadoras de fosfatos, LEYVAL & BERTHELIN (1993) verificaram que, após a inoculação, a deposição de açúcares e aminoácidos sobre as raízes diminuiu, enquanto que a de ácidos orgânicos aumentou.

A acumulação de ácidos orgânicos é, geralmente, decorrente de bloqueios no ciclo de Krebs (MÜLLER & FROSCHE, 1975; EIRA, 1992; GADD, 1999). Sob condições de deficiência de fósforo, os ácidos orgânicos são liberados no meio externo e, com o decréscimo do pH, há um aumento na solubilização de fosfatos.

A produção de ácidos orgânicos varia com as condições do meio, estado fisiológico e tipo de microrganismo. Baixas concentrações de  $Fe^{++}$  favorecem a liberação de ácidos orgânicos, especialmente cítrico, oxálico (formado a partir do ácido oxaloacético) e málico. Isto acontece porque o  $Fe^{++}$

é o cofator da enzima aconitase, responsável pela conversão do citrato ao cis-aconitato no ciclo de Krebs (EIRA, 1992; MARSCHNER, 1995). Além disso, os prótons  $H^+$  livres agem como inibidores enzimáticos da mesma enzima (EIRA, 1992). Nos solos ácidos, como já foi visto, há grande acúmulo de fosfatos de ferro, e a liberação de ácidos orgânicos pode ser estimulada pela indisponibilidade desses dois nutrientes, e pela maior concentração de prótons  $H^+$ .

De maneira inversa, o aumento do fósforo solúvel na solução do solo inibe a solubilização de fosfatos. Demonstrou-se que determinados fungos têm a atividade solubilizadora diminuída ou inibida na presença de fósforo solúvel (CHONNKAR & SUBBA-RAO, 1967; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991). NAHAS & ASSIS (1992a) sugeriram a existência de mecanismos de indução ou repressão da solubilização, regulados geneticamente em função da concentração de fosfato solúvel. A relação existente entre o processo de solubilização e as vias metabólicas de oxidação de carboidratos pode ser explicada por uma das formas de regulação das mesmas, onde as concentrações de ATP, cAMP (AMP cíclico) e  $P_i$  (fósforo inorgânico), inibem ou estimulam a ativação dessas vias.

É natural que a baixa disponibilidade de fósforo inorgânico estimule a solubilização, bloqueando o ciclo de Krebs nos microrganismos. Caso contrário, grande parte da força redutora ( $NADH + H^+$ ) produzida nessa via seria em vão, já que a produção de ATP na fosforilação oxidativa, por ser dependente da presença de  $P_i$ , também estaria inibida ou reduzida.

Algumas bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas*, que utilizam a via de Entner-Doudoroff como principal rota metabólica de oxidação dos carboidratos, solubilizam fosfatos principalmente através da produção de ácido glicônico (ILLMER & SCHINNER, 1992), que é o primeiro intermediário dessa via. De forma independente, há uma oxidação extracelular da glicose formando os ácidos glicônico e 2-cetoglicônico (Figura 1.10), por ação das enzimas quinoproteína glicose desidrogenase e gliconato desidrogenase (GOTTSCHALK, 1985; GOLDSTEIN, 1994). Segundo GOLDSTEIN (1995), a significância dessa via de oxidação direta era considerada obscura, como um "desvio dissimilatório" devido à ineficiência na utilização de força redutora. Uma das finalidades vinha sendo defendida como a produção de intermediários para a via de Entner-

Doudoroff (GOTTSCHALK, 1985), não dependendo de quaisquer processos relacionados à solubilização de fosfatos, conforme pode-se verificar na Figura 1.10.

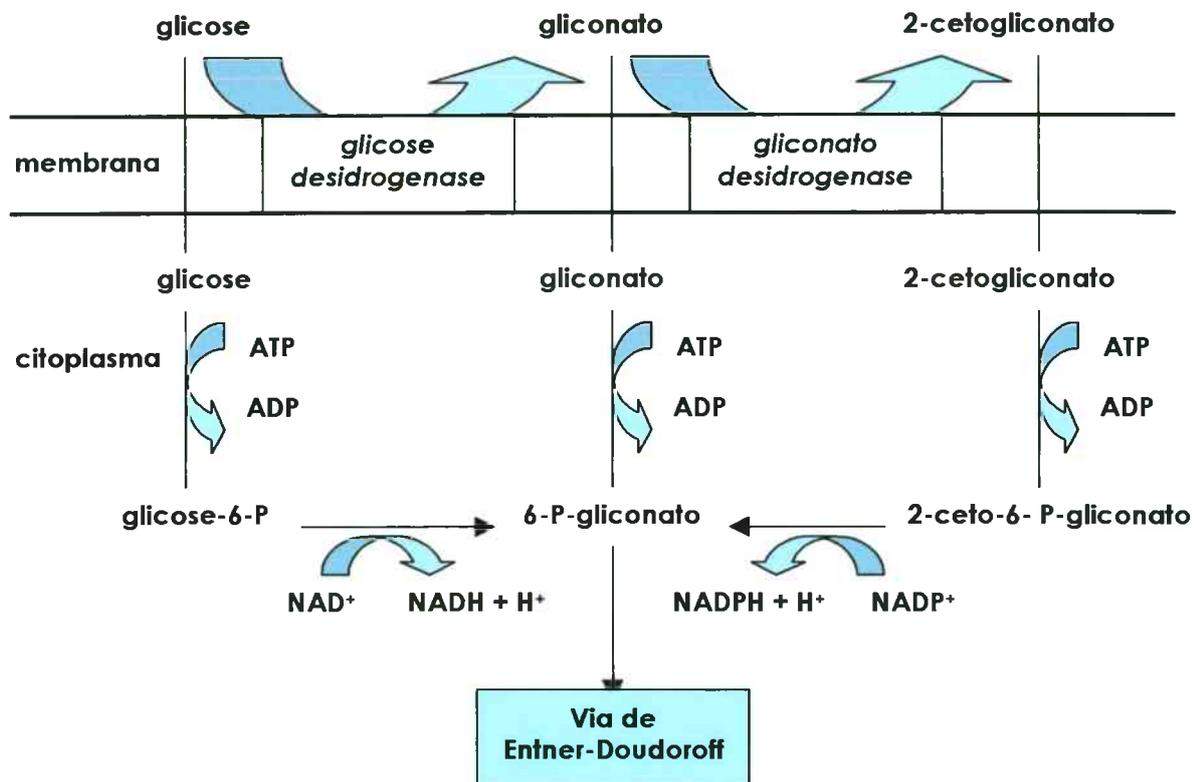


Figura 1.10 - Oxidação extracelular da glicose a ácido glicônico e ácido 2-cetoglicônico por bactérias do gênero *Pseudomonas* (GOTTSCHALK, 1985).

Porém, GOLDSTEIN, BRAVERMAN, OSORIO (1999), observando a produção de ácido glicônico *in vitro* por bactérias gram-negativas, verificaram que esses ácidos extracelulares só são produzidos na presença de uma solução de lavagem de raízes, sugerindo que a solubilização, estimulada por sinais moleculares emitidos pela planta, seria a principal função dessa via extracelular.

Alguns fungos do gênero *Penicillium* também têm sido relatados como produtores de ácido glicônico (ILLMER & SCHINNER, 1992; VASSILEV, FENICE, FEDERICI, 1996; REYES et al., 1999), mas as vias envolvidas na produção do mesmo não estão esclarecidas.

O efeito da acidez sobre a solubilização de fosfatos tem sido estudado através da concentração de íons  $H^+$  (pH) e da concentração de ácidos na solução (acidez titulável). Inúmeros estudos demonstram uma correlação linear entre o decréscimo do pH e o fósforo solubilizado (ARORA & GAUR, 1979; ASEA, KUCEY, STEWART, 1988; MIKANOVA & KUBÁT, 1994a; NAHAS, CENTURION, ASSIS, 1994). Em outros, porém, a correlação entre a solubilização e a concentração de ácidos e pH não existe (SPERBER, 1958a; AGNIHOTRI, 1970; LEYVAL & BERTHELIN, 1989; SALIH et al., 1989; GOMES, OLIVEIRA, SILVA FILHO, 1992), demonstrando que a produção de ácidos orgânicos não é o único mecanismo envolvido nos processos de solubilização de fosfatos (ILLMER & SCHINNER, 1992; NAUTIYAL et al., 2000). Em alguns casos, a natureza do ácido orgânico demonstrou ser mais importante para a solubilização de fosfatos que a quantidade produzida pelo MSF (AGNIHOTRI, 1970).

### **1.5.2 - Outros mecanismos**

ILLMER & SCHINNER (1992), ao encontrar, em testes de solubilização de fosfatos *in vitro*, apenas três ácidos orgânicos produzidos por bactérias solubilizadoras de fosfatos, de um total de 24 testados, concluíram que a produção de ácidos orgânicos não é o principal mecanismo envolvido. Eles citam a possibilidade de acidificação do meio através da **liberação de prótons  $H^+$**  do citoplasma para a superfície externa da membrana plasmática, em mecanismos de troca de cátions (principalmente  $NH_4^+$ ). Outra possibilidade seria a liberação de prótons  $H^+$  a partir da cadeia respiratória que, na ausência de fósforo inorgânico, não seriam aproveitados para a ativação da ATPase na fosforilação oxidativa.

A **formação de  $H_2CO_3$**  no solo, a partir do  $CO_2$  liberado pelos microrganismos nos processos respiratórios - especialmente durante a

mineralização da matéria orgânica - também pode favorecer a solubilização de fosfatos (MARSCHNER, 1995).

Os **compostos quelantes e complexantes** são substâncias produzidas pelos MSF que apresentam alta afinidade pelo cálcio, alumínio e ferro, solubilizando os fosfatos que contêm esses elementos. Algumas dessas substâncias são ácidos orgânicos que, além de acidificar o meio, possuem essa característica. Outro mecanismo de solubilização de fosfatos relacionado à quelação é a **produção de sideróforos**. Essas substâncias são ácidos hidroxâmicos e catecóis que podem ser produzidos, tanto pelos microrganismos do solo e da rizosfera como pelas plantas, em situações de baixa disponibilidade de ferro solúvel (CLINE et al., 1983; WILHELM & TRICK, 1994). Dentre os microrganismos capazes de produzir essas substâncias, destacam-se os fungos e as bactérias, em especial as do gênero *Pseudomonas*. Devido a sua alta afinidade pelo ferro, os sideróforos seqüestram esse elemento da solução do solo, promovendo a dissolução dos fosfatos de ferro, permitindo a absorção do fósforo pelas plantas (MASAOKA et al., 1993).

O **consumo do  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Fe}^{++}$  na nutrição microbiana** também pode atuar como um mecanismo de solubilização. Ao consumir esses cátions, acompanhantes dos fosfatos insolúveis do solo, os microrganismos tornam o fósforo disponível às plantas.

Entre os microrganismos quimiolitotróficos, o principal mecanismo de solubilização de fosfatos é a **formação de ácidos fortes no solo, como sulfúrico e nítrico**, a partir dos processos de oxidação do enxofre e de nitrificação, por bactérias dos gêneros *Thiobacillus* e *Nitrosomonas*, respectivamente (ALEXANDER, 1980).

Vale ainda ressaltar que algumas plantas também apresentam capacidade de solubilização de fosfatos, tanto pela liberação de ácidos orgânicos (DINKELAKER, ROMHELD, MARSHNER, 1989; BOLAN et al., 1994) quanto pela produção de compostos quelantes. AE & OTANI (1997), analisando preparados de parede celular de diferentes plantas cultivadas, verificaram que as células de amendoim foram mais hábeis na solubilização de fosfatos de rocha do que as de sorgo e soja.

Os diferentes mecanismos propostos para a solubilização microbiana de fosfatos estão resumidos na Figura 1.11.

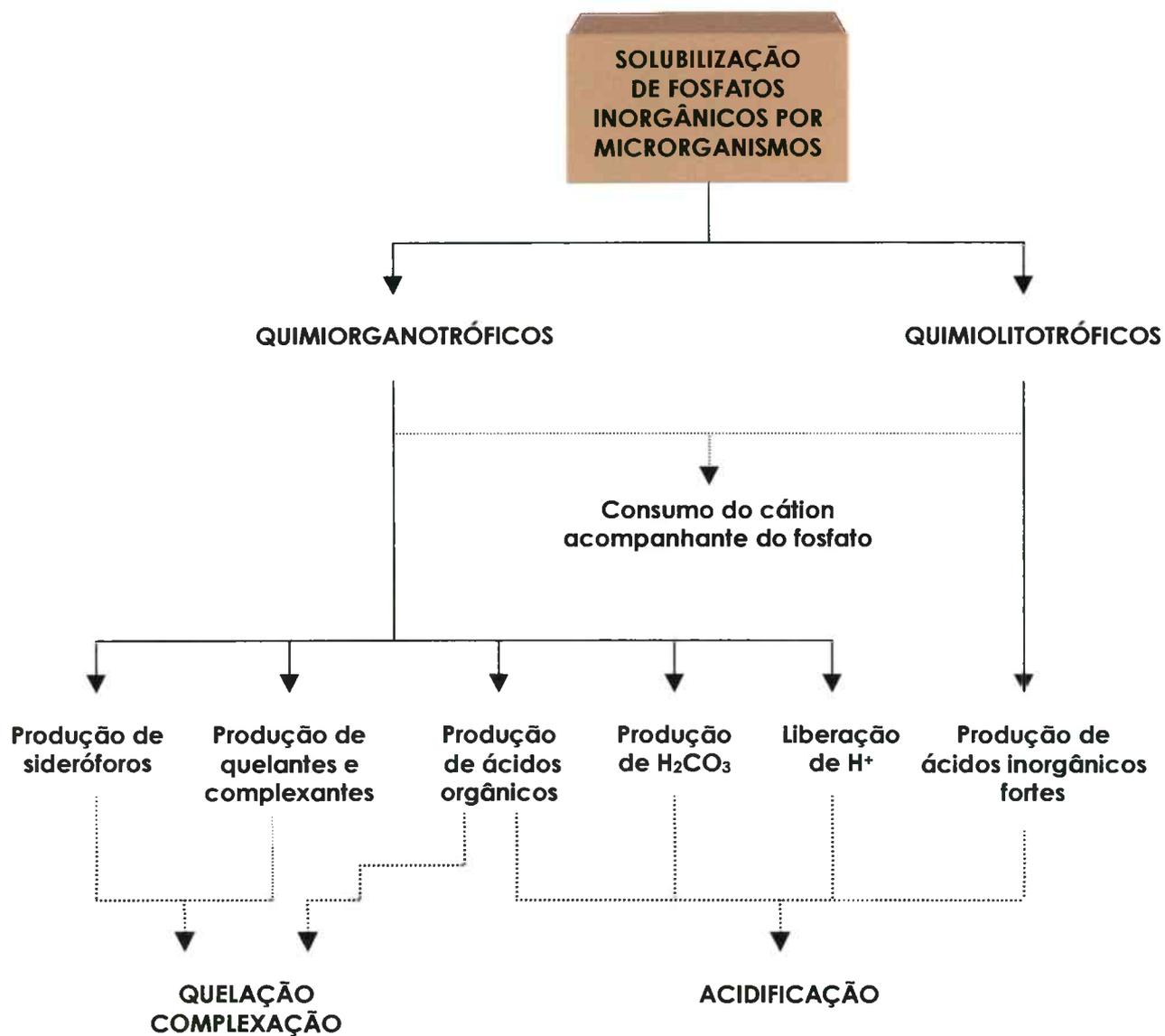


Figura 1.11 - Mecanismos envolvidos na solubilização microbiana de fosfatos.

### **1.5.3 - Influência das fontes de C e N na solubilização de fosfatos**

Inúmeros autores têm demonstrado que a composição do meio de cultura interfere no crescimento dos MSF, na produção de ácidos orgânicos e na solubilização de fosfatos *in vitro* (MAXWELL & BATEMAN, 1967; PUNJA & JENKINS, 1984).

Quanto às fontes de carbono, diversos trabalhos demonstram que glicose, frutose, sacarose e xilose favorecem mais a solubilização do que maltose, galactose, celulose e amido (VORA & SHELAT, 1998; REYES et al., 1999; SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

Estudos têm demonstrado que a produção de ácidos no meio de cultura depende das fontes de nitrogênio e é maior quando se utiliza o amônio do que o nitrato (LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991; DIXON-HARDY et al., 1998; VORA & SHELAT, 1998). De acordo com WENZEL, ASHFORD, SUMMERELL (1994), é provável que prótons H<sup>+</sup> do interior da célula sejam trocados pelos NH<sub>4</sub><sup>+</sup> existentes no meio externo, justificando esse favorecimento à solubilização.

Assim, é provável que a solubilização de fosfatos no solo seja afetada pela composição da matéria orgânica ou dos produtos disponíveis na rizosfera.

### **1.5.4 - Genética da solubilização de fosfatos**

GOLDSTEIN (1986; 1994) tem se referido à característica de solubilização de fosfatos como um fenótipo denominado Mps<sup>+</sup> (*mineral phosphate solubilization*). Diversos autores clonaram genes envolvidos com a capacidade de solubilização de bactérias gram-negativas, como *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* e *Enterobacter agglomerans*, e da cianobactéria *Synechocystis* sp., conseguindo expressá-los em isolados de bactérias Mps<sup>-</sup>, como *Escherichia coli* JM101 (GOLDSTEIN & LIU, 1987; BABU-KHAN et al., 1995; KIM, McDONALD, JORDAN, 1997; GYANESHWAR, NARESH KUMAR, PAREKH, 1998). São esforços particularmente importantes para elucidar os mecanismos de solubilização desses grupos de bactérias, que podem possibilitar a descoberta de genes homólogos em outros microrganismos. Porém, não se pode conceber, por razões já discutidas, que a

solubilização de fosfatos seja expressa por um único gene ou por um grupo de genes comum a todos os microrganismos solubilizadores.

A avaliação genética e a manipulação molecular dos MSF não têm se limitado à clonagem e expressão de genes. Estudos recentes com *Penicillium rugulosum* demonstraram a possibilidade da obtenção de mutantes com fenótipo Mps<sup>++</sup>, com capacidade de solubilização ampliada, a partir de tratamentos com irradiação de luz ultravioleta (REYES et al., 1999). NGUYEN et al. (1992), estudando fungos ectomicorrízicos, verificaram que não há evidências claras da herdabilidade da característica de solubilização, sugerindo que os mecanismos devem ser poligeneticamente controlados. Assim, cada mecanismo de cada microrganismo pode ter um grupo de genes envolvidos e as homologias entre eles são incertas.

## 1.6 - ECTOMICORRIZAS

### 1.6.1 - Conceito e importância

As associações simbióticas entre as raízes das plantas terrestres e determinados fungos do solo são denominadas micorrizas (FRANK, 1885).

Essas associações atuam no ecossistema como um mecanismo de **captação e reciclagem de nutrientes e água**, onde ambos os organismos se beneficiam. Assim, o fungo e a planta hospedeira dependem um do outro para sobreviver nos ecossistemas naturais (MOLINA & TRAPPE, 1984). O fungo recebe da planta carboidratos formados na fotossíntese e outras moléculas sintetizadas no metabolismo vegetal. A planta, por sua vez, beneficia-se pelo **aumento da absorção de nutrientes** inorgânicos do solo, especialmente P e N, decorrente da **maior área de captação** proporcionada pelas hifas (SMITH & READ, 1997). Em alguns casos, os fungos micorrízicos podem atuar na **solubilização de fosfatos** inorgânicos (LEYVAL & BERTHELIN, 1986; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991;

GOMES, OLIVEIRA, SILVA FILHO, 1992) e na **produção de fosfatases**, enzimas responsáveis pela mineralização do fósforo da matéria orgânica.

Além da característica nutricional, as micorrizas podem beneficiar as plantas conferindo **maior resistência à seca** (DUDDRIDGE, MALIBARI, READ, 1991), **à temperatura e à acidez extremas**, e **aos fitopatógenos** (RASANAYAGAM & JEFRIES, 1992; NEWSHAM, FITTER, WATKINSON, 1995). Citam-se, ainda, outras funções relacionadas à **destoxificação do solo** (WILKINS, 1991), à **modificação da arquitetura do sistema radicular** (KOTHARI, MARSCHNER, RÖHMELD, 1990; HOOKER, MUNRO, ATKINSON, 1992), à **manutenção da estrutura e da estabilidade de comunidades vegetais** (FRANCIS & READ, 1994), e à **melhoria das condições físicas do solo**, com o aumento da agregação e da estabilidade dos agregados (TISDALL, 1994).

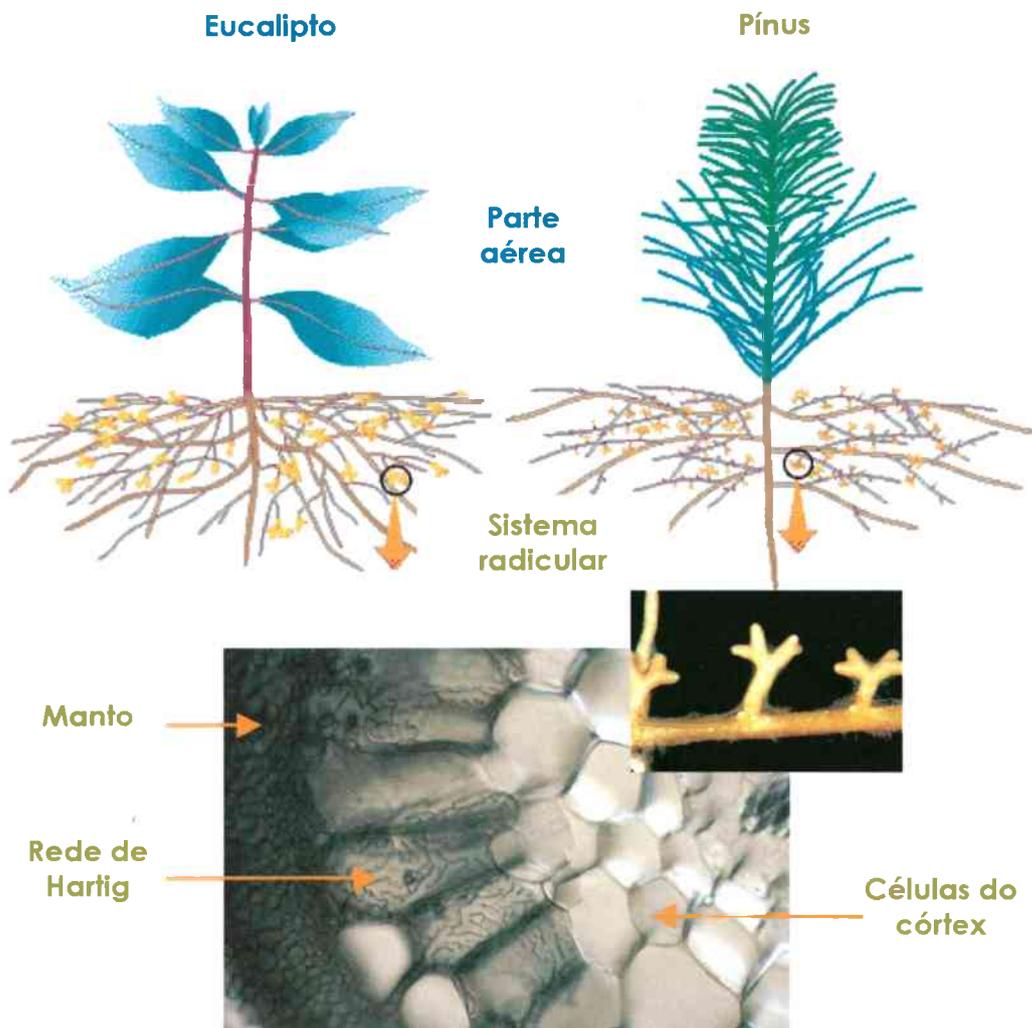
A simbiose com fungos micorrízicos capacita as plantas para melhor sobrevivência e crescimento. Essa capacidade de associação tem sido atribuída a um processo de co-evolução, surgido como mecanismo de sobrevivência para ambos os organismos, permitindo sua disseminação em ambientes desfavoráveis, como solos de baixa fertilidade, seca, competição com patógenos, baixas temperaturas e outras situações de estresse (OLIVEIRA & GIACHINI, 1999).

A maioria das plantas vasculares forma algum tipo de micorriza com fungos especializados. Mais de 6 mil espécies de fungos são capazes de se associar a aproximadamente 240 mil espécies de plantas (BONFANTE & PEROTTO, 1995). Algumas plantas, como as espécies do gênero *Pinus*, são consideradas simbiontes obrigatórias, pois sua sobrevivência e seu crescimento são extremamente reduzidos na ausência das micorrizas.

### **1.6.2 - Morfologia e ocorrência**

As ectomicorrizas (ECM) caracterizam-se pela penetração do fungo nos espaços intercelulares do córtex da raiz (rede de Hartig), e pela formação de um manto de hifas e alterações morfológicas na raiz, conforme observa-se na Figura 1.12. As raízes colonizadas por fungos ectomicorrízicos (fECM) tornam-se

diferenciadas, sendo isentas de pêlos radiculares, curtas e algumas vezes coloridas e ramificadas (SMITH & READ, 1997; SYLVIA, 1999).



**Figura 1.12 - Ectomicorriza em eucalipto e pínus (adaptado de BRUNDRETT et al., 1996). Fotos: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization - CSIRO, Austrália.**

A rede de Hartig é um envoltório intercelular de hifas, formado entre as células epidérmicas e corticais da raiz. É o local onde ocorrem as trocas de

metabólitos entre o fungo e a planta hospedeira (KROPP & LANGLOIS, 1990). Nas angiospermas, as células epidérmicas têm sua morfogênese alterada, sendo induzidas a expandir-se radialmente, ao invés de axialmente, confinando a rede a esta camada de células e aumentando a superfície de trocas (PETERSON & FARQUHAR, 1994). Nas gimnospermas, a rede se estende até o córtex e, algumas vezes, até a endoderme. Geralmente, não ocorre reação adversa à colonização fúngica nas células corticais e a rede de Hartig nem sempre as envolve completamente (KROPP & LANGLOIS, 1990).

O manto é formado pela compactação de hifas ao redor da raiz, podendo ser sinenquimatoso ou prosenquimatoso (GOODMAN et al., 1996/1998). Essas hifas armazenam glicogênio, proteínas e lipídios, podendo acumular nutrientes inorgânicos, como N, P, K e Ca (MARX, MAUL, CORDELL, 1992; PETERSON & FARQUHAR, 1994; SMITH & READ, 1997).

As ECM são encontradas em grande parte das espécies de gimnospermas, mas ocorrem também em algumas angiospermas. Os fungos do Filo Basidiomycota são os mais freqüentes, mas também alguns Ascomycota e poucos Zygomycota podem formar esta associação (ALEXOPOULOS, MIMS, BLACKWELL, 1996). Mais de cinco mil espécies de fungos apresentam capacidade para formar ECM (TRAPPE, 1987). De acordo com OLIVEIRA & GIACHINI (1999), muitas espécies de fECM são específicas em relação ao gênero ou à espécie da planta hospedeira.

As essências lenhosas de interesse florestal são, geralmente, dependentes de associações ectomicorrízicas (GARBAYE, 1990), principalmente as pertencentes às famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae e Salicaceae. Algumas também apresentam micorrizas arbusculares (MA), como Myrtaceae e Dipterocarpaceae, mas, dependendo das condições edáficas e/ou climáticas, as ECM predominam (OLIVEIRA, SCHMIDT, BELLEI, 1997). A dependência das espécies florestais em relação à colonização ectomicorrízica foi inicialmente observada quando as primeiras tentativas para estabelecer plantações de pinus em regiões distantes de sua ocorrência natural falharam até que os fECM foram introduzidos (HACSKAYLO, 1967 citado por JANERETTE, 1991).

Em Santa Catarina, GIACHINI et al. (2000), estudando a diversidade de fECM em plantações de *Pinus* e *Eucalyptus*, observaram a ocorrência de dezesseis gêneros do Filo Basidiomycota: *Amanita*, *Chalciporus*, *Chondrogaster*, *Cortinarius*, *Descomyces*, *Inocybe*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Setchelliogaster*, *Suillus* e *Thelephora*, além do gênero *Labyrinthomyces*, pertencente ao Filo Ascomycota (Figura 1.13). Nesse estudo, foram também descritas três novas espécies: *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe et Oliveira; *Descomyces giachinii* Trappe, Oliveira, Castellano et Claridge; e *Scleroderma bougheri* Trappe, Castellano et Giachini.

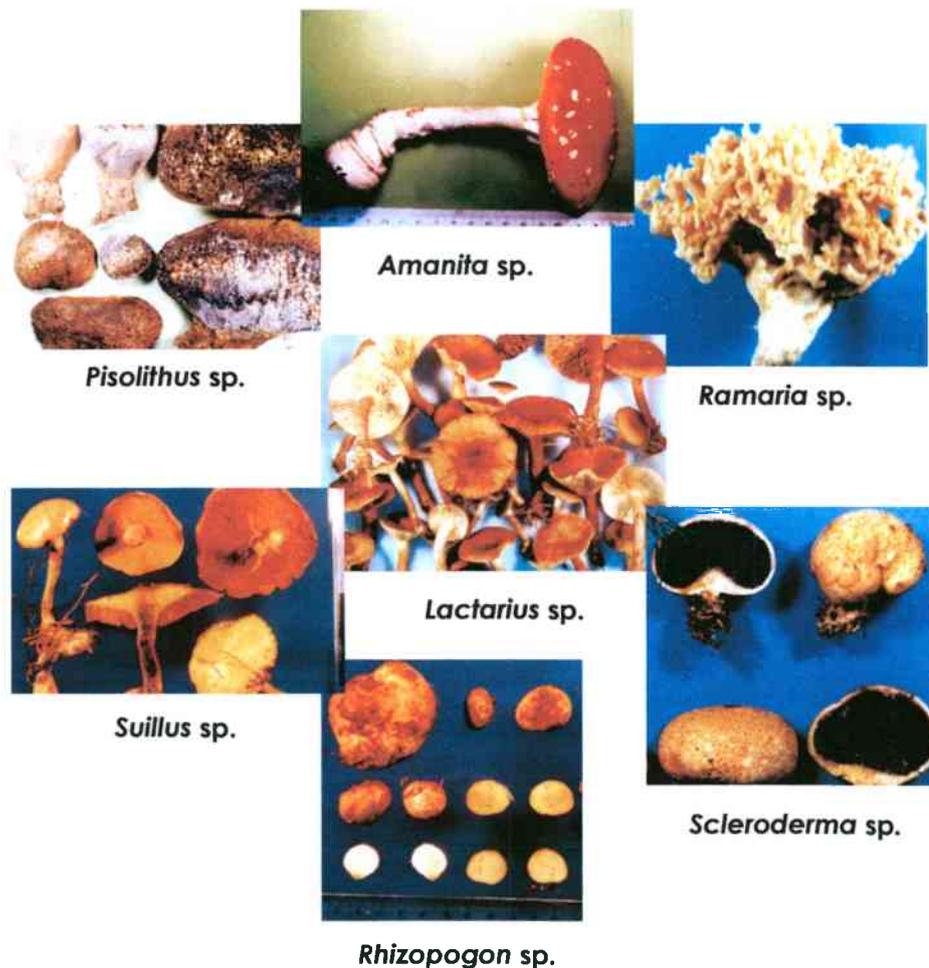


Figura 1.13 - Alguns gêneros de fungos ectomicorrízicos encontrados em plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* em Santa Catarina. Fotos: GIACHINI (1995).

A ocorrência de ECM em plantas nativas de florestas tropicais parece ser rara (JANOS, 1987; BÉREAU & GARBAYE, 1994). Observações feitas na Mata Atlântica e na Floresta de Araucária em Santa Catarina sugerem a ausência desse tipo de micorriza em plantas nativas das duas formações florestais (ANDRADE et al., 2000).

### **1.6.3 - Interações na micorrizosfera**

A colonização micorrízica promove alterações fisiológicas e trocas especializadas entre os simbioses, estabelecendo, com isso, um novo equilíbrio microbiano na região de influência da raiz colonizada. Essa região foi definida por LINDERMAN (1988) como micorrizosfera.

Microrganismos de vários gêneros têm sido isolados do manto ou dos esporocarpos dos fECM (BOWEN & THEODOROU, 1979; GARBAYE & BOWEN, 1987; LEYVAL & BERTHELIN, 1989). Dentre eles, citam-se anaeróbios obrigatórios e facultativos, produtores de quitinase, solubilizadores de fosfatos, produtores de sideróforos, produtores de hormônios, promotores do crescimento vegetal, produtores de antibióticos e antagonistas de fitopatógenos (LINDERMAN, 1988).

A presença de microrganismos nesses sítios indica que o estabelecimento e o funcionamento da associação ectomicorrízica são influenciados pelas interações destes com os fECM. GARBAYE (1991) classifica os organismos envolvidos nesse sistema de interações em cinco grupos tróficos:

- **Saprófitas:** são os organismos capazes de utilizar uma ampla variedade de moléculas e complexos orgânicos, a partir da matéria orgânica morta, sendo, por isso, os mais numerosos;
- **Micorrizoféricos especializados:** são totalmente dependentes das biomoléculas simples liberadas pelas plantas e pelos fungos simbioses. Como não conseguem se multiplicar significativamente fora desse sítio, competem com outros deste grupo. Apesar de haver alguns fungos, os mais estudados são as chamadas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal;

- **Patógenos de raiz:** são geralmente biotróficos e penetram os tecidos das raízes. Na etapa de pré-infecção, competem com os fECM pelos exsudatos da raiz. Em plantas já colonizadas, as ECM geralmente reagem contra esses microrganismos aumentando a liberação de compostos polifenólicos (produzidos pelo fECM) e terpenóides (produzidos especialmente por plantas coníferas);
- **Simbiontes da raiz:** também são biotróficos e dependem da raiz para completar seu ciclo de vida, mas são benéficos às plantas;
- **Predadores:** são organismos que podem reduzir significativamente as populações de microrganismos micorrizosféricos.

Estudando especificamente as interações positivas, DUPONNOIS & GARBAYE (1990) verificaram que determinados microrganismos micorrizosféricos são benéficos aos fECM, sendo denominados “*helpers*” ou auxiliares da micorrização. Bactérias auxiliares da micorrização (BAM) influenciam não apenas a sobrevivência dos fECM mas, também, a formação e o desenvolvimento das ectomicorrizas. Esse efeito positivo foi atribuído por OLIVEIRA & GARBAYE (1989) aos seguintes mecanismos:

- **Estimulação trófica direta:** produção de substâncias utilizadas como substrato pelos fECM, como fontes de carbono (ácidos orgânicos) e fatores de crescimento (hormônios, vitaminas e aminoácidos);
- **Detoxificação:** quebra de compostos fenólicos produzidos pelos fECM, tóxicos a eles mesmos;
- **Modificação de exsudatos da raiz:** mineralização de compostos orgânicos complexos, liberando nutrientes aos simbiontes;
- **Aumento da susceptibilidade da raiz:** produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas, facilitando a penetração do fECM;
- **Interação com os mecanismos de reconhecimento** entre a planta e o fECM: produção de substâncias que ativam os sinais moleculares que estabelecem a simbiose;

- **Interação com um quarto organismo:** uma relação benéfica que estimule qualquer um, beneficiando a relação dos três simbioses.

Os fECM são afetados pela presença de hormônios vegetais e muitos possuem capacidade de produzir auxinas e precursores de giberelinas (STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ, 1984; STRZELCZYK et al., 1997). Nas associações micorrízicas, hospedeiros e fungos trocam sinais moleculares, incluindo os hormônios vegetais responsáveis pelas mudanças morfológicas nas hifas e nas raízes, que possibilitam a colonização. Nas gimnospermas, a formação de ectomicorrizas dicotômicas e coralóides tem sido atribuída aos efeitos dos hormônios vegetais produzidos pelos fECM ou pelos microrganismos auxiliares da micorrização (BARKER & TAGU, 2000).

SLANKIS (1973) desenvolveu a "teoria hormonal", defendendo que os hormônios vegetais são os principais responsáveis pelo processo de diferenciação celular que antecede a colonização ectomicorrízica. Além disso, demonstrou uma relação inversa entre a disponibilidade de N e a produção de auxinas, demonstrando que o excesso do nutriente diminui a produção de triptofano, um aminoácido precursor do ácido indol-3-acético (AIA).

Durante muitos anos, a teoria de Slankis foi amplamente criticada, já que muitos autores não obtiveram os mesmos resultados. No entanto, GAY et al. (1994), estudando o efeito da inoculação de um mutante do fungo *Hebeloma cylindrosporum*, superprodutor de triptofano e de auxinas, obteve uma ampliação de até 300% na colonização de *Pinus pinaster*. Além disso, os autores observaram mudanças internas na raiz colonizada pelo mutante, que apresentou uma extensão da rede de Hartig até a endoderme, o que fortalece a teoria hormonal.

#### **1.6.4 - Biodegradação mineral por ectomicorrizas**

Estudos recentes têm comprovado o efeito dos fECM sobre a biodegradação de minerais. A produção de ácidos orgânicos tem implicações profundas nos processos de intemperização de rochas e nos ciclos

biogeoquímicos. A observação da capacidade de solubilização de fosfatos pelos fECM também é relativamente recente (LEYVAL & BERTHELIN, 1986; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991), quando comparada aos relatos envolvendo microrganismos de vida livre.

Embora o incremento na concentração de P nas plantas colonizadas por fECM seja relacionada, na maioria dos estudos, ao aumento da superfície de absorção das raízes, proporcionado pelo crescimento das hifas no solo (PETERSON, PICHÉ, PLENCHETTE, 1984; SMITH & READ, 1997), tem-se destacado uma importante ação de fECM na biodegradação e solubilização de diversos minerais (AROCENA & GLOWA, 2000; BREEMEN, LUNDSTRÖM, JONGMANS, 2000; BREEMEN et al., 2000; WALLANDER, 2000; LANDEWEERT et al., 2001).

### **1.6.5 - Potencial de uso biotecnológico**

A associação micorrízica favorece a absorção e a translocação de nutrientes, além de proporcionar outros efeitos diretos e indiretos que beneficiam as plantas hospedeiras. Considerando que a maioria das áreas florestadas nos trópicos e subtropicais encontram-se em solos de baixa fertilidade, há grande interesse nos programas de micorrização controlada a serem aplicados durante a produção de mudas. A micorrização controlada consiste no uso de fECM eficientes e competitivos, selecionados por suas características de compatibilidade com a planta hospedeira, promoção do crescimento e adaptação às condições locais (GARBAYE, 1984; LE TACON, GARBAYE, CARR, 1987).

Pelo incremento na absorção de nutrientes, as micorrizas possibilitam reduzir as quantidades de fertilizantes químicos, especialmente fosfatos, normalmente utilizados nos sistemas de produção florestal (PETERSON, PICHÉ, PLENCHETTE, 1984). GARBAYE (1990), apresentando os resultados obtidos em diversos países pela inoculação controlada de essências florestais com fECM, demonstra que as plantas apresentam incrementos de altura que variam de 10% a mais de 400%.

Vários tipos de inoculantes ectomicorrízicos vêm sendo utilizados na produção de mudas de essências florestais. Os mais comuns consistem na utilização de solo das próprias plantações (MIKOLA, 1973), esporos fúngicos misturados ao substrato de produção de mudas (MARX & CORDELL, 1990) e fragmentos de micélio produzidos sob condições axênicas (MARX, 1980). Mais recentemente, tem-se tentado cultivar os fECM em biorreatores em meio líquido (ROSSI, 2001) e utilizá-los encapsulados em alginato de cálcio ou imobilizados em outros materiais.

No Brasil, ainda não existem inoculantes de fECM produzidos industrialmente. O conhecimento das especificidades fungo-hospedeiro, levando em consideração aspectos metabólicos envolvidos, tanto na promoção do crescimento quanto na produção de inoculantes, faz-se necessária para o desenvolvimento dessa tecnologia (ROSSI, SOUZA, OLIVEIRA, 2002).

Apesar de existirem estudos que relacionam o favorecimento da colonização ectomicorrízica por bactérias do solo, não são conhecidas pesquisas que verifiquem a interação desses simbiontes com microrganismos solubilizadores, produtores de fosfatases e hormônios vegetais, visando a produção de inoculantes mistos para essências florestais. Tão pouco se conhecem estudos que procurem avaliar a interação dos fungos ectomicorrízicos com os fungos solubilizadores de vida livre no solo, onde a interferência mútua pode ser benéfica ou prejudicial para um ou ambos os microrganismos envolvidos. Mesmo que o crescimento de um deles possa ser prejudicado, isso não significa que o consórcio testado não apresente efeitos sobre o crescimento vegetal, pois condições de estresse podem favorecer a produção de inúmeros metabólitos microbianos benéficos às plantas.

Do ponto de vista biotecnológico, cabe avaliar os efeitos dessa interação tripla sobre a produtividade da planta. A inoculação com fECM e MSF pode proporcionar diversos efeitos. No caso dos pinus, é provável que a utilização de isolados selecionados, competitivos e com alto potencial para promover o crescimento das plantas, acarrete incrementos na produtividade das mudas no viveiro e, posteriormente, possibilite a colonização desses microrganismos no local definitivo, aumentando a produção a médio e longo prazos.

## CAPÍTULO 2

### MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO SIMULTÂNEO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

#### 2.1 - INTRODUÇÃO

Há mais de uma década, os laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas da UFSC vêm isolando, cultivando e mantendo microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM), constituindo uma grande coleção desses microrganismos. O isolamento e manutenção dos MSF ocorre no meio Glicose-Extrato de Levedura - GEL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982 modificado por SILVA FILHO, 1998), enquanto que os fECM, são mantidos no meio Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969).

Assim como os demais microrganismos, os MSF e os fECM são afetados pela composição do meio de cultura. Pequenas alterações na concentração ou nas fontes de nutrientes, bem como no pH, podem afetar a produção de ácidos orgânicos (MAXWELL & BATEMAN, 1967; PUNJA & JENKINS, 1984), a solubilização de fosfatos *in vitro* (LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991; SILVA FILHO & VIDOR, 2000; SILVA FILHO & VIDOR, 2001) e a viabilidade e infectividade dos fECM (LAPEYRIE & BRUCHET, 1985; STRZELCZYK et al., 1993).

A definição de uma metodologia que torne possível a inoculação conjunta a campo, e que permita incrementar a produção de mudas de essências florestais, pode se constituir numa importante alternativa às práticas convencionais. Para isso, tornam-se necessários estudos sobre a compatibilidade entre esses diferentes grupos de microrganismos. Para avaliar a interação *in vitro* entre eles, deve ser utilizado um meio de cultura que possibilite o crescimento simultâneo dos mesmos.

O objetivo deste ensaio foi definir a melhor composição de meio de cultura para o cultivo simultâneo de MSF e fECM, especificamente para o estudo de suas interações e a possível aplicação conjunta desses dois tipos de microrganismos.

## 2.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Seis MSF e cinco fECM, representativos das coleções de isolados dos Laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas da UFSC, foram estudados (Tabelas 2.1 e 2.2).

**Tabela 2.1 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados do solo ou da rizosfera de cultivos de espécies vegetais perenes em Santa Catarina.**

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie vegetal</b>
MSF-062	<i>Penicillium</i>	<i>Prunus persica</i>
MSF-221	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pinus taeda</i>
MSF-251	<i>Aspergillus</i>	<i>P. elliotii</i>
MSF-293	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. taeda</i>
MSF-306	<i>Rhizopus</i>	<i>P. elliotii</i>
MSF-310A	<i>Aspergillus</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>

**Tabela 2.2 - Fungos ectomicorrízicos isolados de plantações florestais em Santa Catarina.**

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>
MARX 270	<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch	<i>Pinus</i> sp.
UFSC-Sc42	<i>Scleroderma</i> sp. (Persoon) Fries	<i>Pinus</i> sp.
UFSC-Sc91	<i>Scleroderma</i> sp. (Persoon) Fries	<i>Pinus</i> sp.
UFSC-Rh106	<i>Rhizopogon vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange	<i>P. taeda</i>
UFSC-Su114	<i>Suillus cothurnatus</i> Sing.	<i>P. taeda</i>

Além dos meios padrão, GEL e MNM, foram testadas duas modificações contendo diferentes concentrações dos nutrientes existentes nos dois meios originais (Tabela 2.3). Uma das modificações apresentava a mesma quantidade de nutrientes existente nos meios padrão, porém dividida entre as diferentes fontes utilizadas, sendo por isso denominada GMM (GEL + MNM / Médio). A outra modificação também possuía as diferentes fontes de nutrientes existentes nos dois meios padrão, mas adicionadas em suas concentrações originais, sendo por isso denominada GMA (GEL + MNM / Aditivo).

**Tabela 2.3 - Composição dos meios testados no cultivo de microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos.**

Reagentes	Meios			
	GEL	MNM	GMM	GMA
Glicose	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g
Extrato de malte	-	3,0 g	1,5 g	3,0 g
Extrato de levedura	3,0 g	-	1,5 g	3,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200 mg	150 mg	170 mg	200 mg
CaCl <sub>2</sub>	20 mg	50 mg	35 mg	50 mg
NaCl	10 mg	25 mg	17 mg	25 mg
FeCl <sub>3</sub>	-	12 mg	10 mg	12 mg
Tiamina HCl	-	100 µg	100 µg	100 µg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	500 mg	500 mg	500 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	250 mg	250 mg	250 mg
KNO <sub>3</sub>	100 mg	-	-	100 mg
Solução de micronutrientes <sup>(1)</sup>	2,0 mL	-	2,0 mL	2,0 mL
Solução de Fe-EDTA <sup>(2)</sup>	4 mL	-	3,0 mL	4 mL
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL	1.000 mL	1.000 mL	1.000 mL
pH antes da autoclavagem	7,0	5,8	6,5	6,5
Agar	15,0 g	15,0 g	15,0 g	15,0 g

<sup>1</sup> 0,2 g de NaMoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0,235 g de MnSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0,28 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,008 g de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O e 0,024 g de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O em 200 mL de água destilada;

<sup>2</sup> 6,07 g de Na-EDTA e 6,17 g de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O em 1000 mL de água destilada aquecida.

O inóculo dos MSF, na forma de suspensão celular, foi obtido por lavagem de culturas puras em tubo de cultura (100 x 10 mm) contendo 3 mL de meio GEL sólido, incubadas por 72 h a 25 ± 1°C, adicionando-se 3 mL de água destilada

esterilizada sobre as mesmas e agitando-se manualmente. Os MSF foram inoculados isoladamente, com auxílio de uma alça de platina, na superfície dos diferentes meios, no centro de placas de Petri, e incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por períodos que variaram entre 24 e 96 h, dependendo do comportamento de crescimento de cada isolado.

O inóculo dos fECM foi constituído de um disco com 7 mm de diâmetro, obtido a partir de culturas puras em meio MNM sólido, incubadas por 14 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os discos foram previamente incubados por 3 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  para verificar sua viabilidade, em meio MNM. Os isolados foram cultivados por períodos entre 18 e 32 dias, dependendo da velocidade de crescimento de cada um. O crescimento dos isolados, em ambos os casos, foi avaliado pelo diâmetro médio da colônia, medido em dois eixos transversais.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados apresentou menor crescimento no meio MNM. Foram evidenciadas poucas diferenças entre os meios GEL, GMM e GMA (Figuras 2.1 e 2.2).

Dentre os MSF (Figura 2.1), a bactéria MSF-221 (*Pseudomonas* sp.) e os fungos MSF-293 (*Paecilomyces* sp.) e MSF-251 (*Aspergillus* sp.) não apresentaram diferenças entre os meios GEL, GMM e GMA, onde obtiveram crescimento superior ao proporcionado pelo meio MNM. O fungo MSF-306 (*Rhizopus* sp.) apresentou maior crescimento nos meios GEL e GMA, seguido pelos meios GMM e MNM. O fungo MSF-062 (*Penicillium* sp.) apresentou maior crescimento nos meios GEL e GMM, e crescimento inferior nos meios GMA e MNM. O fungo MSF-310A (*Aspergillus* sp.) cresceu melhor nos meios GMM e GMA, apresentando crescimento mediano no meio GEL e inferior no meio MNM.

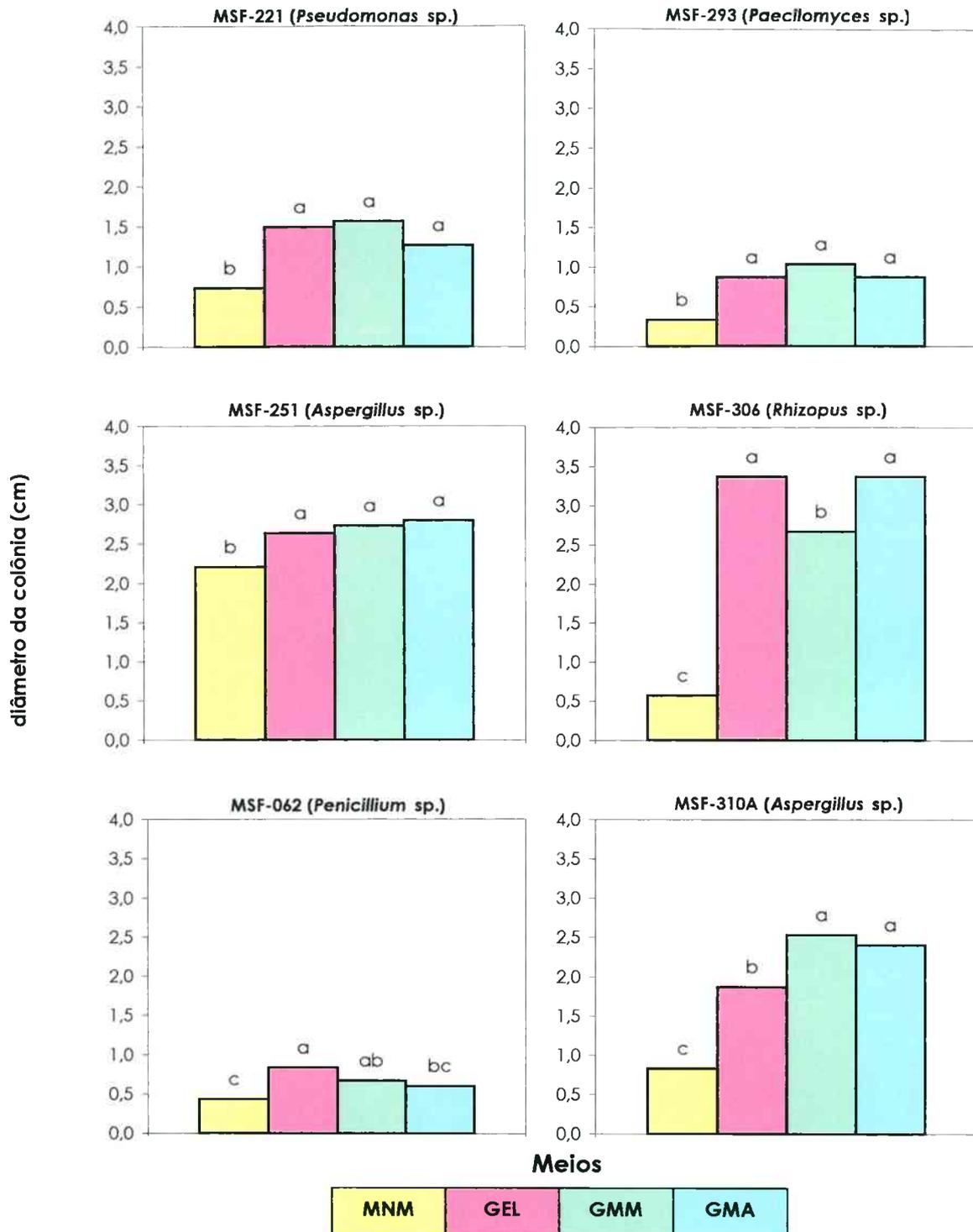


Figura 2.1 - Crescimento de microrganismos solubilizadores de fosfatos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA. Médias de três repetições. Letras iguais em cada isolado não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

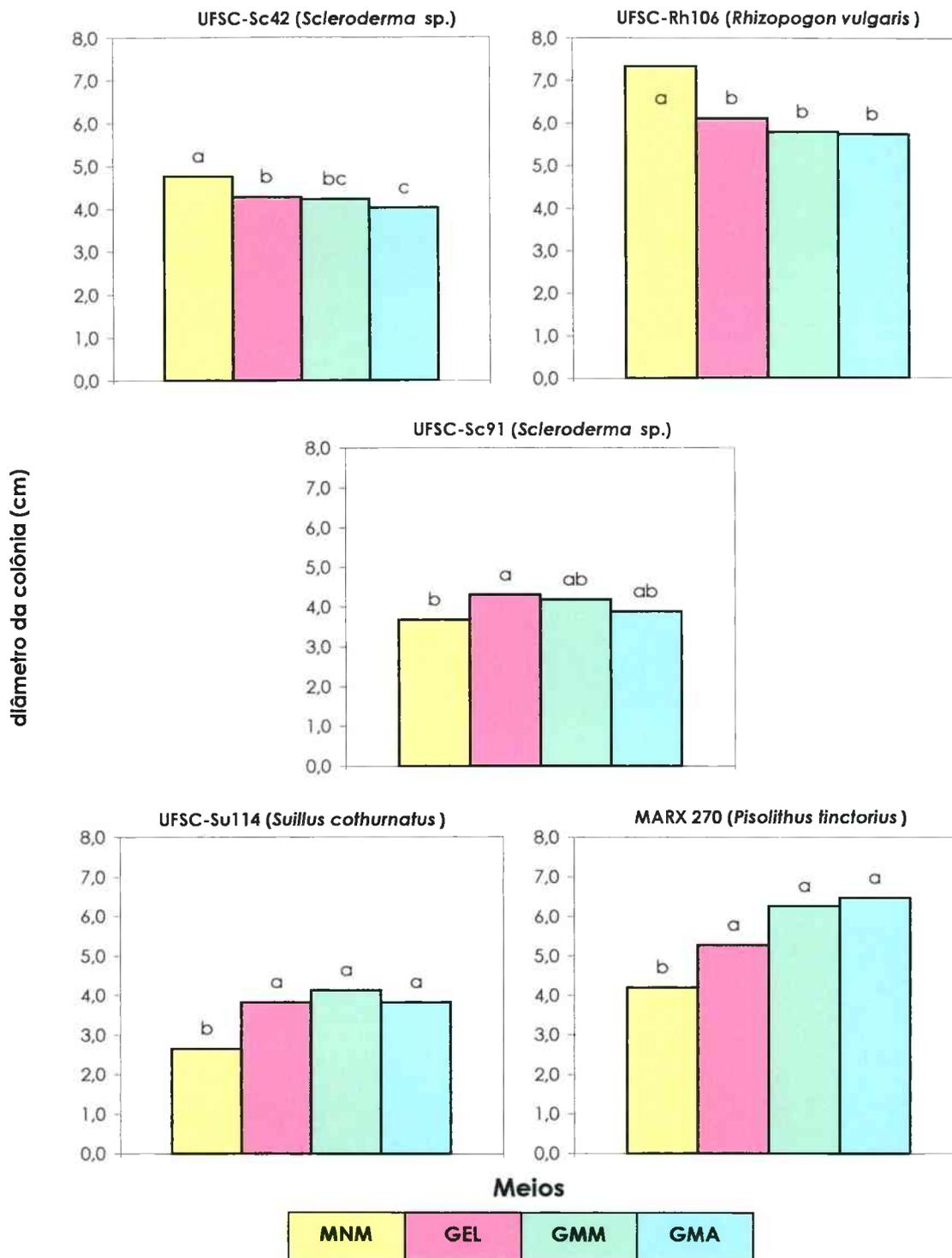


Figura 2.2 - Crescimento de fungos ectomicorrízicos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA. Médias de três repetições. Letras iguais em cada isolado não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os fECM apresentaram resultados variáveis nos diferentes meios (Figura 2.2). Os isolados UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) e UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) apresentaram maior crescimento em meio MNM. O isolado UFSC-Sc42 apresentou menor crescimento no meio GMA, diferentemente do isolado UFSC-Rh106, que não apresentou diferenças significativas entre os outros três meios testados. *Suillus cothurnatus* (UFSC-Su114) e *Pisolithus tinctorius* (MARX270) tiveram comportamento semelhante ao da maioria dos solubilizadores, com os menores valores no meio MNM e sem diferenças significativas entre os demais meios. O isolado UFSC-Sc91 (*Scleroderma* sp.), apesar de não apresentar diferenças entre os meios GEL, GMM e GMA, teve maior crescimento no meio GEL quando comparado com o meio MNM.

Os resultados obtidos parecem ser consequência das diferenças nutricionais e ambientais dos meios utilizados. Quanto ao pH, os dados indicam que os isolados testados podem crescer normalmente entre os valores testados. Isso é plenamente aceitável, pois ambos são adaptados às diferentes condições químicas e físicas do solo. Os fECM, geralmente mais exigentes que os MSF sob condições de cultivo, apesar de apresentarem um crescimento ótimo entre pH 2,9 e 5,9, também são capazes de crescer em valores próximos à neutralidade (HARVEY, 1991). Esse comportamento foi observado por STRZELCZYK et al. (1993) que, testando o crescimento conjunto de fECM e bactérias do solo em diferentes meios, obtiveram resultados variáveis, com alguns fungos apresentando maior crescimento em pH 7,0, e outros em pH 5,8, dependendo da espécie e da composição do meio.

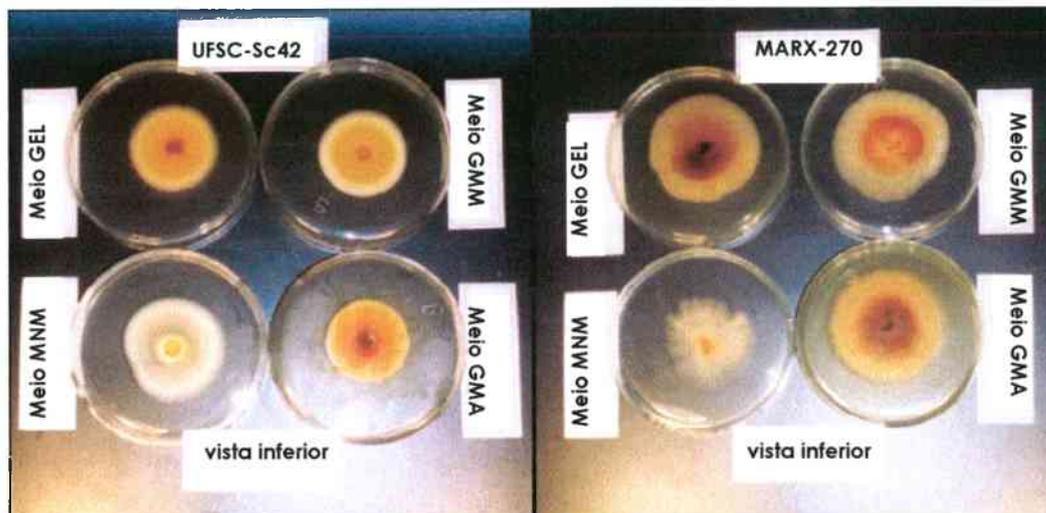
Com relação às diferenças nutricionais entre os meios padrão, o MNM utiliza o extrato de malte, enquanto o GEL utiliza o extrato de levedura. Assim, as modificações criadas, GMM e GMA, utilizam as duas fontes em diferentes quantidades. Talvez esta característica tenha sido uma das principais responsáveis pelo maior crescimento da maioria dos isolados nos meios GEL, GMM e GMA. O extrato de malte é basicamente uma fonte de carboidratos (70-75%). O extrato de levedura é rico em aminoácidos essenciais (45-50% de proteínas), carboidratos (30-35%), sais minerais (até 1,5-2,5% de fósforo) e fatores de crescimento, como vitaminas do complexo B, dentre elas a tiamina (vitamina

B1). Assim, a adição do extrato de levedura pode ter aumentado a concentração desses nutrientes, estimulando o maior crescimento. PRADELLA et al. (1991) estudando o efeito da adição de extrato de levedura ao meio MNM, para o cultivo em fermentação líquida de *Pisolithus tinctorius*, obtiveram aumentos significativos na produção de biomassa do fungo, com um acréscimo de até 87,5% em relação à obtida no meio sem essa fonte. Esses resultados foram atribuídos a um efeito tamponante do meio e à utilização de ácidos orgânicos e aminoácidos, proporcionados pela adição do extrato de levedura. Entretanto, ROSSI (2001), estudando a produção de inoculante de *Pisolithus microcarpus* em fermentação líquida, concluiu que o efeito tamponante proporcionado pela adição de extrato de levedura ao meio MNM é o principal fator que possibilita o maior crescimento do fungo neste meio, mais importante que o efeito geralmente destacado na literatura, que seria devido à presença de fatores de crescimento.

Apesar de os isolados UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) e UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) apresentarem maior diâmetro de colônia no meio MNM, é preciso salientar que este foi o único parâmetro de crescimento avaliado em todos os casos. Mesmo sem ter sido avaliada a produção de biomassa, foi possível verificar visualmente que o crescimento de todos os isolados testados, incluindo os MSF, foi muito menos denso no meio MNM (Figura 2.3). No caso dos solubilizadores, alguns isolados sequer esporularam neste meio.

Outra diferença entre os meios, que pode ter afetado o crescimento dos isolados, são as fontes de nitrogênio inorgânico. Enquanto o meio GEL utiliza uma fonte nítrica ( $KNO_3$ ), o MNM utiliza uma fonte amoniacal  $[(NH_4)_2HPO_4]$ . O maior crescimento dos MSF no meio GEL, que apresenta na sua composição uma fonte nítrica, vem ao encontro de resultados obtidos por outros autores, que demonstram maior crescimento dos isolados nesta fonte (DIXON-HARDY et al., 1998; SILVA FILHO & VIDOR, 2001). Para os fECM, STRZELCZYK et al. (1993) observaram maior crescimento destes em fontes amoniacais. LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES (1991), avaliando a atividade solubilizadora *in vitro* de várias espécies de fungos ectomicorrízicos, também obtiveram os melhores resultados em meio contendo essas fontes. Porém, ANDERSON, CHAMBERS, CAIRNEY (1999), testando

fontes orgânicas e inorgânicas de N sobre o crescimento de três espécies de *Pisolithus*, observaram a preferência dos fungos pelas fontes amoniacais, em detrimento das fontes nítricas. Esse resultado confere com os resultados obtidos neste ensaio, onde o comportamento de crescimento dos fECM também foi variável entre os meios testados, dependendo da espécie.



**Figura 2.3 - Aspecto de crescimento de fungos ectomicorrízicos nos meios GEL, GMM, MNM e GMA.**

Em dois casos (MSF-062 e UFSC-SC 42), o meio GMA mostrou-se prejudicial ao crescimento dos isolados. O escurecimento causado pelo crescimento dos fECM nos meios GEL, GMM, e especialmente, no GMA, pode estar relacionado à acumulação de compostos fenólicos solúveis, provavelmente devido à menor produção da enzima lacase, responsável pela polimerização desses compostos (VOIGT, OLIVEIRA, RANDI, 2000). A presença de compostos polifenólicos, produzidos especialmente sob condições de estresse, pode levar a um processo de auto-intoxicação, resultando em menor crescimento (DUPONNOIS & GARBAYE, 1990).

LAPEYRIE & BRUCHET (1985) já discutiram a hipótese de que os inóculos de fECM cultivados em meios ricos e complexos podem ser deficientes em algumas

enzimas necessárias para a colonização da planta hospedeira, demonstrando que o consumo total da glicose nesses meios acarreta uma menor viabilidade do inóculo. Mesmo não tendo sido avaliado quantitativamente, cabe registrar que comportamento semelhante foi observado no presente estudo, uma vez que os fECM, após cultivo nos meios GEL, GMM e GMA, não cresceram em repicagens posteriores à avaliação do crescimento. Tal resultado sugere que os meios GEL, GMM e GMA, embora possibilitem melhor crescimento, não são adequados à manutenção dos fECM em coleção, necessitando-se de estudos complementares.

## 2.4 - CONCLUSÕES

1. Os meios GEL e GMM são adequados aos estudos *in vitro* de cultivo simultâneo de microrganismos solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos;
2. O meio MNM não é adequado para estudos de avaliação *in vitro* do crescimento de microrganismos solubilizadores de fosfatos.

## CAPÍTULO 3

### INTERAÇÃO MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM MEIO DE CULTURA

#### 3.1 - INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos do solo são estudados por seu papel na ciclagem do fósforo. Os microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) disponibilizam os fosfatos inorgânicos insolúveis ou de baixa solubilidade e podem produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal (LEINHOS, 1994; STRZELCZYK & ROZYCKI, 1985). Os fungos ectomicorrízicos (fECM), especialmente importantes para as essências florestais, favorecem a absorção do fósforo e de outros nutrientes, podendo também atuar como solubilizadores de fosfatos (LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991).

A convivência mútua entre os microrganismos do solo é um processo dinâmico que envolve relações ecológicas positivas ou negativas. Microrganismos de vários gêneros têm sido isolados do manto ou dos esporocarpos dos fECM (BOWEN & THEODOROU, 1979; GARBAYE & BOWEN, 1987; LEYVAL & BERTHELIN, 1989). A presença de microrganismos nesses sítios indica que o estabelecimento e o funcionamento da associação ectomicorrízica são influenciados pelas interações destes com os fECM (GARBAYE, 1991).

DUPONNOIS & GARBAYE (1990) verificaram que determinados microrganismos são benéficos aos fECM, sendo denominados "*helpers*" ou auxiliares da micorrização. Bactérias auxiliares da micorrização (BAM) influenciam não apenas a sobrevivência dos fECM mas, também, a formação e o desenvolvimento das ectomicorrizas (GARBAYE, 1991). Entretanto, outros microrganismos do solo podem ter efeito negativo, inibindo o crescimento e a

colonização das raízes pelos fECM, por competição ou produção de substâncias antibióticas e fungistáticas (GARBAYE, 1991; STRZELCZYK et al., 1993).

A inoculação conjunta de MSF e fECM em essências florestais segue um caminho diverso daquele adotado no estudo de microrganismos auxiliares da micorrização. Os MSF têm sido isolados independentemente da presença das ectomicorrizas, levando em consideração a capacidade de solubilização de fosfatos. Isso não impede que os MSF, como quaisquer outros microrganismos do solo, possam interagir com os fECM. LINDERMAN (1988) sugere que a maior absorção de fósforo por plantas micorrizadas se deva, entre outros fatores, à interação dos fungos micorrízicos com microrganismos solubilizadores de fosfatos. Assim, é provável que o crescimento e a capacidade de solubilização de ambos, e a infectividade dos fECM sobre seus hospedeiros, possa ser influenciada pela inoculação conjunta.

Estudos sobre a inoculação conjunta de MSF e fECM são raros (LEYVAL & BERTHELIN, 1988; 1989). Apesar disso, essa prática pode se constituir numa importante alternativa à fertilização convencional do solo, permitindo incrementar a produção de mudas de essências florestais. Para isso, tornam-se necessários estudos sobre a compatibilidade entre esses diferentes grupos de microrganismos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar, em condições de meio de cultura, a interação entre isolados de MSF e fECM.

### **3.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

Oito isolados de MSF pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo (Tabela 3.1) e quatro fECM pertencentes ao Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC (Tabela 3.2) foram testados em dois ensaios consecutivos. O primeiro avaliou o crescimento conjunto dos isolados em meio sólido e o segundo, a capacidade e o potencial de solubilização de fosfato em meio líquido.

### 3.2.1 - Avaliação do crescimento em meio sólido

Os isolados de cada grupo foram inoculados individualmente e combinados dois a dois (1 MSF + 1 fECM), em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura, utilizando-se os meios GEL - Glicose Extrato de Levedura e GMM - Glicose Malte Médio, testados em experimento anterior (vide Capítulo 2).

**Tabela 3.1 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados do solo ou da rizosfera de cultivos de espécies vegetais perenes em Santa Catarina.**

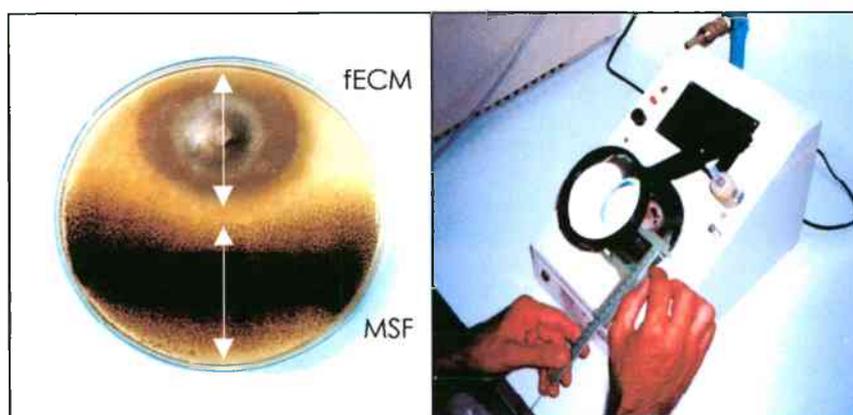
<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie vegetal</b>
MSF-189	<i>Enterobacter</i>	<i>Pinus taeda</i>
MSF-239	<i>Bacillus</i>	<i>P. taeda</i>
MSF-177	<i>Penicillium</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>
MSF-262	<i>Penicillium</i>	<i>E. grandis</i>
MSF-269	<i>Penicillium</i>	<i>P. taeda</i>
MSF-195	<i>Aspergillus</i>	<i>P. taeda</i>
MSF-251	<i>Aspergillus</i>	<i>P. elliottii</i>
MSF-310A	<i>Aspergillus</i>	<i>E. dunnii</i>

**Tabela 3.2 - Fungos ectomicorrízicos isolados de plantações florestais em Santa Catarina.**

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>
UFSC-Cg02	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr.	<i>Pinus taeda</i>
UFSC-Rh90	<i>Rhizopogon nigrescens</i> Coker & Couch	<i>P. taeda</i>
UFSC-Rh106	<i>Rhizopogon vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange	<i>P. taeda</i>
UFSC-Su155	<i>Suillus cothurnatus</i> Sing.	<i>P. taeda</i>

Os fECM foram inoculados no centro das placas, na forma de um disco de micélio (7 mm de diâmetro) obtido de cultura de 30 dias em meio MNM. Após 20-

25 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , mediu-se o diâmetro das colônias dos fECM e os MSF foram inoculados com alça de platina, em estria transversal, a 4,5 cm do centro da colônia do fECM. O inóculo dos MSF foi preparado em suspensão de células (vide Capítulo 2). O crescimento dos microrganismos foi medido aos 2, 4 e 6 após confrontação e incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os fECM foram medidos pelo diâmetro da colônia, perpendicularmente à colônia oposta. O crescimento dos MSF foi avaliado pela largura da faixa de crescimento (Figura 3.1).



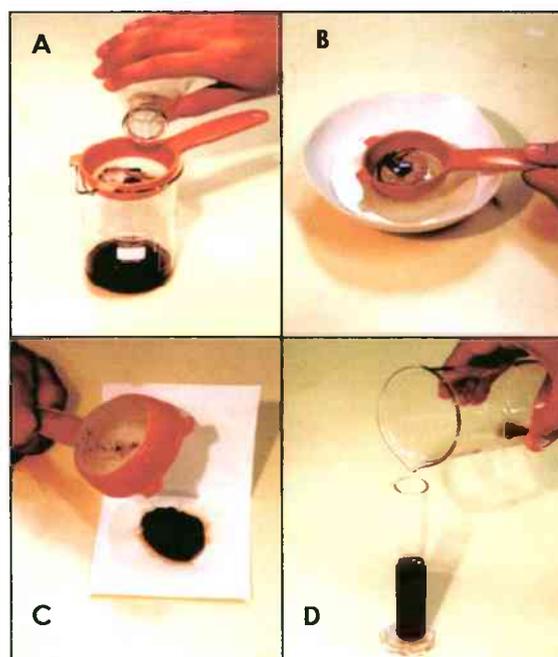
**Figura 3.1 - Forma de inoculação conjunta e medida do crescimento de fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) em meio de cultura.**

O delineamento adotado foi completamente casualizado, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.2.2 - Solubilização de fosfato em meio líquido**

Cada isolado foi inoculado individualmente e combinado dois a dois (1 MSF + 1 fECM), em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio GEL e 1 g de  $\text{P L}^{-1}$ , na forma de  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Os fECM foram inoculados através de dois discos de micélio (7 mm de diâmetro) obtidos de cultura de 30 dias em meio MNM. Após 23 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , quando todos os fECM apresentavam crescimento visível, os MSF foram inoculados adicionando-se 3 mL de suspensão celular. Após 10 dias de confrontação e incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , a biomassa fúngica foi separada do meio de cultura por peneiragem (Figura 3.2A). No cultivo simultâneo determinou-se a biomassa total, sem separação dos isolados envolvidos. A biomassa bacteriana não foi determinada. A biomassa fresca dos tratamentos contendo fungos foi lavada em água destilada para eliminação dos grânulos de fósforo (Figura 3.2B) e, posteriormente, seca a  $70^\circ\text{C}$  para determinação do peso da matéria seca (Figura 3.2C) e do fósforo imobilizado. O volume (Figura 3.2D) e o pH do meio foram medidos e, após centrifugação por 5 min a  $2.200g$ , uma alíquota de 8 ml foi armazenada a  $-18^\circ\text{C}$ , para ser submetida, posteriormente, à análise de fósforo.



**Figura 3.2 - Procedimento para separação e quantificação do micélio e do meio.**

O fósforo solúvel no meio de cultura e no micélio foi determinado de acordo com a metodologia proposta por TEDESCO et al. (1995).

O micélio seco foi triturado em moinho de facas de aço inoxidável, com peneira de orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Amostras de 0,200 g foram colocadas em tubos de vidro (250 x 22 mm) com o auxílio de um funil de haste longa. Para a digestão e extração de fósforo, foram adicionados 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e 0,7 g da mistura de digestão (100 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e 1 g de selênio, finamente moídos e misturados). Em seguida, os tubos foram colocados em bloco digestor a 160-180°C, até completa evaporação da água. A temperatura foi aumentada para 350-375°C e, após os extratos atingirem coloração amarelo-esverdeada, essa temperatura foi mantida por 1 h. Após esse período, os tubos foram retirados, resfriados e o volume completado para 50 mL, agitando-se com ar comprimido. O extrato foi transferido para frasco fechado e deixado em repouso por 12 h.

Para a determinação de fósforo, foi pipetado 1 mL de cada amostra de meio ou de extrato miceliano para copo plástico descartável, adicionando-se 2 mL de água destilada, 3 mL da solução P-B (Anexo 3) e 3 gotas da solução P-C (Anexo 4), agitando-se em seguida. Após 15 min, fez-se a leitura de absorvância a 660 nm, em espectrofotômetro. Os valores foram transformados em porcentagem de fósforo e P-total no micélio (mg), e em quantidade de P solubilizado no meio (mg L<sup>-1</sup>), utilizando-se equações de regressão, obtidas a partir da curva padrão de fósforo.

Para obtenção da curva, foram utilizadas alíquotas de 0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,5 - e 5,0 mL de uma solução padrão de fósforo (1,318g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> seco a 105°C por 2 h, dissolvido em 1 L de água destilada). A curva padrão utilizada na determinação de fósforo no micélio também foi submetida ao procedimento de extração e digestão.

O delineamento adotado foi completamente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, com desdobramento fatorial do tipo 9 X 5. As médias dos fatores (MSF e fECM) e das interações entre eles foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Análise de regressão foi aplicada entre diferentes parâmetros avaliados e a

significância do coeficiente de correlação verificada através da aplicação do teste t ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 - Avaliação do crescimento em meio sólido

As interações variaram nos dois meios testados, ocorrendo neutralismo e antagonismo (Figura 3.3). Os efeitos antagônicos foram variáveis entre os isolados, os meios de cultura e o tempo de confrontação. Pôde-se verificar maior número de efeitos significativos no meio GEL, tanto para os fECM quanto para os MSF. Todos os fECM e a maioria dos MSF apresentaram maior número de efeitos negativos aos 6 dias, razão pela qual optou-se por centrar a discussão a partir destes resultados. Os valores numéricos do crescimento conjunto são apresentados nos Anexos 5 e 6.

Analisando os dados obtidos aos 6 dias, observa-se que dentre os fECM, o isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) foi o menos afetado pela inoculação conjunta, apresentando redução do crescimento somente quando confrontado com os isolados MSF-239 (*Bacillus* sp.) e MSF-177 (*Penicillium* sp.), no meio GEL. Da mesma forma, o isolado UFSC-Cg02 foi o que menos afetou os MSF, apresentando um único caso de antagonismo, quando confrontado com o isolado MSF-195 (*Aspergillus* sp.) no meio GMM.

O isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) foi o fECM que apresentou o maior número de resultados de antagonismo mútuo nas confrontações. No meio GEL, esse isolado teve seu crescimento reduzido pela confrontação com sete MSF. Entretanto, também reduziu o crescimento de seis dos MSF. Para o isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*), houve redução do crescimento em presença do MSF-189 (*Enterobacter* sp.) no meio GMM, mas não no GEL. Neste último meio, menor crescimento foi observado nas confrontações com os isolados MSF-177, MSF-269 (*Penicillium* spp.), MSF-195, MSF-251 e MSF-310A

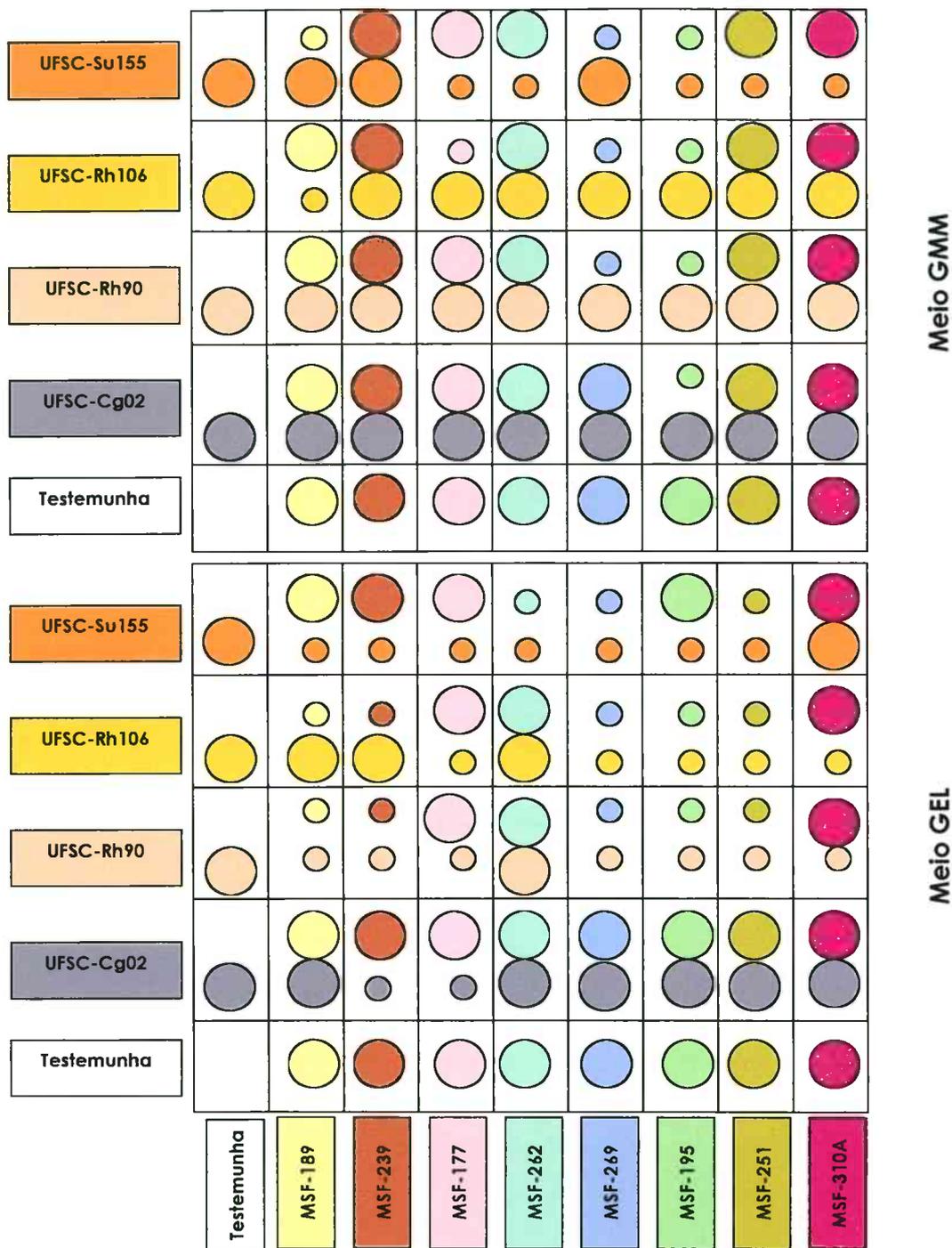


Figura 3.3 - Crescimento de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM) após 6 dias de confrontação a 25°C nos meios GEL e GMM. Esferas pequenas de uma mesma cor representam redução significativa do crescimento pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

(*Aspergillus* spp.). O UFSC-Rh106 inibiu o crescimento de cinco MSF no meio GEL e três no meio GMM.

O isolado UFSC -Su155 (*Suillus cothurnatus*) foi o fECM que mais sofreu casos de redução de crescimento pela inoculação dos MSF, nos dois meios. No meio GEL, somente o MSF-310A (*Aspergillus* sp.) não reduziu seu crescimento. No meio GMM, seu crescimento foi reduzido por cinco MSF, fato que não ocorreu com nenhum outro fECM neste meio. Por outro lado, o UFSC-Su155 foi menos agressivo do que as duas espécies do gênero *Rhizopogon*, reduzindo o crescimento de apenas três MSF nos dois meios.

Com relação aos MSF, pôde-se verificar que o fungo MSF-310A não apresentou redução de seu crescimento pela inoculação conjunta com fECM, mas reduziu o crescimento dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106 no meio GEL, e UFSC-Su155 no meio GMM. Outro isolado pouco afetado pela confrontação com fECM foi o MSF-262 (*Penicillium* sp.), que apresentou menor crescimento somente quando confrontado com o isolado UFSC-Su155, no meio GEL. Além disso, o MSF-262 foi o solubilizador que menos afetou o crescimento dos fECM, só inibindo o isolado UFSC-Su155, nos dois meios. O MSF-262, o MSF-239 e o MSF-251 tiveram seu crescimento reduzido por fECM somente no meio GEL.

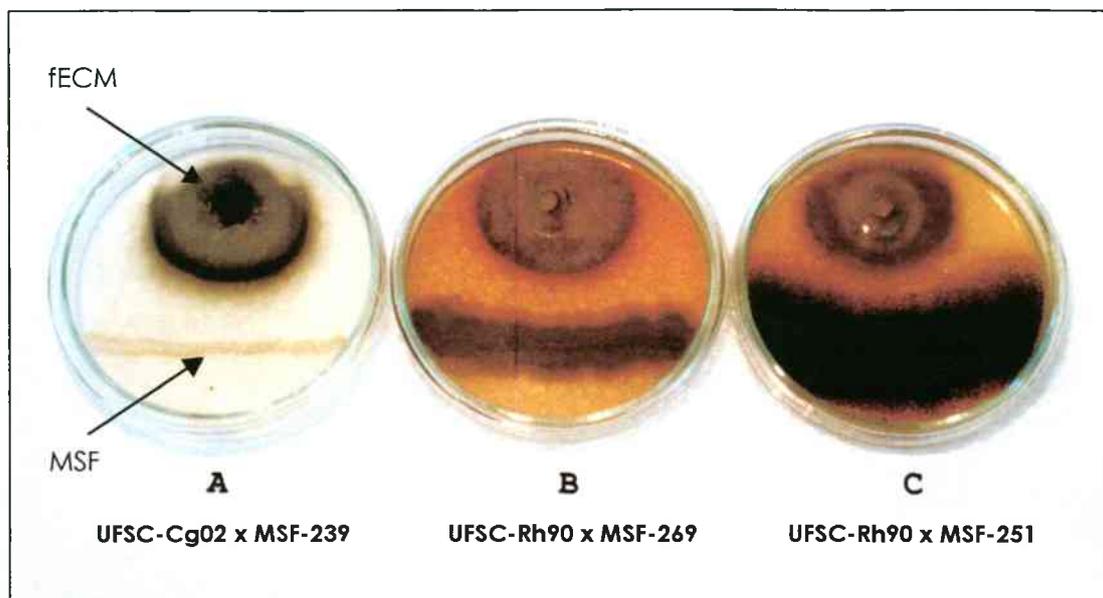
A maior frequência de efeitos antagônicos no meio GEL pode estar relacionada às diferenças nutricionais existentes entre os meios utilizados. O meio GEL, na forma utilizada neste estudo, apesar de não incluir fontes inorgânicas de fósforo solúvel, possui maior concentração de extrato de levedura, uma fonte rica em fósforo orgânico e substâncias promotoras do crescimento microbiano. Em experimento preliminar (vide Capítulo 2), verificou-se que o meio GEL possibilita maior crescimento da maioria dos isolados testados. Essa característica deve acarretar um rápido consumo de nutrientes. Assim, os efeitos antagônicos devem ter resultado da maior competição por nutrientes neste meio. Isso torna-se evidente quando se observa que os fECM que ocasionaram maior número de casos de redução de crescimento dos MSF foram os que apresentam o maior crescimento nos dois meios, como o UFSC-Rh106 e o UFSC-Rh90 (vide Anexo 5). Efeitos do meio de cultura sobre o cultivo conjunto de fECM e microrganismos do solo foram evidenciados por outros autores. BOWEN & THEODOROU (1979),

estudando as interações entre fECM e bactérias do solo, verificaram que a diminuição do crescimento de ambos foi dependente dos meios testados. STRZELCZYK et al. (1993), avaliando o crescimento de fECM em cultivo com bactérias, em três diferentes meios, observaram que o crescimento dos fungos foi mais afetado pela composição dos meios do que pela inoculação conjunta.

A competição por nutrientes não é tão evidente quando se analisa o efeito dos MSF sobre o crescimento dos fECM. Enquanto alguns isolados de crescimento intenso, como o MSF-251, inibiram e foram inibidos por alguns fECM (Figura 3.4C), outros, como o MSF-262 e o MSF-310A, pouco afetaram ou foram afetados pelo crescimento conjunto (Figura 3.3). Da mesma forma, alguns isolados de crescimento menos intenso, como a bactéria MSF-239 (Figura 3.4A) e o fungo MSF-269 (Figura 3.4B), foram capazes de inibir o crescimento dos fECM em várias confrontações, especialmente no meio GEL. Nestes casos, a ocorrência de antibiose parece ter sido o principal mecanismo de antagonismo entre os microrganismos. Essa hipótese pode ser reforçada pela observação de que o crescimento conjunto, na maioria dos casos de inibição mútua, promoveu alterações no metabolismo secundário dos fECM, que apresentaram maior escurecimento do meio de cultura (Figura 3.4B e 3.4C) ou do micélio, no lado voltado para o outro microrganismo (Figura 3.4A). É provável que esse escurecimento seja devido à produção de compostos fenólicos pelos fECM, que podem ter atuado como substâncias antibióticas ou fungistáticas aos MSF e aos próprios fECM (DUPONNOIS & GARBAYE, 1990). Diversas espécies de fECM já foram relatadas por apresentarem a capacidade de produzir substâncias antibióticas em cultura pura (RASANAYAGAM & JEFFRIES, 1992).

Embora efeitos sinérgicos não tenham sido observados, as interações que não apresentaram efeitos negativos sobre o crescimento dos microrganismos envolvidos podem ser convenientes, já que evidenciam a possibilidade de cultivo simultâneo sem prejuízo a ambos. Nesses casos, pressupõe-se que a ausência de efeitos antagônicos por competição ou antibiose, nos dois meios testados, pode ser favorável se repetida sob condições de campo. Assim, neste ensaio, foram consideradas neutras as combinações entre os isolados UFSC-Cg02 x MSF-189,

UFSC-Cg02 x MSF-262, UFSC-Cg02 x MSF-269, UFSC-Cg02 x MSF-251, UFSC-Cg02 x MSF-310A, UFSC-Rh90 x MSF-262, e UFSC-Rh106 x MSF-262.



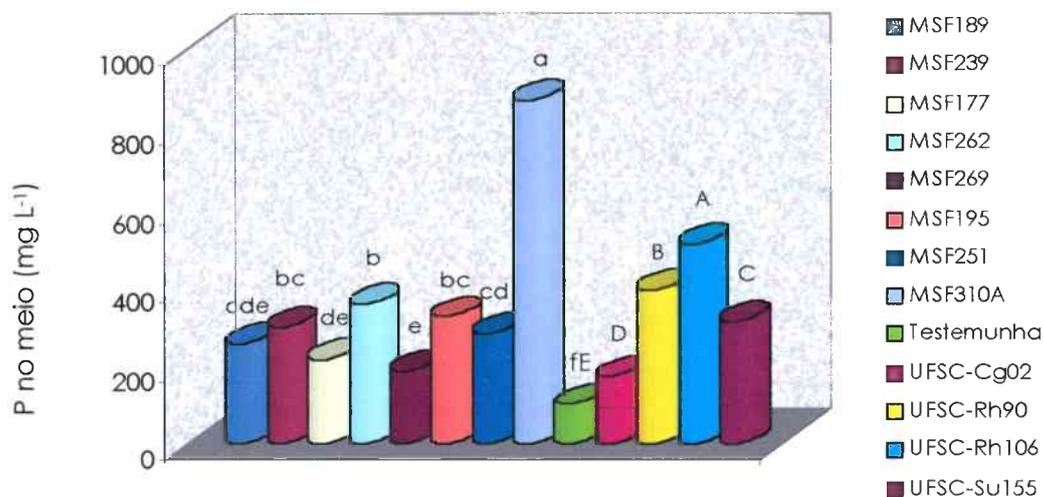
**Figura 3.4 - Aspecto de crescimento de fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF), após 6 dias de confrontação em meio GEL.**

### **3.3.2 - Avaliação do crescimento e solubilização em meio líquido**

Todos os microrganismos solubilizaram, isoladamente, quantidades significativas de fósforo no meio de cultura (Figura 3.5). Entre os MSF, os valores de P variaram entre 186 e 873 mg L<sup>-1</sup>, que correspondem a 18,6 e 87,3% do total adicionado ao meio, respectivamente. O MSF-310A apresentou o maior potencial de solubilização. Entre os fECM, os valores variaram entre 172 e 509 mg de P L<sup>-1</sup>, com o isolado UFSC-Rh106 apresentando o maior potencial de solubilização.

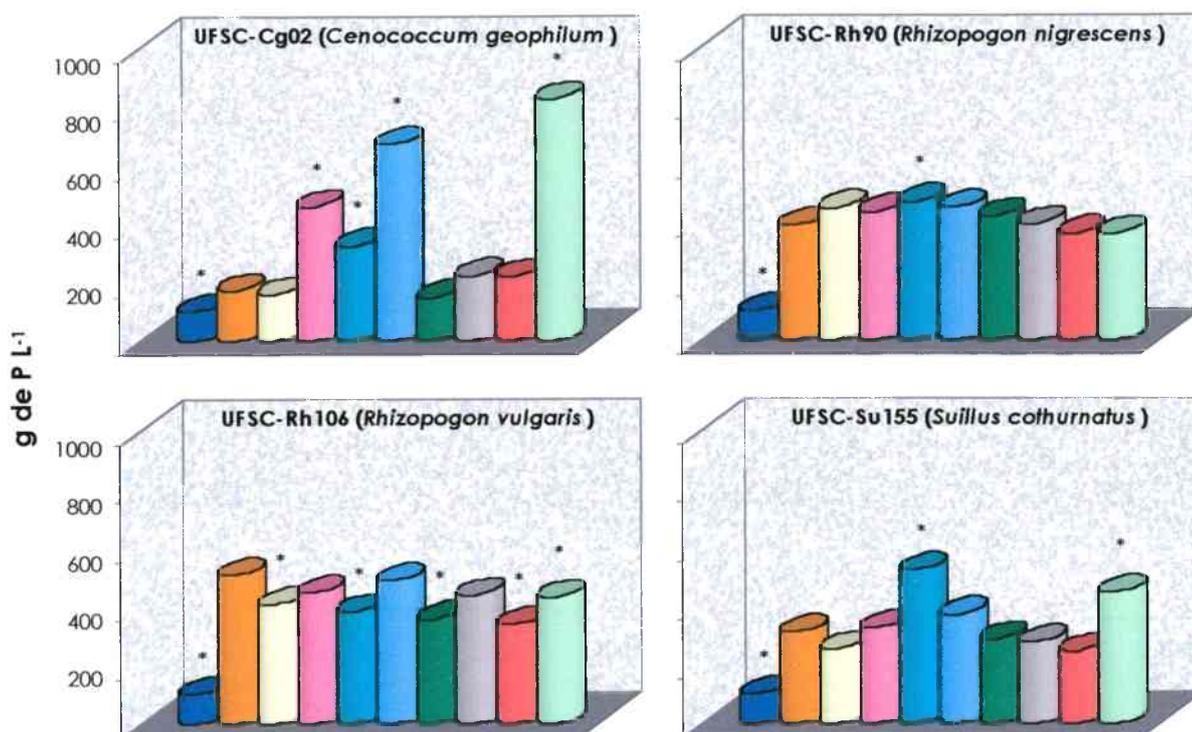
A solubilização obtida com a inoculação conjunta de MSF e fECM variou nas diferentes combinações entre isolados. Para os fECM (Figura 3.6), o UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) foi o que apresentou os melhores resultados nas

interações, pois além de não ter sofrido qualquer antagonismo, houve incremento da solubilização quando o mesmo foi cultivado com os solubilizadores MSF-239, MSF-177, MSF-262 e MSF-310A. O isolado UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*) também não apresentou interações negativas com os MSF, mas proporcionou maior solubilização de fósforo nas combinações com os isolados MSF-177 e MSF-310. O mesmo aconteceu com o UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), que apresentou incremento na solubilização somente quando cultivado com o isolado MSF-177. No caso do isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*), a maioria das interações com MSF proporcionou menor solubilização do que a obtida no cultivo isolado.



**Figura 3.5 - Quantidade de fósforo no meio GEL inoculado isoladamente com MSF e fECM. Média de três repetições. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).**

Houve efeito sinérgico sobre a quantidade de P solubilizado no meio na interação UFSC-Cg02 + MSF-262, já que a quantidade solubilizada foi superior à soma das quantidades obtidas pelos isolados em cultura pura (vide Anexo 7).



isolados e confrontações

testemunha	Cult. pura	+ MSF189	+ MSF239	+ MSF177
+ MSF262	+ MSF269	+ MSF195	+ MSF251	+ MSF310A

**Figura 3.6 - Quantidade de fósforo no meio GEL (g L<sup>-1</sup>) inoculado conjuntamente com fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF). Média de três repetições. \* Diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) em relação à cultura pura.**

Para os MSF, o cultivo conjunto com fECM apresentou resultados variáveis de solubilização, dependendo da combinação (Figura 3.7). A bactéria MSF-239 e os fungos MSF-177 e MSF-262, quando combinados com a maioria dos fECM, promoveram maior solubilização do que a obtida pelo cultivo isolado dos mesmos. Já a bactéria MSF-189 e os fungos MSF-195, MSF-251 e MSF-310A apresentaram resultados positivos quando cultivados com os fECM UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106, mas negativos com o UFSC-Cg02. O MSF-310A apresentou diminuição na solubilização de fosfato em todas as combinações com fECM. Analisando a produção de matéria seca, observa-se que as interações foram neutras ou negativas (Tabela 3.3). Em média, os fECM tiveram seu crescimento reduzido pelo cultivo com os fungos solubilizadores MSF-177 e MSF-262. O fECM UFSC-Cg02 foi o isolado que apresentou o maior número de resultados significativos nas interações com MSF. Seu crescimento foi reduzido pela inoculação com as bactérias MSF-189 e MSF-239 e com o fungo MSF-177. Nas demais combinações deste fECM, os valores foram superiores ao obtido pela cultura pura do mesmo. Os outros fECM foram pouco afetados pelo crescimento simultâneo.

**Tabela 3.3 - Produção de matéria seca (g) de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias.**

	Sem MSF	fECM*					Média
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
MSF	189	N.D.	0,15 cdD	0,24 abB	0,29 abA	0,21 bcC	0,22 bd
	239	N.D.	0,16 cD	0,24 abB	0,27 bcA	0,21 bcC	0,22 bd
	177	0,10 cdC	0,12 dC	0,19 cB	0,25 cA	0,18 cdB	0,17 f
	262	0,09 dD	0,34 aA	0,18 cC	0,25 cB	0,17 dC	0,21 ce
	269	0,20 bD	0,34 aA	0,21 bcD	0,28 bcB	0,24 abC	0,26 ab
	195	0,13 cD	0,32 aA	0,24 abB	0,32 aA	0,21 bcC	0,24 bc
	251	0,09 dD	0,32 aA	0,23 abC	0,29 abB	0,22 bcC	0,23 bd
	310A	0,28 aBC	0,35 aA	0,25 aD	0,29 abB	0,26 aC	0,29 a
	Média	0,15 C	0,27 A	0,22 B	0,28 A	0,22 B	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

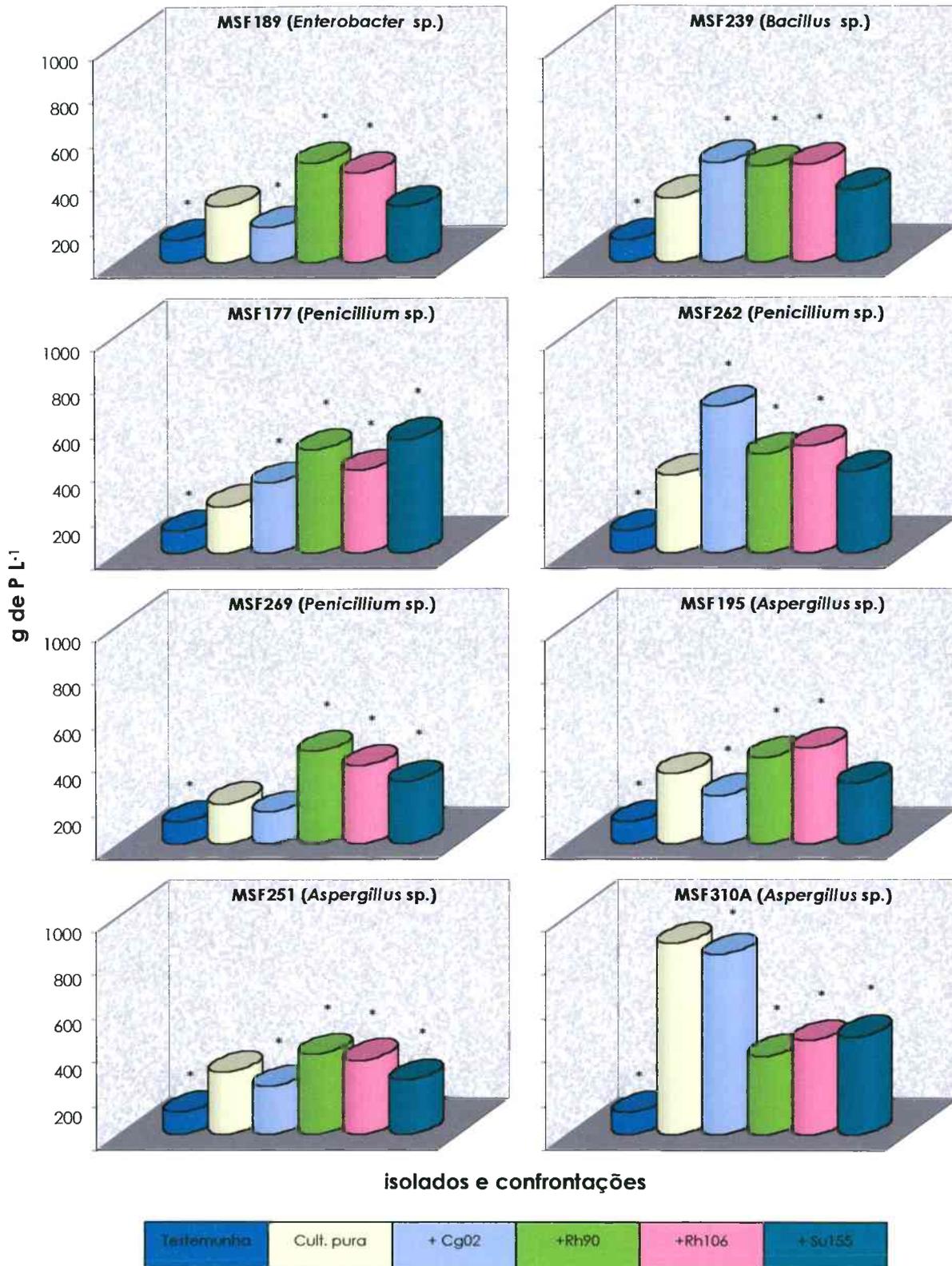


Figura 3.7 - Quantidade de fósforo no meio GEL (g L<sup>-1</sup>) inoculado conjuntamente com MSF e fECM. Média de três repetições. \* Diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) em relação à cultura pura.

Não houve correlação entre a produção de matéria seca no meio GEL líquido e o diâmetro das colônias aos 6 dias de confrontação em placa de Petri contendo meio GEL, discutido no item 3.3.1.

Também não houve correlação significativa entre a quantidade de fósforo solubilizado no meio e a porcentagem de fósforo no micélio. A porcentagem foi variável entre os isolados e interações (Tabela 3.4). Quando cultivados isoladamente, os fECM apresentaram uma média de 1,93% de P no micélio, contra 1,14% nos MSF. Em média, o UFSC-Cg02 apresentou a maior % de P no micélio seco, entre os fECM, inclusive nas interações, seguido pelos isolados UFSC-Rh106, UFSC-Rh90 e UFSC-Su155, por ordem decrescente. A inoculação com a bactéria MSF-189 (*Enterobacter* sp.), proporcionou um aumento na porcentagem média de P dos fECM para 2,84%. Porém, a inoculação com os fungos MSF-262 (*Penicillium* sp) e MSF-195 (*Aspergillus* sp.), fez a média dos fECM cair para valores inferiores, de 1,34 e 1,35%, respectivamente.

**Tabela 3.4 - Porcentagem de fósforo (%P) na matéria seca de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias.**

		fECM*					
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	Média
MSF	Sem MSF	-	3,13 cA	1,66 bB	1,85 aB	1,08 bC	1,93 bc
	189	N.D.	5,04 aA	2,08 aB	2,21 aB	2,02 aB	2,84 a
	239	N.D.	3,71 bA	1,96 abB	2,02 aB	1,94 aB	2,41 b
	177	2,02 aB	2,75 dA	0,67 cD	1,37 bC	1,88 aB	1,74 cd
	262	0,85 cC	2,49 deA	0,90 cC	2,11 aB	0,36 cD	1,34 e
	269	1,37 bB	1,99 fgA	1,86 abA	1,92 aA	2,01 aA	1,83 cd
	195	0,14 deD	2,17 efA	2,05 aA	1,89 aB	0,51 cC	1,35 e
	251	0,46 dC	2,11 fA	1,83 abB	1,88 aB	1,80 aB	1,62 ce
	310A	1,98 aA	1,69 gB	1,76 abB	1,88 aAB	1,99 aA	1,86 cd
	Média	1,14 D	2,78 A	1,64 C	1,90 B	1,51 C	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

A interação UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) + MSF-189 (*Enterobacter* sp.) apresentou 5,04% de P na biomassa, o maior valor dentre todos os obtidos pelos isolados e interações. Entretanto, em alguns casos, os valores podem ter sido superestimados em função da pequena quantidade de micélio utilizada na amostragem. A interação deste fECM com a bactéria MSF-

239 (*Bacillus* sp.) também apresentou uma porcentagem de P na biomassa superior à obtida no fungo cultivado isoladamente. Por outro lado, todas as outras combinações de MSF com o UFSC-Cg02 apresentaram valores inferiores aos obtidos pelo cultivo isolado do mesmo.

O isolado UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*) também apresentou mudanças significativas na porcentagem de P na biomassa, em todas as combinações com MSF. Porém, ao contrário do UFSC-Cg02, a maioria das interações foi positiva. Somente as combinações com os isolados MSF-262 e MSF-195 apresentaram valores inferiores ao obtido pela cultura pura desse fECM.

As combinações de MSF com o UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), quando comparadas à cultura pura do fECM, apresentaram maior porcentagem de P na biomassa conjunta nas interações com os solubilizadores MSF-189 e MSF-195, porém menor com o MSF-177 e MSF-262. A porcentagem de P no micélio do isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) foi pouco afetada pela inoculação conjunta. Somente a combinação com o isolado MSF-177 apresentou valores inferiores ao obtido com a cultura pura.

A quantidade total de fósforo na matéria seca dos isolados (Tabela 3.5) apresentou alguns resultados semelhantes aos observados na porcentagem de P. Na média, os isolados MSF-177 e MSF-262 foram os que mais diminuíram a absorção de P pelos fECM, resultado que repete a tendência observada quanto à porcentagem de P. Da mesma forma, o isolado UFSC-Cg02 foi o fECM mais afetado pela inoculação dos MSF, reduzindo a quantidade de P absorvido na maioria das interações. Por outro lado, algumas diferenças em relação à porcentagem de P foram detectadas. Observa-se, por exemplo, que as interações dos fECM com as bactérias MSF-189 e MSF-239 foram positivas em quase todos os casos, com exceção da combinação UFSC-Cg02 + MSF-239. Quando se considera o P imobilizado (Tabela 3.5) em relação ao solubilizado no meio (Anexo 7), verifica-se que, entre os MSF, esta quantidade representa 0,05 a 1,47% do total. Os isolados que apresentam os menores valores são o MSF-195, com 0,05%, o MSF-251, com 0,15% e o MSF-262, com 0,2%. Para os fECM, esses valores variaram entre 0,8 (UFSC-Rh106) e 5% (UFSC-Cg02).

**Tabela 3.5 - Quantidade total de fósforo (mg) na matéria seca de MSF e fECM cultivados em meio GEL a 25°C por 15 dias.**

	Sem MSF	fECM*					Média
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
	-	8,64 aA	3,54 bC	5,06 bB	2,59 dD	4,96 ab	
MSF	189	N.D.	7,44 bcA	4,91 aC	6,37 aB	4,30 acC	5,76 a
	239	N.D.	5,95 dA	4,74 aB	5,51 abA	4,08 bcB	5,07 ab
	177	2,00 bB	3,41 eA	1,32 cB	3,42 cA	3,35 cdA	2,70 e
	262	0,74 cD	8,53 abA	1,65 cC	5,15 bB	0,61 eD	3,34 de
	269	2,74 bE	6,93 cdA	3,88 abD	5,38 abB	4,90 abC	4,77 ac
	195	0,18 cE	6,90 cdA	4,94 aC	6,10 abB	1,07 eD	3,84 cd
	251	0,42 cD	6,77 cdA	4,20 abC	5,39 abB	3,95 bcC	4,15 bd
	310A	5,57 aA	5,88 dA	4,33 abB	5,47 abA	5,26 aA	5,30 a
	Média	1,94 D	6,72 A	3,72 C	5,32 B	3,35 C	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

Os fECM, assim como a maioria dos MSF, quando cultivados isoladamente, promoveram uma acidificação do meio de cultura (Tabela 3.6). Entre os MSF, os valores de pH variaram entre 5,56 e 6,81. Entre os fECM, esses valores variaram entre 5,31 e 6,53.

**Tabela 3.6 - pH do meio GEL inoculado com MSF e fECM e incubado a 25°C por 15 dias.**

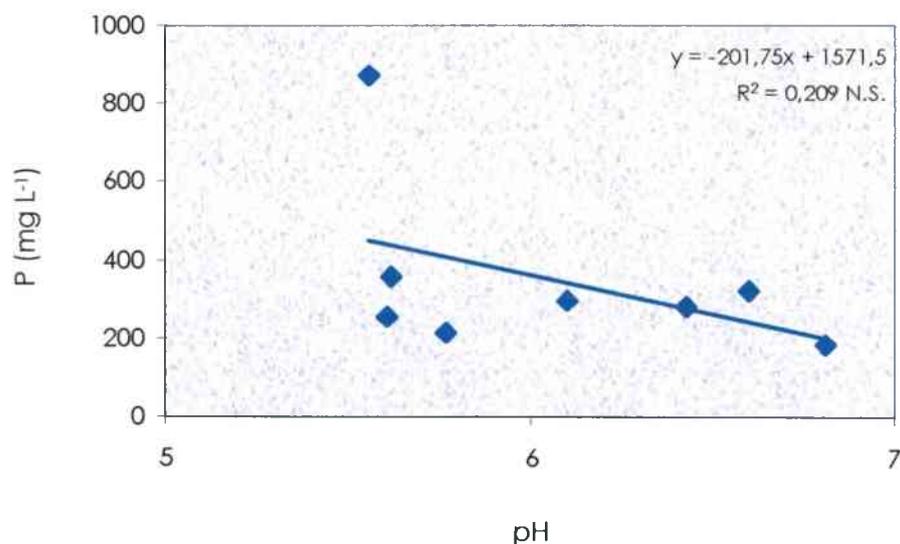
	Sem MSF	fECM*					Média
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
	6,96 aA	6,34 cBC	6,28 bC	5,31 eD	6,53 cB	6,28 d	
MSF	189	5,61 eE	7,18 bB	6,61 aC	6,30 cdD	7,64 aA	6,67 c
	239	6,10 cC	5,66 dD	6,62 aB	6,05 dC	7,19 bA	6,32 d
	177	5,77 deC	5,68 dC	6,20 bB	6,94 aA	6,14 dB	6,14 d
	262	5,62 eC	5,20 eD	6,86 aA	6,53 bcB	6,43 cdB	6,13 d
	269	6,81 aC	7,29 abB	6,63 aC	6,79 abC	7,61 aA	7,13 a
	195	6,60 abC	7,45 abA	6,63 aC	6,17 dD	7,22 bB	6,81 bc
	251	6,43 bC	7,58 aA	6,71 aB	6,78 abB	7,43 abA	6,98 ab
	310A	5,56 eC	5,89 dB	6,64 aA	6,59 bcA	6,54 cA	6,24 d
	Média	6,16 C	6,47 B	6,58 B	6,38 B	6,97 A	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

Quando cultivados simultaneamente, os MSF e fECM apresentaram uma mudança de comportamento em relação ao pH final do meio. As únicas combinações que apresentaram acidificação, quando comparadas às culturas

puras dos MSF, foram os cultivos simultâneos dos isolados UFSC-Cg02 + MSF-239 e UFSC-Cg02 + MSF-262. De modo geral, observa-se que, na maioria das interações, o cultivo simultâneo promoveu uma elevação do pH, quando comparado aos valores obtidos pelas culturas puras. Todas as interações com os solubilizadores MSF-189, MSF-269, MSF-195 e MSF-251 apresentaram elevação do pH do meio, quando comparadas às culturas puras dos fECM. Isso também aconteceu com os isolados UFSC-Rh106 e UFSC-Rh90, onde não ocorreu nenhum caso de acidificação nas interações com MSF, e os valores de pH variaram entre 6,20 e 6,96. Nas interações com o isolado UFSC-Su155, houve elevação do pH para valores superiores a 7,0 em cinco casos. A acidificação do meio só aconteceu num único caso, em presença do isolado MSF-177. Nas interações do UFSC-Cg02 com MSF, em 50% dos casos ocorreu elevação do pH para valores superiores a 7,0, havendo diminuição para valores abaixo de 6,0 nos outros 50%.

Não houve correlação significativa entre os valores de pH no meio e a quantidade de P solubilizado pelos MSF em cultura pura (Figura 3.8). O mesmo comportamento foi observado nos resultados obtidos com o cultivo dos fECM (Figura 3.9).



**Figura 3.8 - Análise de regressão entre fósforo e pH do meio GEL inoculado com MSF isoladamente. N.S.: coeficiente não significativo.**

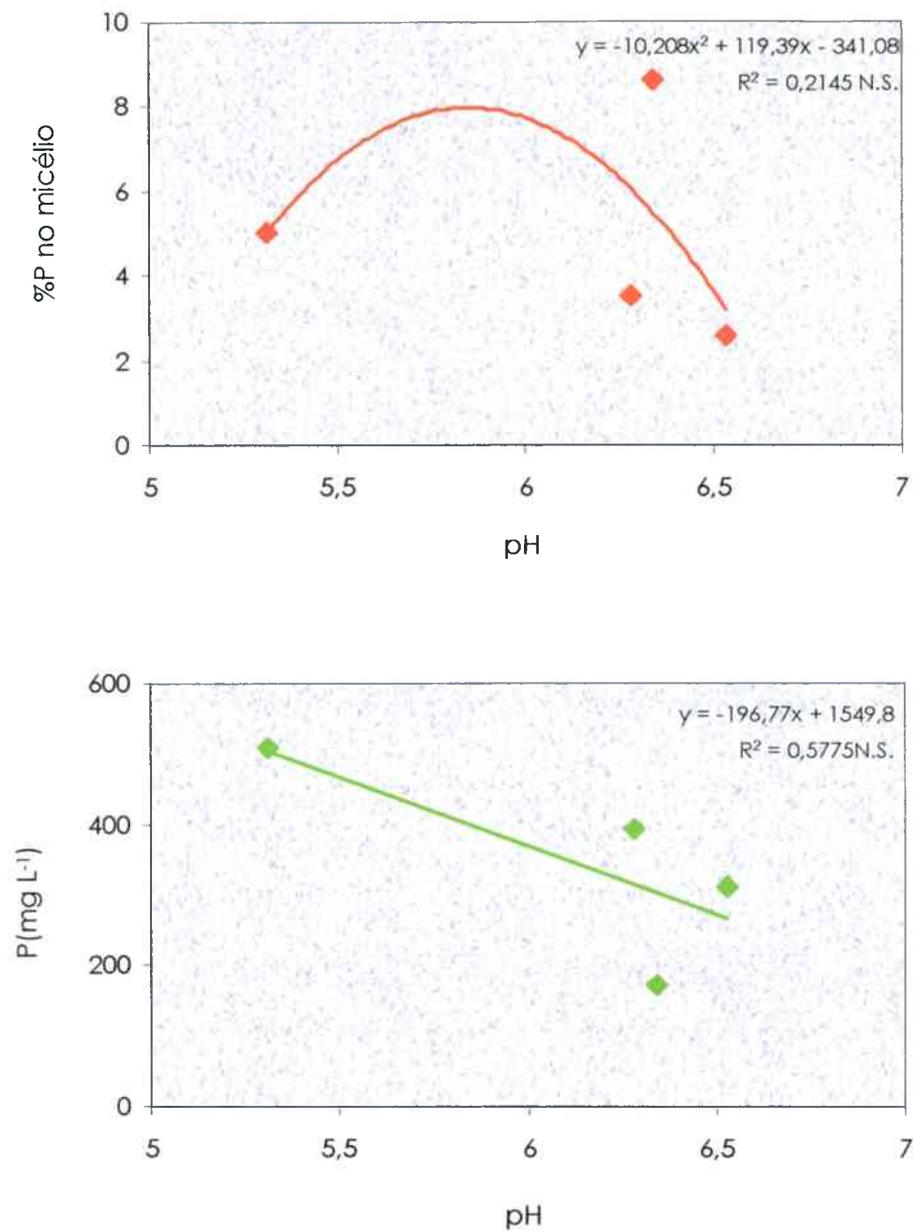


Figura 3.9 - Análise de regressão entre a porcentagem de P, quantidade total de P e pH do meio GEL inoculado com fECM isoladamente. N.S.: coeficiente não significativo.

Comparando-se os diferentes grupos e gêneros de MSF, percebe-se uma grande variação quanto à capacidade de solubilização. O melhor desempenho do isolado MSF-310A não foi acompanhado por outros isolados do gênero *Aspergillus* (MSF-195 e MSF-251). SILVA FILHO, NARLOCH, SCHARF (2000), testando a capacidade de solubilização de fosfatos de rocha por diversos isolados desta coleção, também observaram o mais alto potencial de solubilização pelo isolado MSF-310, que apresentou uma média de 263 mg de P L<sup>-1</sup>. No entanto, isolados do mesmo gênero apresentaram potencial inferior.

Outros autores revelam capacidade variável entre isolados de diferentes gêneros. ARORA & GAUR (1979) e KUCEY (1983), avaliando a capacidade de solubilização em meio de cultura, observaram que os fungos são mais eficientes do que as bactérias. Porém, SILVA FILHO (1998) avaliando isolados de diferentes gêneros, não obteve a mesma tendência. Para os fungos, CHHONKAR & SUBBARAO (1967) observaram que *Penicillium lilacinum* é mais eficiente do que as espécies de *Aspergillus*. Entretanto, AGNIHOTRI (1970), ARORA & GAUR (1979) e BANIK & DEY (1982), constataram que espécies do gênero *Aspergillus*, neste aspecto, são mais ativas do que as do gênero *Penicillium*.

Essas controvérsias podem ser devidas à metodologia adotada para a comparação do potencial de solubilização dos isolados. SILVA FILHO & VIDOR (2000), estudando a solubilização de fosfatos por 57 isolados de diferentes gêneros, inclusive alguns testados neste estudo, optaram por avaliar o potencial de solubilização em meio sólido, através de uma relação entre a área do halo de solubilização e o diâmetro da colônia. Através dessa metodologia, observaram que os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam potencial de solubilização inferior aos do gênero *Penicillium*. Os autores sugerem que as avaliações em meio líquido ou em área solubilizada apresentam tendência de favorecimento às espécies com alta velocidade de crescimento em meio de cultura, como as de *Aspergillus* e *Rhizopus*, em detrimento daquelas que têm menor crescimento, como as de *Penicillium* e *Paecilomyces*.

A hipótese de SILVA FILHO & VIDOR (2000) é confirmada através dos resultados obtidos pelos MSF testados neste estudo. Observa-se que o isolado MSF-310A (*Aspergillus* sp.), que apresentou o maior potencial de solubilização em

meio líquido (Figura 3.5), é o que demonstrou a maior produção de biomassa dentre os MSF (Tabela 3.3). Assim, relacionando-se os valores de produção de matéria seca das culturas puras (Tabela 3.3) com as respectivas quantidades de fósforo no meio GEL (Anexo 7), observa-se uma mudança na avaliação do potencial dos isolados. O potencial do MSF-262 (*Penicillium* sp.) ultrapassa o do MSF-310A (*Aspergillus* sp.), já que cada grama de micélio do primeiro tem potencial para solubilizar até 3,94 g de P L<sup>-1</sup>, contra os 3,11 g L<sup>-1</sup> do segundo isolado.

Dentre os fECM, a relação entre a solubilização e a maior produção de matéria seca foi confirmada apenas parcialmente, para o isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*). Porém, não se confirma pelo isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) que, apesar de apresentar um valor de produção de matéria seca semelhante ao obtido pelo UFSC-Rh106 (Tabela 3.3), não apresentou valores semelhantes de solubilização (Anexo 7). Essa diferença de comportamento de solubilização pelos fECM, em relação aos MSF, abre a perspectiva de que os mecanismos de solubilização dos primeiros não dependam da quantidade da substância solubilizadora envolvida, mas de sua afinidade pelo fosfato de cálcio. Não se descarta a hipótese de que a solubilização de fosfato apresentada por esse isolados tenha sido devida à produção de compostos fenólicos, que podem ter atuado como quelantes ou complexantes (WATTEAU & BERTHELIN, 1990; KOIDE, SUOMI, BERGHAGE, 1998), que apresentam alta afinidade pelo Ca, liberando o fosfato. HASELWANDTER & WINKELMANN (2002) observaram que *Cenococcum geophilum*, cultivado em meio com baixa concentração de Fe, produz ferricrocina, um sideróforo. Outra possibilidade é o consumo do cálcio na nutrição microbiana, que liberaria o fósforo da fonte utilizada (SILVA FILHO & VIDOR, 2001).

Apesar de os isolados de *Rhizopogon* (UFSC-Rh106 e UFSC-Rh90) terem apresentado os maiores valores de P solubilizado no meio de cultura, também não fica clara uma diferença entre gêneros, já que entre as duas espécies deste gênero houve uma superioridade do *R. vulgaris* (UFSC-Rh106). Assim, a capacidade e o potencial de solubilização de fosfatos parecem ser regulados geneticamente e expressos em situações nutricionais e ambientais específicas

(NAHAS & ASSIS, 1992a; SILVA FILHO & VIDOR, 2001). Isso se torna claro pelo fato de que muitos microrganismos do solo perdem a capacidade de solubilização de fosfatos quando mantidos em meios de cultura, ou na presença de altas concentrações de fósforo solúvel (CHHONKAR & SUBBA-RAO, 1967; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991). Portanto, os resultados controversos entre os diferentes autores podem ainda ser um reflexo das diferentes condições em que os microrganismos foram isolados, mantidos e testados, ou simplesmente dos diferentes isolados estudados em cada caso.

A observação da capacidade de solubilização de fosfatos pelos fECM é relativamente recente (LEYVAL & BERTHELIN, 1986; LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES, 1991) quando comparada aos relatos envolvendo microrganismos de vida livre. Embora o incremento na concentração de P nas plantas colonizadas por fECM seja relacionada, na maioria dos estudos, ao aumento da superfície de absorção das raízes, proporcionado pelo crescimento das hifas no solo (PETERSON, PICHÉ, PLENCHETTE, 1984; SMITH & READ, 1997), inúmeros autores vêm destacando uma importante ação de fECM na biodegradação e solubilização de diversos minerais (AROCENA & GLOWA, 2000; BREEMEN, LUNDSTRÖM, JONGMANS, 2000; BREEMEN et al., 2000; WALLANDER, 2000; LANDEWEERT et al., 2001). Os resultados deste estudo, onde os dois fECM (UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106) apresentaram valores de solubilização superiores aos obtidos pela maioria dos MSF, vêm corroborar as observações de estudos anteriores. Assim, muito mais do que favorecer a absorção de P, os fECM podem apresentar grande potencial de solubilização de fosfatos.

A ausência de correlação entre o pH e a quantidade de P solubilizado pelos isolados em cultura pura, demonstra que o aumento da concentração de  $H^+$  no meio não foi o único mecanismo envolvido na solubilização. LEYVAL & BERTHELIN (1989) e GOMES, OLIVEIRA, SILVA FILHO (1992), estudando a solubilização de fosfatos por fECM, também não encontraram essa correlação. Alguns autores sugerem que a quantidade de ácidos orgânicos não é o principal fator envolvido no processo de solubilização (ILLMER & SCHINNER, 1992; NAUTIYAL et al., 2000). Em alguns casos, a natureza do ácido é mais importante do que a

quantidade (AGNIHOTRI, 1970). Isso acontece justamente porque alguns ácidos orgânicos podem agir como quelantes ou complexantes.

ILLMER & SCHINNER (1992), após detectar apenas três ácidos orgânicos produzidos por bactérias solubilizadoras de fosfatos, sugeriram que a acidificação do meio pode se dar também através da liberação de prótons  $H^+$  do citoplasma para a superfície externa da membrana plasmática, em mecanismos de troca de cátions, especialmente a partir da assimilação de  $NH_4^+$ . Entretanto, como neste trabalho não houve correlação entre a solubilização e a diminuição do pH do meio, outros mecanismos de disponibilização do fósforo devem estar envolvidos. Entre as inúmeras possibilidades, as mais prováveis são a produção de compostos quelantes e complexantes e o consumo de Ca pelo microrganismo.

Quanto ao Ca, SILVA FILHO & VIDOR (2001) observaram que baixas concentrações inibem o crescimento de MSF, especialmente dos isolados que normalmente apresentam crescimento intenso, como os fungos do gênero *Aspergillus*. Isso acontece porque esse elemento é essencial à atividade enzimática e à estrutura das membranas (GRIFFIN, 1994). Por outro lado, o baixo suprimento de Ca estimulou a solubilização de fosfatos, inclusive pelo isolado MSF-310A. Os autores sugerem que em baixos teores desse nutriente, seu consumo microbiano pode resultar na dissolução do fosfato de Ca. Assim, neste estudo, o consumo de Ca pode ter sido um dos principais mecanismos de disponibilização de P, especialmente pelo isolado MSF-310A.

Outra possibilidade, para todos os isolados testados, é a produção de fosfatases que, mesmo a um custo energético elevado, podem ter atuado sobre o fósforo orgânico existente no extrato de levedura, um dos principais componentes do meio GEL. NAHAS & ASSIS (1992b) observaram que *Aspergillus niger*, cultivado em meio sem adição de fosfato inorgânico, sintetizava fosfatase ácida. No entanto, a adição de fosfato inorgânico na sua forma insolúvel reprimia a enzima devido à solubilização da apatita, enquanto a adição de fosfato solúvel inibia a solubilização. Assim, como neste estudo o fosfato insolúvel foi adicionado, trata-se de uma hipótese pouco provável.

O maior potencial de solubilização obtido pelos isolados de MSF e fECM em cultura pura nem sempre estabelece respostas semelhantes nos cultivos

simultâneos. Isolados como o UFSC-Rh106 e o MSF-310A, com alto potencial de solubilização quando cultivados isoladamente (Figura 3.5), apresentaram valores menores de P nas interações (Figuras 3.6 e 3.7). Isso acontece porque esse potencial pode ter sido ocultado pela presença do outro isolado ou, em alguns casos, até inibido, como pode-se perceber no cultivo conjunto desses dois isolados.

O efeito sinérgico na interação UFSC-Cg02 + MSF-262, onde a quantidade de fósforo solubilizado conjuntamente foi superior à soma obtida pelos isolados em cultura pura (Anexo 7), pode ter sido proporcionado pela produção de substâncias promotoras que favoreceram a solubilização simultânea ou de sinais moleculares específicos (GOLDSTEIN, BRAVERMAN, OSORIO, 1999), que regulam e estimulam a solubilização (NAHAS & ASSIS, 1992a). Neste caso, a interação entre os dois isolados tem relação com os dados obtidos sobre o crescimento em meio sólido (vide item 3.3.1).

As interações UFSC-Rh90 + MSF-177, UFSC-Su155 + MSF-177, mesmo sem efeito sinérgico claro, também apresentaram um comportamento aditivo na solubilização de fosfatos. Porém, são isolados que, no teste de crescimento conjunto em meio sólido, haviam inibido ou sido inibidos em diversas interações. Assim, é provável que o estresse nutricional ocorrido pela competição por nutrientes, nesses casos, tenha atuado como um sistema de estímulo à solubilização, justamente para compensar essa deficiência.

Inferências na comparação entre dados de diferentes parâmetros abrem outras possibilidades de análise sobre o estabelecimento de interações entre os isolados testados. A diminuição da porcentagem de P e da quantidade absorvida na matéria seca dos cultivos simultâneos, por exemplo, quando comparados aos valores obtidos pelas culturas puras dos fECM, não são, necessariamente, aspectos negativos. Apesar de as interações UFSC-Cg02 + MSF-310A e UFSC-Cg02 + MSF-262 apresentarem menores valores de porcentagem e quantidade de P na matéria seca, houve grande solubilização de P no meio líquido que, se repetido em experimentos a campo, pode ser uma vantagem considerável às plantas inoculadas.

O estudo das possíveis interações entre microrganismos do solo é extremamente complexo e dinâmico. Quando se relacionam os efeitos da inoculação conjunta sobre o crescimento dos isolados e a solubilização, a definição de uma interação positiva ou negativa parte de critérios subjetivos, pois depende dos parâmetros avaliados. Uma interação fECM-MSF considerada negativa para o crescimento dos isolados, pode ser positiva para o parâmetro de solubilização. Neste caso, estudos complementares são necessários para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos.

### 3.4 - CONCLUSÕES

1. Não há interações sinérgicas sobre o crescimento dos isolados em meio de cultura;
2. Os principais mecanismos de antagonismo nas interações MSF-fECM são a competição e a antibiose;
3. Todos os MSF e fECM apresentam capacidade e potencial de solubilização de fosfato, em cultura pura;
4. Não há correlação entre os valores de fósforo solubilizado e o pH, o que sugere que a acidificação não é o único mecanismo envolvido na solubilização do fosfato de cálcio;
5. Não há relação entre a solubilização de fosfato e os gêneros de microrganismos;
6. O isolado MSF-262 (*Penicillium* sp.) apresentou os melhores resultados de crescimento e solubilização em meio de cultura, nas interações com fECM;
7. O isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) é o melhor adaptado ao crescimento e à solubilização em meio de cultura, nas interações com MSF;
8. A interação UFSC-Cg02 + MSF-262 apresenta efeito sinérgico sobre a solubilização de fosfato em meio de cultura;
9. Para o cultivo simultâneo e solubilização de fosfato, são consideradas adequadas as combinações entre os isolados UFSC-Cg02 + MSF-262, UFSC-

Cg02 + MSF-239, UFSC-Cg02 + MSF-310A, UFSC-Rh90 + MSF-177, UFSC-Su155 + MSF-177 e UFSC-Su155 + MSF-310A.

## CAPÍTULO 4

### INOCULAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM MUDAS DE *Pinus taeda* L.

#### 4.1 - INTRODUÇÃO

O estudo de processos biotecnológicos, economicamente viáveis, que incrementem a produtividade e a lucratividade das florestas de pinus, pode contribuir para a preservação das áreas com espécies nativas e evitar o avanço em áreas próprias para o cultivo de alimentos. A inoculação de fungos ectomicorrízicos (fECM) e de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) pode estimular o crescimento das plantas, não apenas pela disponibilização do fósforo, mas também pela maior absorção deste elemento nas associações ectomicorrízicas.

A interação dos fECM com outros microrganismos do solo pode ser benéfica, favorecendo o estabelecimento da associação ectomicorrízica (DUPONNOIS & GARBAYE,1990; GARBAYE,1991). A associação entre os mecanismos de disponibilização de fósforo no solo, proporcionados pelos MSF, à otimização da absorção, proporcionada pelos fECM, pode contribuir de forma decisiva no suprimento deste elemento para as plantas. No entanto, a maioria dos estudos envolvendo microrganismos auxiliares da micorrização se limitam às interações entre fECM e bactérias isoladas da micorrizosfera. São escassos os estudos de inoculação conjunta de MSF e fECM em essências florestais (LEYVAL & BERTHELIN, 1988; 1989). Pouco se sabe sobre a existência de relações entre estudos em meio de cultura com os estudos envolvendo plantas.

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da interação entre isolados de MSF e fECM sobre o crescimento e absorção de fósforo de mudas de *Pinus taeda* L., em condições de casa-de-vegetação, e avaliar a

existência de correlações com os dados de crescimento e solubilização de fosfatos obtidos em experimento anterior, em meio de cultura.

## **4.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 - Microorganismos e produção do inóculo**

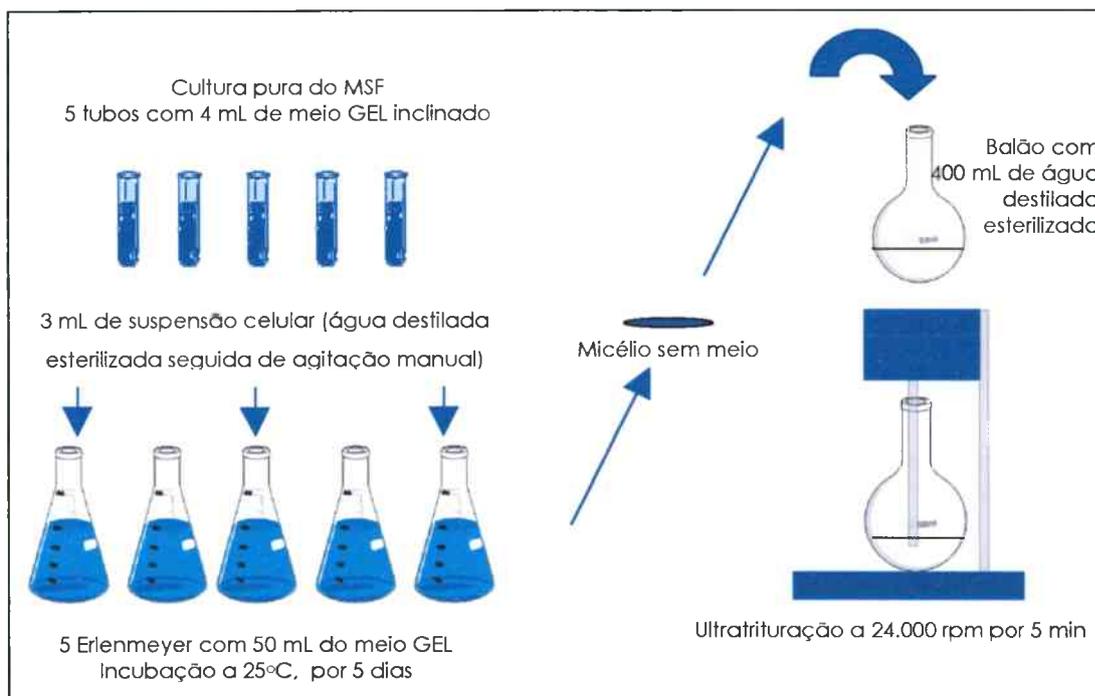
Foram avaliados neste estudo os mesmos fECM e MSF testados na interação em meio de cultura (vide Capítulo 3).

Para a produção do inóculo, cada isolado de MSF foi cultivado por 5 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  em 50 mL do meio GEL, em cinco frascos Erlenmeyer (250 mL), previamente esterilizados (Figura 4.1). Em cada frasco foram adicionados 3 mL de suspensão celular obtida pela lavagem de culturas em meio sólido (vide Capítulo 2).

Passado esse período, as culturas dos fungos foram filtradas, adicionadas a um frasco Erlenmeyer (500 mL) contendo 400 mL de água destilada esterilizada e submetidas à trituração (5 min - 24.000 rpm). As bactérias foram separadas do meio líquido por centrifugação (5 min - 2.200 g) e ressuspendidas em 400 mL de água destilada esterilizada. Nos dois casos, a quantidade de propágulos de MSF por volume de inóculo foi quantificada pela técnica das diluições sucessivas e contagem de colônias em placas de Petri, após 72 h de incubação em meio GEL a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Durante o período necessário à incubação para o procedimento de contagem, o inóculo foi mantido sob refrigeração. Após esse período, nova diluição e contagem foi realizada para determinar a taxa de viabilidade. O aspecto das culturas de MSF e o inóculo pronto podem ser observadas na Figura 4.2.

O inóculo dos fECM foi produzido adaptando-se a metodologia descrita para os fungos MSF. Cada isolado foi cultivado em 50 mL de meio MNM, em cinco frascos Erlenmeyer (250 mL), previamente esterilizado. Em cada frasco foram adicionados 3 discos de micélio (7 mm de diâmetro) obtidos de cultura de

30 dias em meio MNM e avaliados previamente quanto à viabilidade e ausência de contaminações. Após incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 20 dias, as cinco culturas foram adicionadas a 400 mL de meio agar/água semi-sólido (0,3% de agar) e submetidas à trituração por 5 s em liquidificador esterilizado. Devido às características de crescimento dos fECM, não foram realizados procedimentos de padronização do inóculo. Assim, optou-se por determinar a massa de matéria seca por volume de inóculo.



**Figura 4.1 - Produção de inóculo líquido concentrado de fungos solubilizadores de fosfatos.**

#### **4.2.2 - Plantio e inoculação**

Para o plantio, foram utilizados tubetes plásticos com capacidade de 250 mL de substrato, previamente desinfetados em hipoclorito de sódio a 2,5%. Cada tubete recebeu 170g (240 mL) de vermiculita e substrato comercial MECPLANT® Floresta 1 modificado (casca de pínus e vermiculita expandida - 6:1, sem adição

de calcário e sem adubação), na proporção de 2:1 (v/v). Foram adicionados 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  de P ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  de K (KCl). A mistura, pesada e acondicionada em sacos plásticos individuais, foi autoclavada por 30 min a 121°C, por três vezes consecutivas em intervalos de 24 h. Após autoclavagem, a mistura apresentou um valor de pH em água de 5,1.



**Figura 4.2 - (A): Aspecto das culturas de MSF aos 5 dias de incubação em meio GEL. (B): Aspecto do inóculo líquido concentrado de MSF após trituração ou ressuspensão.**

Os MSF e os fECM foram inoculados isoladamente e combinados dois a dois (1 MSF + 1 fECM). O volume do inóculo líquido de MSF aplicado por tubete foi equivalente a  $10^6$  propágulos  $\text{g}^{-1}$  de substrato. Para os fECM, foram aplicados 10 mL de inóculo líquido por tubete. Os valores de matéria seca por volume de inóculo correspondem a 5  $\text{g L}^{-1}$  para o isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*), 7  $\text{g L}^{-1}$  para o UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), 13  $\text{g L}^{-1}$  para o isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) e 9  $\text{g L}^{-1}$  para o isolado UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*). O inóculo e os nutrientes foram misturados uniformemente

ao substrato. Como testemunha, foi utilizado tratamento não inoculado, que recebeu igual volume de uma mistura de inóculo esterilizado.

Dezoito dias antes do plantio, as sementes de *Pinus taeda* L. foram submetidas a tratamento de quebra de dormência, mantendo as mesmas úmidas sob refrigeração a 8°C. Antes do plantio, as sementes foram desinfetadas em etanol (70%) por 30 s e hipoclorito de sódio (2%) por 20 min, sendo em seguida lavadas em água destilada esterilizada. Cada tubete recebeu 6 sementes. Alguns tubetes precisaram ser semeados em inúmeras ocasiões, em decorrência da baixa taxa de germinação. Após a emergência, foi efetuado o desbaste, deixando-se uma planta por tubete.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, a partir do mês de janeiro de 2001, quando as temperaturas médias estavam favoráveis à produção de mudas de *P. taeda*. Durante todo o período experimental, manteve-se um fotoperíodo de 14 h de luz/dia. As plantas receberam água destilada diariamente, mantendo-se o substrato a 80% da capacidade máxima de retenção (previamente determinada), através de pesagem individual dos tubetes.

Após 75 dias da semeadura, realizou-se nova inoculação com fECM (Figura 4.3), tanto nos tratamentos individuais quanto nos combinados com MSF, visando assegurar a presença dos fECM, que necessitam do contato com as raízes das plantas para seu crescimento na rizosfera e posterior colonização.

O delineamento adotado foi completamente casualizado, com três repetições por tratamento.

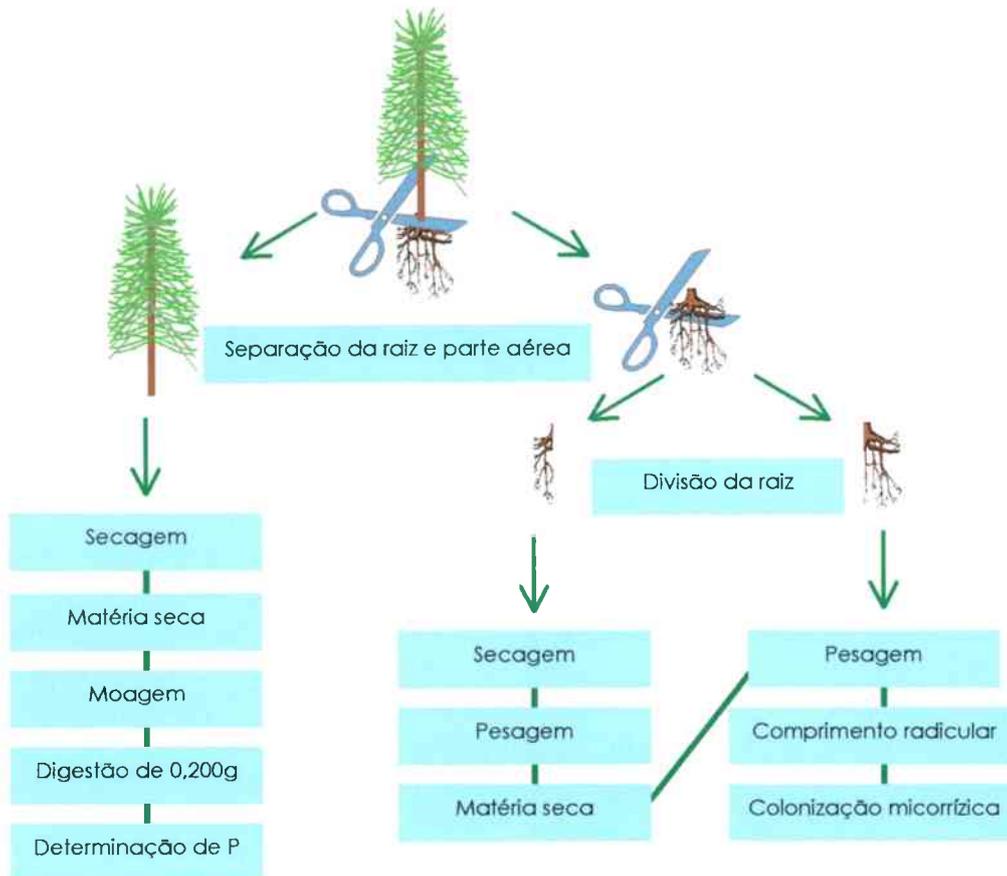
#### **4.2.3 - Coleta e avaliação das plantas**

Cento e cinquenta dias após a semeadura, as plantas inteiras foram colhidas e avaliadas quanto ao crescimento, à absorção de fósforo e à colonização radicular (Figura 4.4).



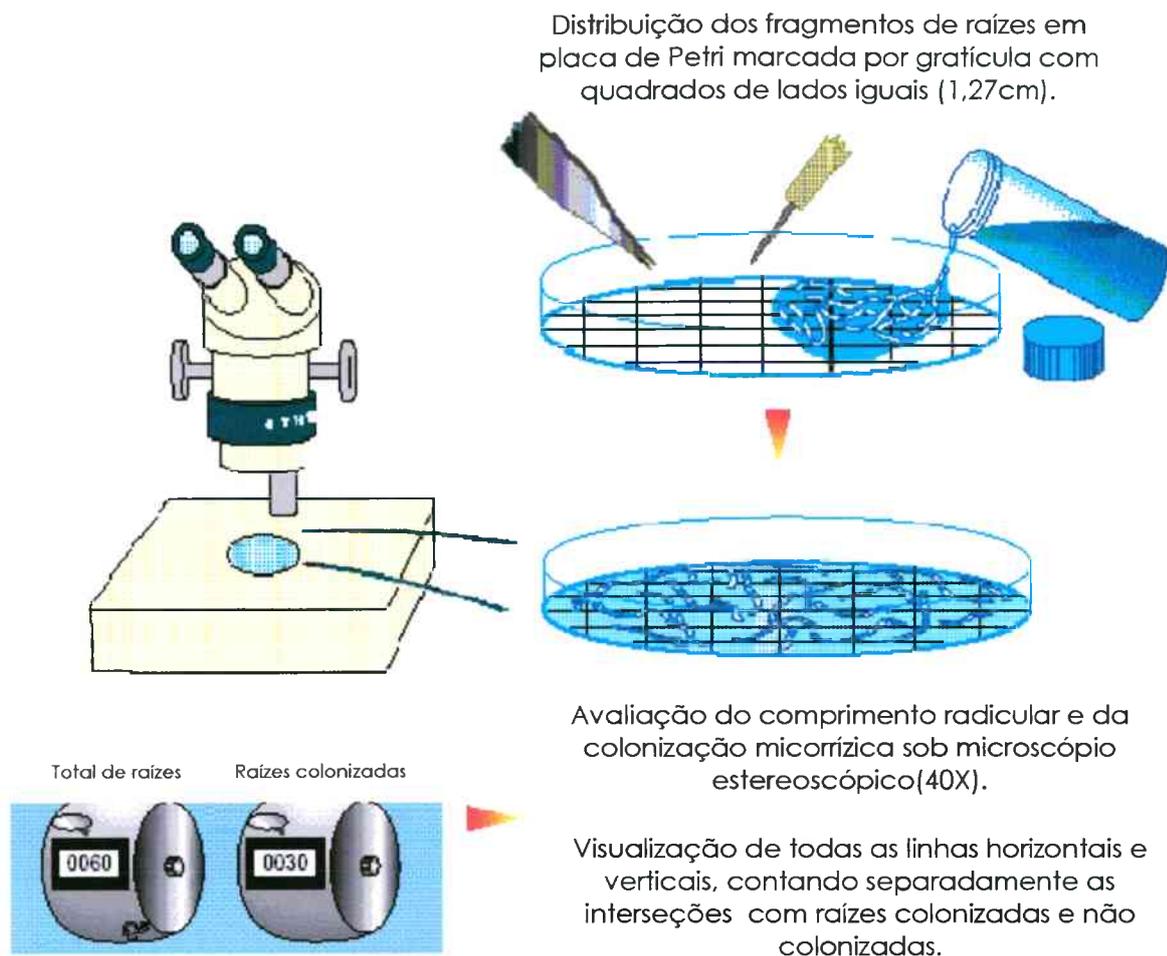
**Figura 4.3 - Aspecto do inóculo e da inoculação dos fECM em *Pinus taeda* L.**

As raízes foram separadas da parte aérea, lavadas sob água corrente para eliminação do substrato e, em seguida, divididas em duas porções. Uma delas foi pesada, fragmentada em pedaços de aproximadamente 1 cm e mantida sob refrigeração a 8°C em frascos individuais com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, para a posterior avaliação da colonização micorrízica e do comprimento radicular. A outra parte foi pesada e secada a 75°C para determinação da matéria seca, levando-se em consideração o peso fresco das duas porções de raiz.



**Figura 4.4 - Procedimento de avaliação das plantas de *Pinus taeda* L., após 150 dias de crescimento em casa-de-vegetação.**

A colonização e o comprimento radicular foram determinados através de técnica proposta por GIOVANNETTI & MOSSE (1980), modificada por BRUNDRETT et al. (1996). Os fragmentos de raiz foram espalhados em uma placa de Petri ( $\varnothing$  90 mm) com o fundo marcado por uma grafícula com quadrados de 1,27 cm de lado (Figura 4.5). Foram contadas as interseções dos segmentos radiculares sobre essas linhas, sob microscópio estereoscópico (40 X), registrando-se a presença ou ausência da colonização. Por esse método, o número de interseções é equivalente ao comprimento radicular em centímetros. O percentual de colonização foi calculado levando-se em consideração o número de interseções colonizadas sobre o total de interseções observadas.



**Figura 4.5 - Avaliação da colonização radicular pela técnica das interseções de GIOVANETTI & MOSSE (1980) modificada por BRUNDRETT et al. (1996).**

A parte aérea foi secada a 75°C para determinação da matéria seca. Em seguida, foi triturada em moinho de facas de aço inoxidável, com peneira de orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Uma amostra de 0,200 g foi submetida à digestão em  $H_2O_2$  e  $H_2SO_4$  para determinação do teor de fósforo absorvido, por método colorimétrico e leitura de absorbância a 660 nm, conforme metodologia descrita no Capítulo 3.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com desdobramento fatorial do tipo 9 X 5. As médias dos fatores (MSF e fECM) e das interações entre eles foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Análise de regressão foi aplicada entre os dados dos diferentes parâmetros avaliados e a

significância do coeficiente de determinação verificada através da aplicação do teste t ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se como fator isolado, a inoculação dos MSF não afetou a produção de matéria seca das mudas de *Pinus taeda* (Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3).

Entretanto, considerando-se cada MSF e os fECM isoladamente, pode-se observar que a produção de matéria seca, nos três parâmetros avaliados (parte aérea, raiz e total), foi superior à testemunha nas plantas inoculadas com os isolados MSF-262 (*Penicillium* sp.) e MSF-239 (*Bacillus* sp.). Um único caso contrário foi obtido com a inoculação do isolado MSF-189 (*Enterobacter* sp.), que proporcionou menor produção de matéria seca do que a obtida pela testemunha não inoculada, nos três parâmetros avaliados. RALSTON & McBRIDE (1976) já haviam verificado que a inoculação de MSF aumenta o crescimento de mudas de *Pinus resinosa* adubadas com fosfato de rocha, sendo mais eficiente do que a aplicação de fertilizante solúvel, sem inoculação.

**Tabela 4.1 - Matéria seca da parte aérea (g) de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	Média
<b>Sem MSF</b>	2,78 bD	3,91 abA	3,29 bdBC	2,98 bdCD	3,48 abB	3,29 a
<b>189</b>	2,07 cD	4,29 aA	4,14 aA	3,61 aB	2,88 bC	3,40 a
<b>239</b>	3,97 aA	3,78 acA	2,33 eC	2,98 bdC	3,37 abB	3,29 a
<b>177</b>	2,53 bcCD	3,68 adA	2,82 deBCD	2,28 eD	2,99 bB	2,86 a
<b>MSF 262</b>	4,21 aA	3,40 bdB	3,56 acB	2,80 ceC	3,47 abB	3,49 a
<b>269</b>	2,60 bcC	3,17 cdB	3,83 abA	1,50 fD	3,42 abB	2,91 a
<b>195</b>	2,49 bcC	4,25 aA	2,84 deC	3,35 acB	3,75 aB	3,34 a
<b>251</b>	2,78 bC	3,11 dBC	3,62 acA	3,44 abAB	3,70 aA	3,34 a
<b>310A</b>	2,54 bcC	4,17 aA	3,12 cdB	2,38 deC	3,81 aA	3,20 a
<b>Média</b>	2,88 CD	3,75 A	3,28 BC	2,81 D	3,43 AB	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

**Tabela 4.2 - Matéria seca da raiz (g) de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	Média
Sem MSF	1,04 bBC	1,34 abA	1,17 abcAB	0,99 abC	1,33 aA	1,17 a
189	0,73 cC	1,60 aA	1,43 aA	1,16 abB	0,99 bB	1,18 a
239	1,51 aA	1,18 bcB	0,71 dD	1,00 abC	1,12 abBC	1,10 a
MSF	0,88 bcB	1,23 bcA	1,00 bcB	0,58 cC	0,99 bB	0,95 a
262	1,38 aA	1,10 bcdBC	1,21 abAB	0,99 abC	1,14 abBC	1,16 a
269	0,98 bcB	1,02 cdB	1,37 aA	0,62 cC	1,23 abA	1,04 a
195	0,84 bcC	1,33 abA	1,00 bcBC	1,22 aA	1,16 abAB	1,11 a
251	0,87 bcB	0,85 dB	1,16 abcA	1,24 aA	1,23 abA	1,07 a
310A	0,81 bcB	1,28 bcA	0,93 cdB	0,92 bB	1,39 aA	1,06 a
Média	1,00 BC	1,22 A	1,11 ABC	0,97 C	1,17 AB	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

**Tabela 4.3 - Matéria seca total (g) de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	Média
Sem MSF	3,81 bD	5,25 acA	4,46 bdBC	3,97 acCD	4,81 abAB	4,46 a
189	2,80 cD	5,89 aA	5,57 aA	4,77 aB	3,87 cC	4,58 a
239	5,48 aA	4,96 bdAB	3,04 eD	3,97 acC	4,49 acBC	4,39 a
MSF	3,40 bC	4,97 bdA	3,83 deBC	2,86 deD	4,02 bcB	3,81 a
262	5,59 aA	4,49 ceB	4,77 acB	3,79 bcC	4,61 acB	4,65 a
269	3,59 bC	4,19 deB	5,19 abA	2,13 eD	4,65 acAB	3,95 a
195	3,33 bC	5,58 abA	3,85 deC	4,57 abB	4,91 aB	4,45 a
251	3,65 bB	3,96 eB	4,78 acA	4,68 aA	4,93 aA	4,40 a
310A	3,35 bC	5,45 abA	4,05 cdB	3,30 cdC	5,19 aA	4,27 a
Média	3,89 CD	4,97 A	4,39 BC	3,78 D	4,61 AB	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

Nas interações com fECM, alguns resultados de produção de matéria seca foram inferiores aos obtidos pelas plantas que receberam inoculação individual de MSF (Figura 4.6). No entanto, a interação UFSC-Rh90 + MSF-189 proporcionou aumentos na produção de matéria seca da parte aérea e total, quando comparada aos dois isolados inoculados individualmente (Tabelas 4.1 e 4.3). Neste caso, ficou claro o efeito benéfico da interação dos microrganismos que, conjuntamente, são capazes de superar a menor eficiência individual para promover o crescimento de *P. taeda*.

Entre os fECM, o isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*), quando inoculado individualmente e na média das interações com os MSF, proporcionou maior produção de matéria seca nos três parâmetros avaliados, em relação à testemunha não inoculada e aos tratamentos individuais com MSF (Figura 4.7). As plantas inoculadas com o isolado UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*) também apresentaram média superior à dos tratamentos com MSF na matéria seca da parte aérea e total (Tabelas 4.1 e 4.3), mas sem diferença na matéria seca da raiz (Tabela 4.2). Quando inoculado individualmente, este fECM proporcionou resultados superiores aos obtidos pela testemunha, nos três parâmetros. Na média, a produção de matéria seca das plantas inoculadas com os isolados UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) e UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) não diferiu da obtida pela inoculação dos solubilizadores.

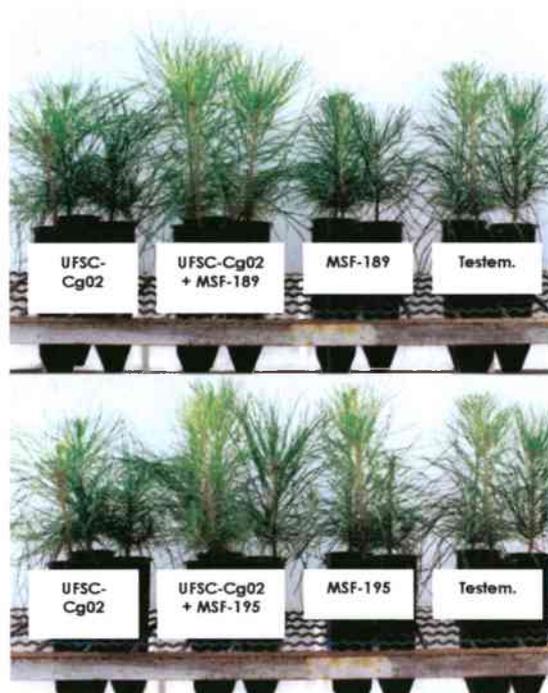
Os únicos casos de aumento na produção de matéria seca da parte aérea proporcionados pelas interações, em relação aos valores obtidos pela inoculação individual, foram obtidos com a inoculação dos isolados UFSC-Rh90 + MSF-189 e UFSC-Rh106 + MSF-189 (Figura 4.8). Embora algumas interações tenham proporcionado ganhos de matéria seca, os resultados não foram considerados sinérgicos. Alguns resultados negativos das interações sobre a produção de matéria seca se repetiram nos três parâmetros avaliados (Figura 4.9). As inoculações simultâneas dos isolados UFSC-Cg02 + MSF-269, UFSC-Cg02 + MSF-251, UFSC-Rh90 + MSF-239, UFSC-Rh106 + MSF-177 e UFSC-Rh106 + MSF-269, por exemplo, proporcionaram menor produção de matéria seca do que as plantas inoculadas apenas com fECM (Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3).



**Figura 4.6 - Aspecto das plantas de *P. taeda* inoculadas com o isolado MSF-262 (*Penicillium* sp.) individualmente e simultaneamente com fECM.**

Os resultados de comprimento radicular (Tabela 4.4), quando avaliados nas médias dos fatores, se assemelham aos obtidos para a produção de matéria seca. A inoculação dos MSF não apresentou resultados significativos. Entre os fECM, a inoculação dos isolados UFSC-Cg02 e UFSC-Su155 proporcionou comprimento radicular superior ao obtido com a inoculação dos MSF. Quando avaliados individualmente, a inoculação dos isolados MSF-189, MSF-177 e MSF-269 proporcionou valores de comprimento radicular inferiores ao obtido pela testemunha não inoculada. Entre os fECM, houve aumento do comprimento radicular com a inoculação do UFSC-Su155 e diminuição com o UFSC-Rh106. Nas interações, houve efeito sinérgico nas combinações entre os isolados UFSC-Cg02 + MSF-195 e UFSC-Rh90 + MSF-189. O maior valor de comprimento radicular foi obtido pelas plantas inoculadas simultaneamente com os isolados UFSC-Su155 +

MSF-310A. No entanto, a maioria das interações envolvendo o isolado UFSC-Su155 mostrou-se negativa com relação a este parâmetro de crescimento.



**Figura 4.7 - Aspecto das plantas de *P. taeda* inoculadas com o isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) individualmente e simultaneamente com MSF.**

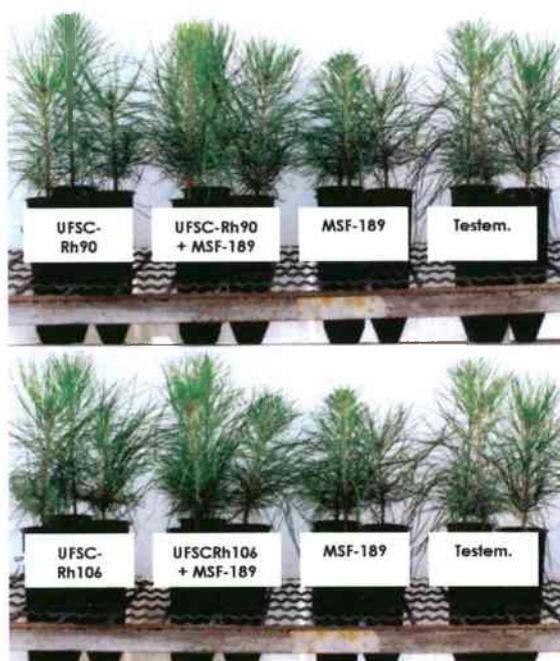


Figura 4.8 - Interações entre MSF e fECM com respostas positivas à inoculação conjunta sobre o crescimento das plantas de *P. taeda* L.



Figura 4.9 - Interações entre MSF e fECM com respostas negativas à inoculação conjunta sobre o crescimento das plantas de *P. taeda* L.

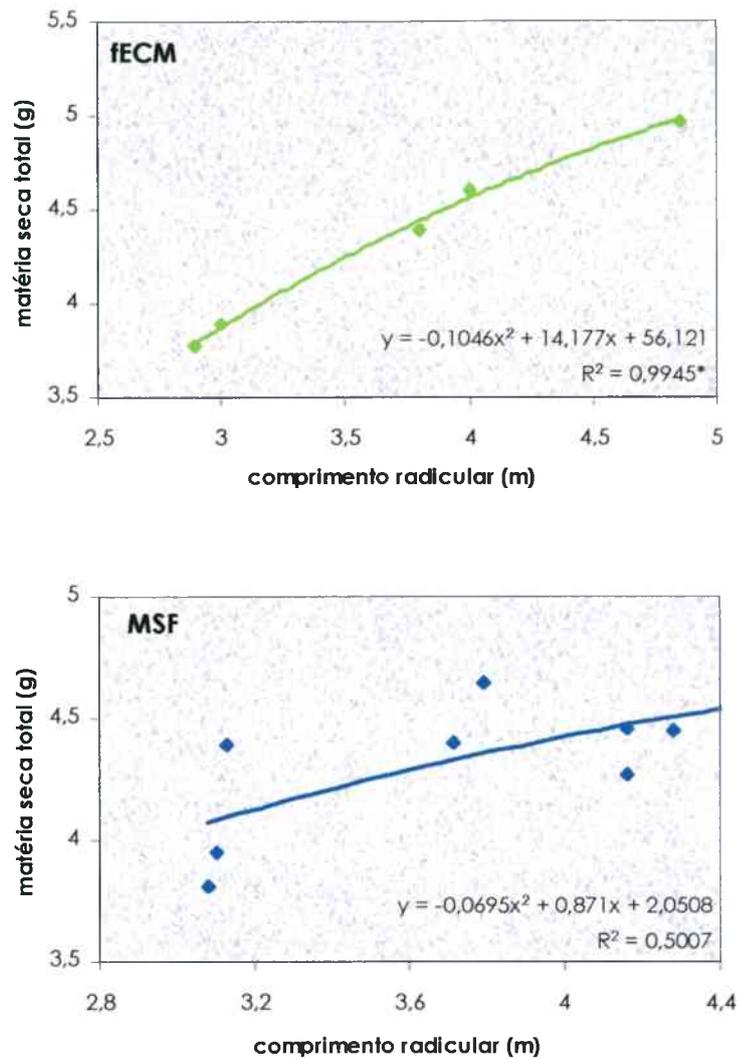
**Tabela 4.4 - Comprimento radicular (m) de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					Média
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
Sem MSF	4,05 aBC	4,81 bcAB	3,78 bC	2,72 abcD	5,47 bA	4,16 a
189	2,33 cdC	5,66 bA	6,41 aA	3,38 abB	2,22 eC	4,00 a
239	3,64 abB	4,50 bcA	2,20 cC	2,97 abBC	2,33 eC	3,13 a
177	1,94 dC	5,12 bA	3,69 bB	1,57 cC	3,07 deB	3,08 a
MSF 262	3,20 adBC	4,41 bcA	4,47 bA	3,00 abC	3,89 cdAB	3,79 a
269	2,66 bcdC	3,52 cdB	4,49 bA	2,21 bcC	2,60 eC	3,10 a
195	2,83 abcdB	7,89 aA	3,64 bB	3,58 aB	3,34 deB	4,28 a
251	3,33 acBC	3,01 dC	3,41 bBC	3,86 aB	4,94 bcA	3,71 a
310A	3,10 adC	4,60 bcB	2,20 cD	2,72 abcCD	8,17 aA	4,16 a
Média	3,01 CD	4,85 A	3,81 BC	2,89 D	4,00 B	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

Houve correlação significativa entre a produção de matéria seca total e o comprimento radicular dos fECM ( $R^2=0,9945$ ). A matéria seca das plantas inoculadas com fECM foi maior com o aumento do comprimento radicular (Figura 4.10). Esse comportamento é bastante discutido entre os fECM, pois um dos principais benefícios das associações micorrízicas é o aumento da superfície e da área de absorção das raízes, provocada por uma série de alterações morfológicas e fisiológicas durante o processo de colonização (SMITH & READ, 1997). Assim, é natural que não exista a mesma correlação para os MSF que, isoladamente, não estabelecem alterações morfológicas evidentes nas raízes, atuando mais diretamente sobre os fosfatos existentes ou adicionados no solo, mas especialmente na rizosfera.

A colonização micorrízica (Tabela 4.5) foi baixa em todos os tratamentos, atingindo o valor máximo de 3,7% na interação entre os isolados UFSC-Rh90 + MSF-262. O isolado UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) não apresentou colonização detectável. Os isolados UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) e UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*) apresentaram a média de 1% de colonização.



**Figura 4.10** - Análise de regressão entre as médias de matéria seca total e de comprimento radicular de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com fECM e MSF. \*Significativo pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.5 - Colonização micorrízica (%) de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

		fECM*					Média
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
MSF	Sem MSF	-	0,0 aB	0,0 cB	0,8 abA	0,8 bcA	0,4 ab
	189	-	0,0 aB	0,2 cB	1,2 aA	0,0 cB	0,3 ab
	239	-	0,0 aA	0,0 cA	0,3 abA	0,0 cA	0,1 b
	177	-	0,0 aC	1,5 bB	0,0 bC	2,3 aA	0,9 ab
	262	-	0,0 aB	3,7 aA	0,0 bB	2,1 aB	1,5 a
	269	-	0,0 aC	0,0 cB	0,0 bC	1,2 bA	0,3 ab
	195	-	0,0 aB	0,0 cB	0,0 bB	1,0 bA	0,3 ab
	251	-	0,0 aA	0,0 cA	0,0 bA	0,5 bcA	0,1 b
	310A	-	0,0 aC	3,3 aA	0,5 abBC	1,1 bB	1,2 a
	Média	-	0,0 B	1,0 A	0,3 B	1,0 A	

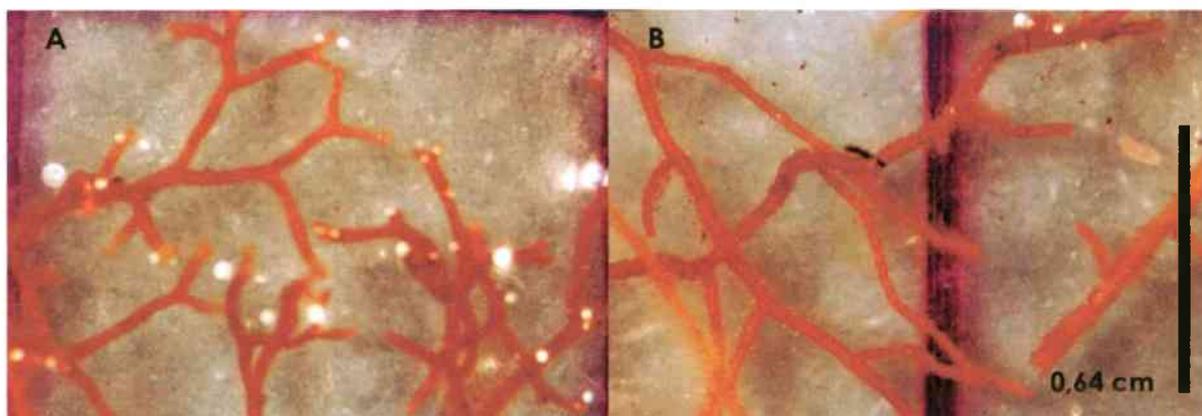
\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

O baixo percentual de colonização micorrízica não pode ser justificado por efeitos antagônicos entre os isolados testados, já que esse comportamento também foi observado nos tratamentos com inoculação individual dos fECM. Não houve correlação entre os valores de colonização e de crescimento conjunto dos isolados em meio de cultura (vide Capítulo 3). Nesse caso, a dosagem de  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  de P, aplicada no substrato, parece ter sido o principal fator de inibição da colonização. Embora o fosfato bicálcico seja uma fonte de fósforo de baixa solubilidade, verificou-se em ensaio preliminar que todos os isolados testados possuem capacidade de solubilização desta fonte em meio de cultura, onde a disponibilização chegou a 87,3% do total adicionado (vide Capítulo 3). Assim, a inoculação parece ter proporcionado um aumento significativo na disponibilidade de P solúvel.

LAPEYRIE, RANGER, VAIRELLES (1991), estudando fECM com capacidade de solubilização de fosfatos, verificaram que a ação solubilizadora, a intensidade de colonização radicular e o efeito sobre o crescimento das plantas diminuem com o aumento do P disponível. Entre os MSF, a maior disponibilidade de fósforo no solo também afeta os mecanismos de solubilização de fosfatos. NAHAS & ASSIS (1992b) observaram que a solubilização de fosfatos de rocha por *Aspergillus*

*niger*, cultivado em meio sem adição de fosfato inorgânico, era inibida com a adição de fosfato solúvel. GONZALES-EGUIARTE & BAREA (1975) verificaram que os efeitos da solubilização por via microbiana sobre o crescimento do tomateiro foram maiores em baixas concentrações de P adicionado ao solo. Os autores sugerem que os MSF têm a atividade solubilizadora inibida na presença de P solúvel. NAHAS, CENTURION, ASSIS (1994) observaram que o aumento da disponibilidade de P inibe a liberação dos ácidos orgânicos responsáveis pela solubilização do P inorgânico, bem como a ação das fosfatases, responsáveis pela mineralização do P orgânico do solo.

Apesar da baixa colonização micorrízica, inúmeras alterações morfológicas puderam ser observadas nas raízes das plantas inoculadas com FECM. As raízes das plantas inoculadas isoladamente com o fungo ectomicorrízico UFSC-Cg02, ou em algumas interações deste isolado com MSF, apresentaram grande número de estruturas dicotômicas e ramificações laterais (Figura 4.11), não percebidas nos outros tratamentos, o que leva a crer que a atividade micorrízica não foi totalmente inibida. Essa característica pode ter sido estimulada por fatores de crescimento produzidos pelos isolados, como hormônios vegetais, que atuam nos processos de diferenciação celular que antecedem a colonização da raiz (GAY et al., 1994; BARKER & TAGU, 2000).



**Figura 4.11 - Aspecto das raízes de *Pinus taeda* L. (A) Planta inoculada com os isolados UFSC-Cg02 + MSF-195. (B) Planta não inoculada. Aumento de 40X.**

Outro aspecto que demonstra claramente a atuação dos microrganismos sobre o fosfato adicionado é a absorção de fósforo pela parte aérea das plantas de *P. taeda*. Inúmeros efeitos podem ser observados nos dados de %P (Tabela 4.6) e de P total (Tabela 4.7).

Todos os MSF, quando inoculados individualmente, proporcionaram maior absorção de fósforo, tanto na porcentagem quanto na quantidade total absorvida. Na %P, a inoculação dos isolados MSF-195 e MSF-310A (*Aspergillus* spp.) proporcionou incrementos superiores a 80% sobre o valor obtido pelas plantas não inoculadas, confirmando os resultados obtidos na solubilização em meio líquido (vide Capítulo 3). Entretanto, na quantidade total de P na parte aérea, o maior incremento foi obtido pela inoculação isolada do MSF-262 (*Penicillium* sp.), que apresentou um valor 139,58% maior do que o obtido pelas plantas não inoculadas. Esse resultado reforça a hipótese de SILVA FILHO & VIDOR (2001), de que na avaliação do potencial de solubilização, em meio de cultura, deve-se levar em consideração o crescimento do microrganismo, pois nem sempre os mais agressivos nesse aspecto, como o MSF-310A, são os que apresentam a maior relação de fósforo solubilizado por unidade de biomassa.

**Tabela 4.6 - Porcentagem de fósforo na parte aérea de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					Média
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	
Sem MSF	0,17 cD	0,17 efD	0,21 cdeC	0,23 deB	0,26 cdA	0,21 c
189	0,30 aA	0,16 fD	0,19 eC	0,23 deB	0,30 aA	0,24 b
239	0,25 bC	0,17 efD	0,27 aB	0,27 bcB	0,29 abA	0,25 ab
177	0,27 bA	0,22 bcB	0,22 cdB	0,28 bA	0,28 acA	0,26 ab
262	0,27 bB	0,30 aA	0,24 bC	0,26 bcB	0,27 bdB	0,27 a
269	0,27 bB	0,22 bcC	0,20 deD	0,33 aA	0,26 cdB	0,26 ab
195	0,31 aA	0,19 deD	0,24 bC	0,25 cdC	0,28 acB	0,25 ab
251	0,30 aA	0,24 bC	0,23 bcCD	0,22 eD	0,26 cdB	0,25 ab
310A	0,32 aA	0,20 cdE	0,23 bcD	0,28 bB	0,25 dC	0,26 ab
Média	0,28 A	0,21 B	0,22 B	0,26 A	0,27 A	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

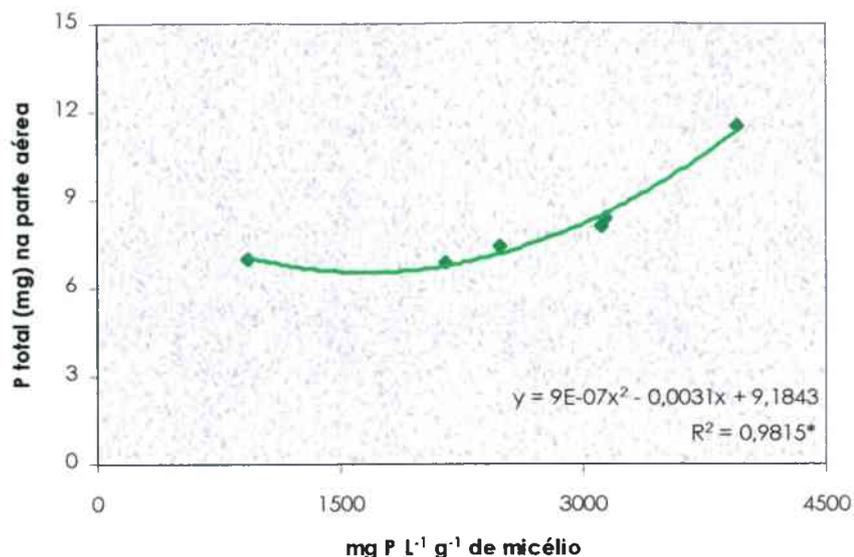
**Tabela 4.7 - Quantidade total de fósforo (mg) na parte aérea de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) e fungos ectomicorrízicos (fECM).**

	fECM*					Média	
	Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155		
Sem MSF	4,8 fC	6,6 dB	6,8 bcB	6,7 bB	9,2 abA	6,8 c	
189	6,3 eB	7,0 bdB	8,2 aA	8,2 aA	8,6 bA	7,7 bc	
239	9,9 bA	6,6 dC	6,1 cC	7,8 abB	9,7 abA	8,0 ac	
MSF	177	6,9 deB	8,0 bcA	6,3 cB	6,4 bB	8,4 bA	7,2 bc
262	11,5 aA	10,1 aB	8,3 aC	7,3 abD	9,4 abB	9,3 a	
269	7,0 deBC	6,8 cdC	7,7 abB	4,8 cD	9,0 bA	7,1 bc	
195	7,4 ceB	8,0 bcB	6,6 bcC	8,3 aB	10,3 aA	8,1 ac	
251	8,4 cB	7,3 bdC	8,3 aB	7,7 abB	9,7 abA	8,3 ab	
310A	8,1 cdB	8,3 bB	7,0 acC	6,7 bC	9,6 abA	7,9 bc	
Média	7,8 B	7,6 B	7,2 B	7,1 B	9,3 A		

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

Não houve correlação significativa entre os valores de absorção de fósforo e o comprimento radicular das plantas, nem entre a absorção de fósforo e a produção de matéria seca, seja para os fatores ou para as interações. Como em outros resultados conflitantes, esse comportamento pode ser devido à alta concentração de P aplicada ao substrato, que pode ter minimizado a possibilidade de uma avaliação mais apurada sobre os parâmetros de crescimento das mudas de *Pinus taeda* L.

Porém, utilizando os dados de solubilização em meio de cultura (vide Capítulo 3), transformados em relação à quantidade de biomassa, observou-se uma correlação positiva ( $R^2=0,9815$ ) entre o potencial de solubilização de P no meio de cultura por grama de micélio dos fungos solubilizadores inoculados individualmente, com o quantidade de P absorvida pelas plantas inoculadas com esses mesmos isolados (Figura 4.12). Essa correlação não foi observada entre os dados de solubilização em meio líquido e a produção de matéria seca de *P. taeda* L.



**Figura 4.12 - Análise de regressão entre as médias de P no meio GEL cultivado com fungos solubilizadores de fosfatos (potencial relativo à biomassa) e de P total na parte aérea de mudas de *Pinus taeda* L. inoculadas com os mesmos isolados. \*Significativo pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ).**

As plantas inoculadas individualmente, com todos os fECM testados neste estudo, também apresentaram aumento significativo na quantidade total de P absorvido (Tabela 4.7), proporcionando incrementos de até 52,94% sobre o valor obtido pelas plantas não inoculadas. Esse resultado confirma os dados obtidos no ensaio de solubilização em meio líquido (vide Capítulo 3), demonstrando que os isolados possuem capacidade e potencial de solubilização de fosfato de cálcio. WALLANDER, WICKMAN, JACKS (1997), utilizando a apatita como única fonte de P na adubação de mudas de *Pinus sylvestris* inoculadas com diferentes fECM, observaram aumentos significativos na concentração de P na parte aérea, quando comparadas às plantas sem adição de apatita ou sem inoculação, caracterizando a atuação desses fungos como solubilizadores de fosfato. Trata-se de um importante resultado se for considerado que os estudos sobre a

atuação dos fECM na solubilização de minerais são relativamente recentes, quando comparados aos estudos sobre microrganismos de vida livre. Entretanto, não houve correlação entre o P solubilizado no meio e o P total absorvido pelas plantas inoculadas com fECM. Esse comportamento se explica pelo fato de que a inoculação de isolados com menor potencial de solubilização de fosfato, como o UFSC-Cg02, proporcionaram uma absorção de P superior à obtida pelas plantas não inoculadas. Isso reforça a hipótese de que alguns fECM possam produzir fosfatases ou, então, de que os mecanismos de solubilização só sejam acionados em situações ambientais específicas (NAHAS & ASSIS, 1992a).

Nos dados obtidos no ensaio de solubilização em meio de cultura (vide Capítulo 3), o isolado MSF-262 (*Penicillium* sp.) foi um dos mais eficientes na solubilização do fosfato bicálcico em meio GEL. Foi também o isolado que apresentou os melhores resultados de solubilização e crescimento quando combinado com os fECM, apresentando efeito sinérgico sobre a solubilização quando inoculado simultaneamente com o isolado UFSC-Cg02. Observa-se esta mesma tendência neste estudo, onde verificou-se que a inoculação UFSC-Cg02 + MSF-262 proporcionou um valor de porcentagem de P superior aos obtidos pelas plantas inoculadas com estes isolados individualmente (Tabela 4.6). Neste caso, não se descarta a possibilidade de que fatores de crescimento ou sinais moleculares tenham sido produzidos mutuamente pelos isolados envolvidos, estimulando os resultados positivos observados nas plantas de *Pinus taeda*. BAYA, BOETHLING, RAMOS-CORMENZANA (1981) observaram que a produção microbiana de vitaminas pode estimular os mecanismos de solubilização de fosfatos e promover o crescimento vegetal.

Além da solubilização, muitos MSF e fECM produzem substâncias promotoras do crescimento. Essa característica tem sido relatada como um dos fatores que estimulam o maior rendimento das culturas inoculadas com esses microrganismos (GONZALES-EGUIARTE & BAREA, 1975; LEINHOS & VACEK, 1994). SLANKIS (1973) observou que raízes de *Pinus sylvestris* não inoculadas e tratadas com auxinas desenvolveram-se de forma similar às ectomicorrizas. Esse autor desenvolveu a "teoria hormonal", defendendo que os hormônios são os principais responsáveis pelo processo de diferenciação celular que antecede a

colonização ectomicorrízica. Partindo deste pressuposto, aceita-se que qualquer microrganismo produtor de hormônios vegetais pode estimular a colonização. Assim, um estudo com plantas de pínus, onde a concentração de P no substrato seja baixa, pode vir a confirmar essa hipótese, uma vez que a colonização teoricamente não seria prejudicada por este fator.

Apesar dos problemas relacionados à concentração de fósforo aplicada no substrato, a interação sinérgica entre um fECM (*Cenococcum geophilum*) e um fungo solubilizador de fosfatos (*Penicillium* sp.), agora reforçada pelos dados de %P obtidos neste estudo, é um resultado que por si só merece destaque. Desde a publicação dos primeiros trabalhos estabelecendo a existência de microrganismos auxiliares da micorrização (DUPONNOIS & GARBAYE,1990; GARBAYE,1991), a maior parte dos isolados testados e relatados pertence a gêneros de bactérias micorrizosféricas.

Entretanto, alguns estudos já demonstraram a existência de relações positivas entre fungos de vida livre e fungos micorrízicos. PAULINO & AZCON (1987), estudando o efeito da inoculação tripla de *Centrosema* com rizóbio, MSF e *Glomus etunicatum*, verificaram que os efeitos simbióticos da micorriza aumentaram na presença dos MSF. As interações entre FMA e fungos solubilizadores demonstraram ser mais eficientes do que a interação entre FMA e bactérias solubilizadoras. OLIVEIRA (1988), estudando as interações entre microrganismos do solo no estabelecimento da simbiose ectomicorrízica em *Fagus silvatica* L., observou um efeito positivo da presença do fungo *Trichoderma* sp. sobre a colonização das raízes com *Hebeloma crustuliniforme* e *Paxillus involutus*.

Especificamente sobre *Cenococcum geophilum*, SHAW, DIGHTON, SANDERS (1995), estudando as interações antagônicas entre fECM e microrganismos saprófitas do solo, observaram que o mesmo, dentre outros fECM testados, possui grande capacidade combativa, especialmente contra os fungos. Assim, os resultados obtidos neste estudo, como no estudo em meio de cultura, são especialmente válidos porque se constituem numa provável exceção. Não se sabe quais os mecanismos envolvidos nessa convivência mútua entre os dois fungos. Se avaliados individualmente, nenhum dos dois apresentou

a maior capacidade de solubilização entre os isolados testados de cada grupo. Sabe-se até agora, com o andamento dos diversos estudos desenvolvidos nesta dissertação, que ambos são fungos de baixa velocidade de crescimento em meio de cultura, quando comparados a outros fungos, individualmente ou simultaneamente (vide Capítulo 3).

Considerando os resultados aqui obtidos, pode-se dar seqüência a uma série de estudos ecológicos envolvendo estes grupos de microrganismos, especialmente entre fungos, buscando confirmar ou não a existência de outras relações positivas entre eles.

#### 4.4 - CONCLUSÕES

1. Alguns MSF e fECM testados neste estudo, inoculados individualmente ou nas interações, são capazes de promover o crescimento de mudas de *Pinus taeda* L.;
2. A inoculação com fECM proporciona um aumento no comprimento radicular das plantas de *P. taeda*, que afeta positivamente sua produção de matéria seca total;
3. São consideradas positivas para o crescimento e absorção de fósforo de mudas de *P. taeda* as interações entre os isolados UFSC-Cg02 + MSF-262, UFSC-Cg02 + MSF-239, UFSC-Cg02 + MSF-310A e UFSC-Su155 + MSF-310A;
4. Os resultados positivos obtidos sobre a absorção de fósforo, pela inoculação das plantas de *P. taeda* com os isolados UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) + MSF-262 (*Penicillium* sp.), confirmam o efeito sinérgico entre esses isolados observado na solubilização em meio de cultura;
5. A relação mutualística entre os fungos UFSC-Cg02 e MSF-262, sobre a solubilização de fosfato, chama a atenção para a necessidade de estudos ecológicos envolvendo fungos de vida livre do solo e fECM.

## CAPÍTULO 5

### PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUBSTÂNCIAS INDÓLICAS POR MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

#### 5.1 - INTRODUÇÃO

O efeito da acidez sobre a solubilização de fosfatos tem sido estudado através da concentração de íons  $H^+$  (pH) e da concentração de ácidos na solução (acidez titulável). Inúmeros estudos demonstram uma correlação linear entre o decréscimo do pH e o fósforo solubilizado (ARORA & GAUR, 1979; ASEA et al.; 1988; MIKANOVA & KUBÁT, 1994a; NAHAS, CENTURION, ASSIS, 1994). BOLAN et al. (1994) identificaram uma gama considerável de ácidos orgânicos em solo rizosférico e verificaram, em casa-de-vegetação, que a adição dos ácidos cítrico e oxálico em solo cultivado com centeio e adubado com fosfato de rocha, proporcionou aumentos na produção de matéria seca das plantas e na disponibilidade de fósforo solúvel no solo. Eles concluíram que os ácidos orgânicos atuaram na solubilização do fosfato. Entretanto, em outros estudos com plantas, tem sido observado que a correlação entre a produção de matéria seca e o fósforo absorvido nem sempre acontece.

A acidificação proporcionada pela liberação de ácidos orgânicos por microrganismos parece não ser o único mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos e na promoção do crescimento vegetal. AGNIHOTRI (1970) sugere que a natureza dos ácidos orgânicos pode ser mais importante na solubilização do que a quantidade produzida pelos MSF. Além disso, podem estar envolvidos outros fatores de promoção do crescimento vegetal, como a produção de vitaminas (BAYA, BOETHLING, RAMOS-CORMENZANA, 1981; STRZELCZYK & LENIARSKA, 1985; STRZELCZYK & ROZICKI, 1985) e de ácido indol-3-acético, um

hormônio vegetal (GONZALES-EGUIARTE & BAREA, 1975; CHABOT , ANTOUN, CESCAS,1993; LEINHOS & VACEK, 1994).

Diversos MSF e fECM têm sido relatados como produtores de hormônios vegetais (STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ, 1984; STRZELCZYK et al., 1997; BARKER & TAGU, 2000) . Para os fECM, SLANKIS (1973) desenvolveu a "teoria hormonal", defendendo que os hormônios vegetais são os principais responsáveis pelo processo de diferenciação celular que antecede a colonização ectomicorrízica. Partindo desse pressuposto, aceita-se que qualquer microrganismo produtor de hormônios pode estimular a colonização e promover o crescimento dos vegetais.

O conhecimento dos mecanismos de solubilização de fosfatos e de promoção do crescimento vegetal por ação dos MSF e dos fECM é de fundamental importância para o estabelecimento de um programa de inoculação controlada ou de manejo das populações destes microrganismos no solo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de ácidos orgânicos e substâncias indólicas por isolados de MSF e fECM, em meio de cultura, a partir de técnicas qualitativas e quantitativas.

## **5.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados oito isolados de MSF e quatro isolados de fECM, pertencentes às coleções do Laboratório de Microbiologia do Solo e do Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC, previamente testados em meio de cultura (vide Capítulo 3). Dois ensaios consecutivos foram montados: um para a avaliação da produção de ácidos orgânicos e outro para a determinação e quantificação da produção de ácido indol-3-acético (AIA).

### **5.2.1 - Produção de ácidos orgânicos**

Cada isolado foi inoculado individualmente em 100 mL de meio GEL líquido, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados. Os fECM

foram inoculados através de dois discos de micélio ( $\varnothing$  7 mm) obtidos de cultura de 30 dias em meio MNM. Os MSF foram inoculados adicionando-se 5 mL de suspensão celular. A produção dos discos e obtenção da suspensão celular foram descritas no Capítulo 3. O delineamento adotado foi completamente casualizado, com três repetições por tratamento (microrganismo ou isolado).

Após 20 dias de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , a biomassa fúngica foi separada do meio de cultura em papel de filtro. O micélio foi seco a  $70^\circ\text{C}$  para determinação do peso da matéria seca. A biomassa bacteriana não foi determinada. O volume e o pH do meio foram medidos e uma alíquota de 10 mL foi armazenada a  $8^\circ\text{C}$  para ser submetida, posteriormente, à análise em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). No momento da análise, adicionou-se à amostra igual volume de HCl 0,1M (10 mL), centrifugando-se por 10 min a 2.200 g. Cada amostra foi filtrada em membrana com poros de  $0,2 \mu\text{m}$ , sob vácuo.

Foram analisados os ácidos cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ), D-glicônico ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$ ), oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ) e succínico ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ). A escolha desses ácidos considerou o fato de os mesmos serem freqüentemente relatados em estudos sobre mecanismos de solubilização (SPERBER, 1958a, CUNNINGHAM & KUIACK, 1992; LEYVAL & BERTHELIN, 1993; KIM, McDONALD, JORDAN, 1997). Os padrões (Chem Service) foram preparados na concentração de 0,001M, utilizando-se água ultrapura (Sistema Milli-Q, Millipore).

A análise em HPLC foi realizada no Laboratório de Uso Comum, do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, seguindo a metodologia proposta por BOLAN et al. (1994). O aparelho foi equipado com uma coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 -  $5 \mu\text{m}$  ( $4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ) e acoplado a um detector UV/VIS a 210 nm, e a um integrador Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvel, utilizou-se uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,013N, em água ultrapura, eluindo a um fluxo constante de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  por 40 min. Uma alíquota de  $20 \mu\text{L}$  de cada amostra foi injetada. A determinação quantitativa dos ácidos foi possível pela comparação das alturas dos picos que apresentaram tempos de retenção semelhantes aos obtidos pelos padrões. Toda a metodologia adotada para a determinação de ácidos está resumida na Figura 5.1.

Os cromatogramas dos padrões mostraram tempos de retenção de 7,58 min para o ácido glicônico, 8,05 min para o ácido oxálico, 20,0 min para o ácido succínico e 20,13 min para o ácido cítrico (Figura 5.2). Mesmo se tratando de reagentes P.A., comercializados com a finalidade específica de utilização como padrões, observou-se no cromatograma a presença de outras moléculas, em concentrações muito pequenas. Os padrões dos ácidos oxálico e cítrico apresentaram melhor detecção do que o glicônico e o succínico. Os picos com tempos de retenção muito próximos dificultaram a distinção entre os ácidos cítrico e succínico, e entre os ácidos glicônico e oxálico.

### **5.2.2 - Produção de ácido indol-3-acético**

A metodologia adotada para o cultivo dos microrganismos e para a extração de substâncias indólicas foi adaptada de STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984), RANDI & CROZIER (1991), SARWAR & KREMER (1995) e CATTELAN (1999).

Cada isolado foi inoculado individualmente em 300 mL de meio GEL líquido, em frasco Erlenmeyer de 1 L, previamente esterilizados, com 5 mM de L-triptofano. O L-triptofano é um aminoácido precursor do ácido indol-3-acético (AIA) e foi adicionado ao meio esterilizado, em forma de solução previamente filtrada em membrana com poros de 0,2  $\mu\text{m}$ . Os fECM foram inoculados através de três discos de micélio ( $\varnothing$  7 mm) obtidos de cultura de 30 dias em meio MNM. Os MSF foram inoculados adicionando-se 10 mL de suspensão celular (vide Capítulo 3). O delineamento adotado foi completamente casualizado, com três repetições por tratamento.

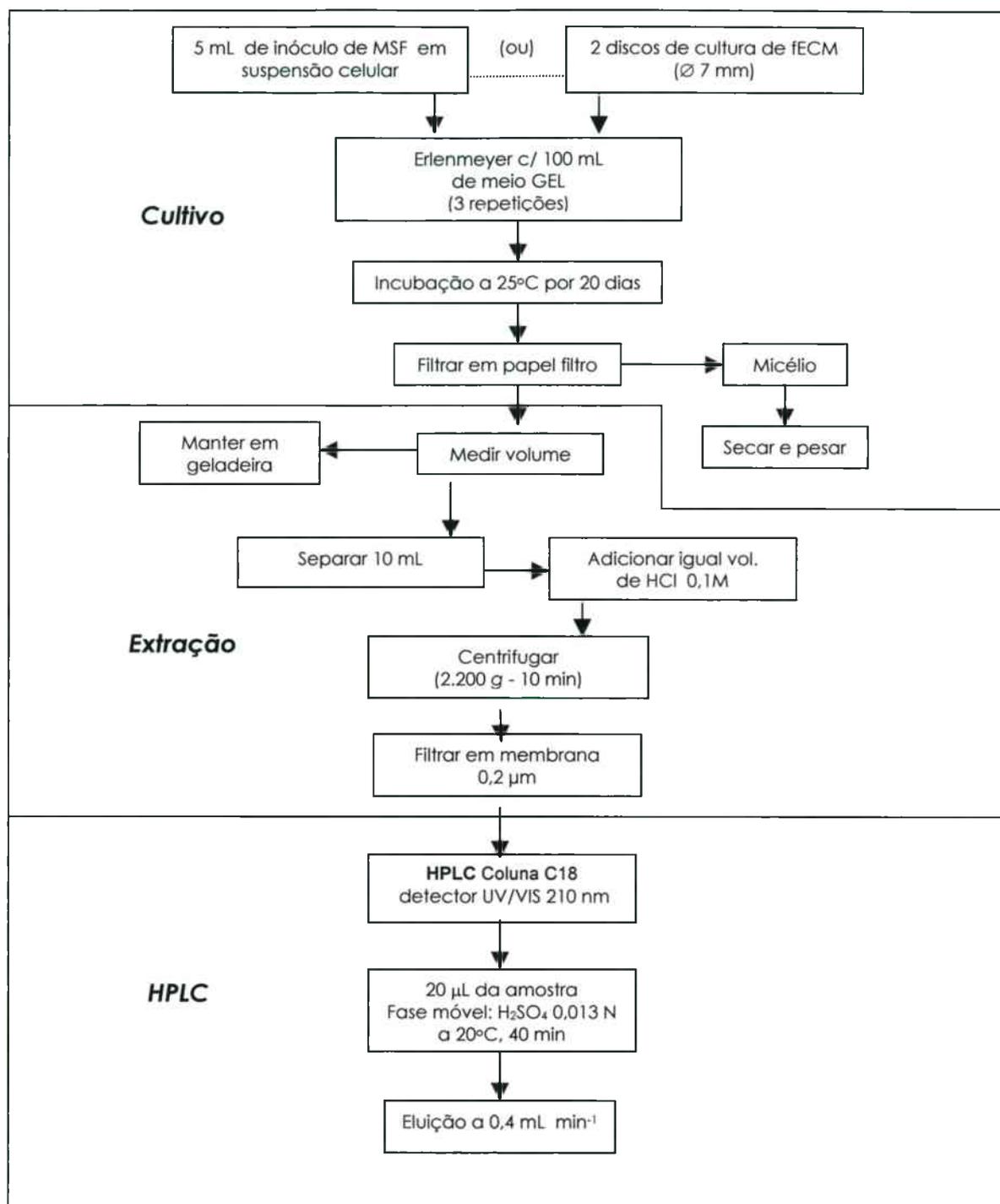
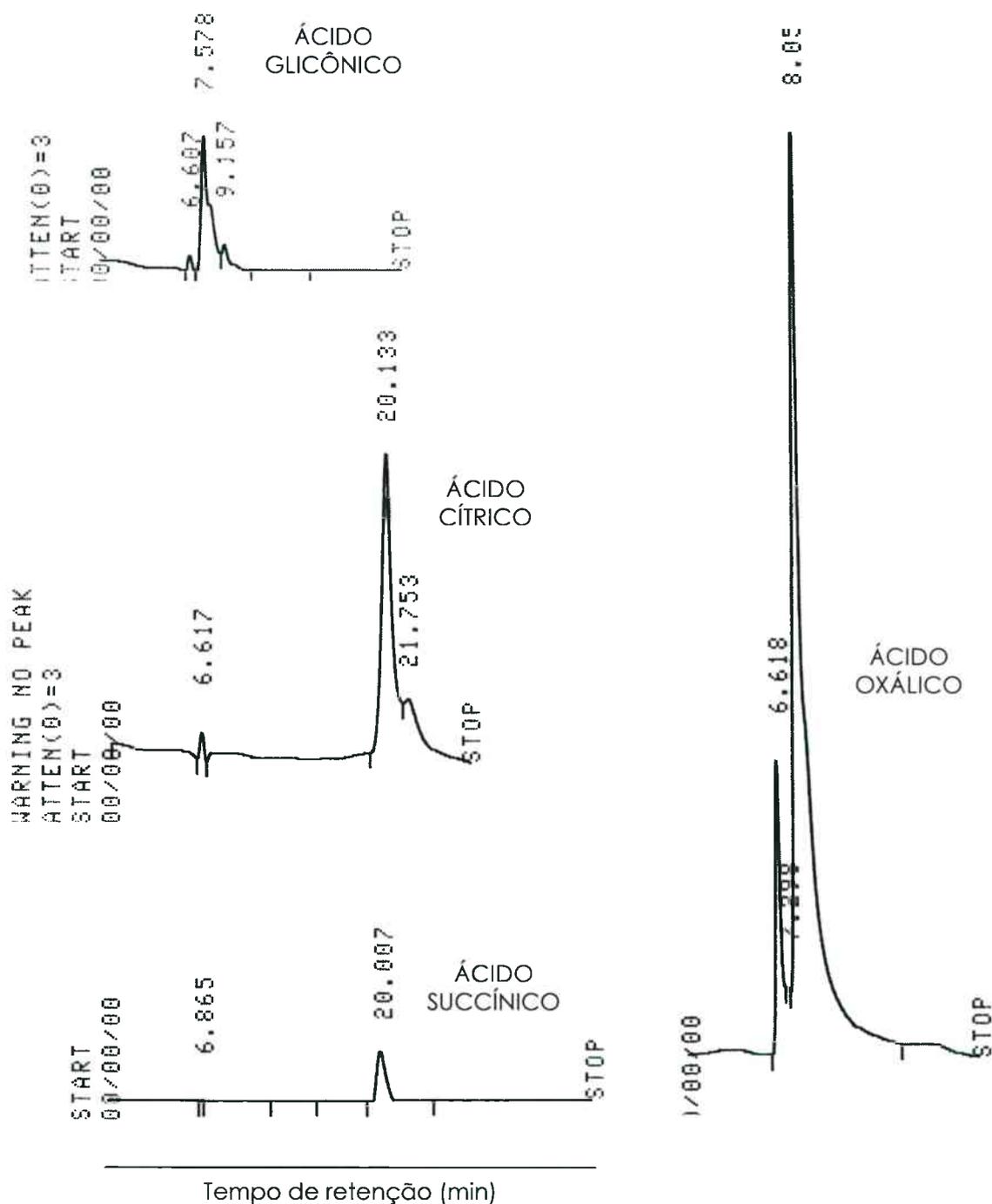


Figura 5.1 - Técnica para determinação de ácidos orgânicos em meio de cultura, por HPLC, adaptada BOLAN et al. (1994).



**Figura 5.2 - Cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos em HPLC (Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5  $\mu$ m (4,6 mm x 250 mm), com detecção por UV/VIS a 210 nm.**

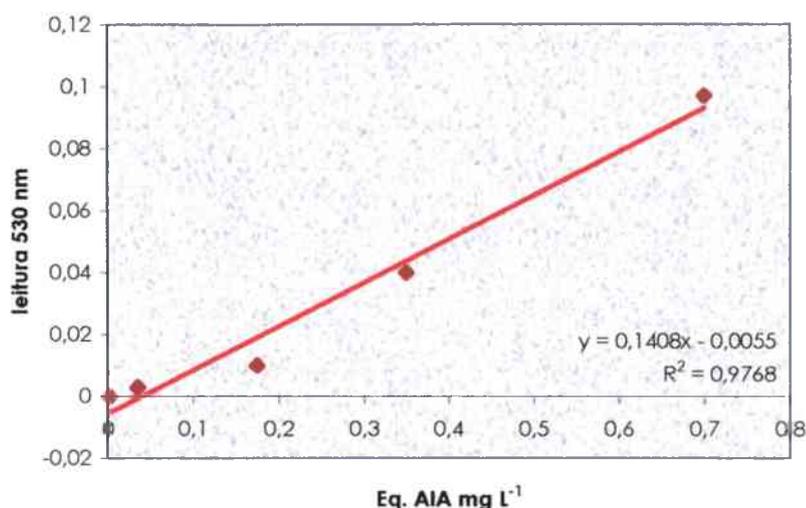
Após 17 dias de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , a biomassa fúngica foi separada do meio de cultura em papel de filtro. O micélio foi secado a  $70^\circ\text{C}$  para determinação do peso da matéria seca. A biomassa bacteriana não foi determinada. O volume de meio foi determinado e, em seguida, adicionaram-se  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de dietilditiocarmato de sódio, como anti-oxidante. Na seqüência, adicionou-se o equivalente a  $\frac{1}{4}$  do volume de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  (pH 8,0). Para preparar 1 L dessa solução em balão volumétrico, foram adicionados 500 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,1\text{M}$  e 468 mL de  $\text{NaOH}$   $0,1\text{M}$ , completando-se o volume com água destilada (MORITA, 1968).

Com o objetivo de desativar compostos fenólicos, adicionaram-se 2 g de polivinilpirrolidona (PVP), agitando-se a amostra manualmente até a formação de precipitado. Após 10 min, o meio foi acidificado com  $\text{HCL}$   $1\text{N}$  até atingir pH 2,5 e filtrado em papel Whatman nº. 42. O meio acidificado foi armazenado a  $8^\circ\text{C}$  para ser submetido, posteriormente, às análises de determinação de substâncias indólicas. A determinação seguiu três procedimentos diferentes: TLC, espectrofotometria e HPLC.

Para a análise em TLC, utilizou-se a técnica descrita por RANDI (1980). Uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  de cada amostra acidificada foi eluída em placa de camada delgada (cromatofolha de alumínio Merck Silicagel 60 F<sub>254</sub>), utilizando-se como eluente o sistema de solventes contendo clorofórmio, acetato de etila e ácido acético (60:40:5). Como padrão, utilizou-se o AIA  $0,001\text{M}$  em solução metanólica. Após eluição, as bandas foram visualizadas sob luz ultra-violeta a 254 nm e posteriormente reveladas com pulverização do reagente de Salkowski. Após a revelação, as cromatofolhas foram secadas a  $100^\circ\text{C}$  por 1h. As amostras contendo AIA foram identificadas pela coloração avermelhada das bandas e por comparação com as bandas da solução padrão. A avaliação em TLC foi qualitativa, como estudo preliminar às determinações por espectrofotometria e HPLC.

A determinação por espectrofotometria baseou-se na metodologia proposta por SARWAR & KREMER (1995). Sobre uma amostra de 3 mL de meio acidificado, foram adicionados 2 mL do reagente de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951 citados por CATTELAN, 1999). A preparação do reagente de

Salkowski está descrita no Anexo 8. Para a determinação da curva padrão de AIA, foram utilizadas concentrações crescentes preparadas em meio GEL não inoculado (testemunha), nas concentrações de 0 – 0,035 – 0,175 – 0,35 – 0,70 e 1,4 mg L<sup>-1</sup>, utilizando-se 3 mL de cada dosagem e 2 mL do reagente de Salkowski. Em seguida, as misturas foram agitadas manualmente e deixadas em repouso por 30 min. Como houve formação de precipitado nas amostras de meio, todas foram centrifugadas (2.200 g - 5 min) e submetidas posteriormente à leitura de absorbância a 530 nm. A curva padrão para determinação de AIA por espectrofotometria está apresentada na Figura 5.3.



**Figura 5.3 - Curva de calibração para determinação de substâncias indólicas por espectrofotometria a 530 nm.**

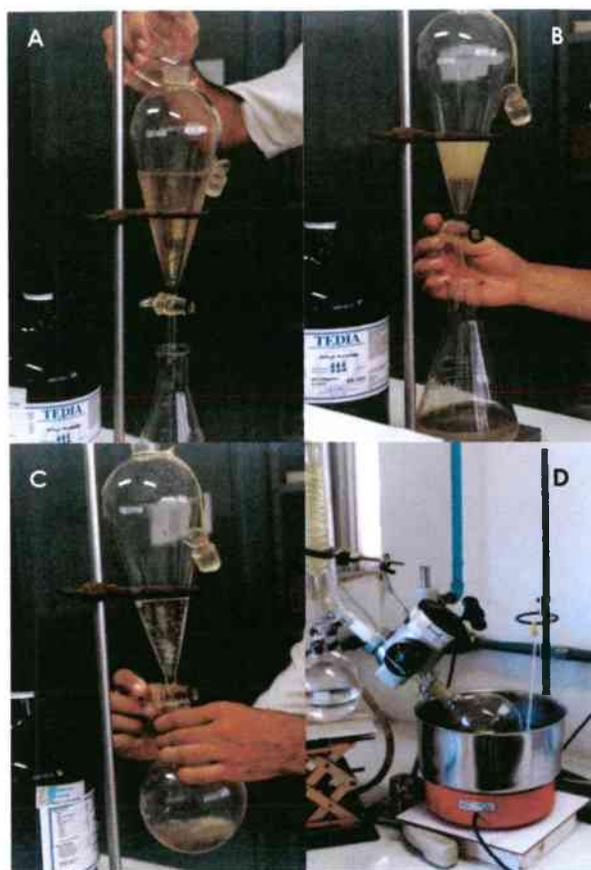
Os dados de leitura das amostras foram corrigidos pelo fator de diluição e convertidos em equivalentes de AIA (mg L<sup>-1</sup>), já que o reagente de Salkowski é para substâncias indólicas em geral. Os valores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Para as análises de HPLC, procedeu-se à técnica de extração adaptada de STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984). Os procedimentos foram realizados

no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC. O volume restante do meio acidificado foi depositado em funil de separação com capacidade de 500 mL. Em seguida, adicionaram-se 100 mL de acetato de etila, agitando-se manualmente, para extração de substâncias indólicas (Figura 5.4A). Após alguns segundos de repouso, a fase orgânica (acetato de etila) foi separada da aquosa (meio) (Figura 5.4B). A fase aquosa foi submetida à nova extração com 100 mL de acetato de etila em filtro de separação e posteriormente descartada. A fase orgânica (em torno de 200 mL) foi depositada em balão de fundo arredondado (Figura 5.4C) e evaporada a vácuo, até secar, em rotavapor a 40-45°C (Figura 5.4D). Após completa evaporação, adicionaram-se 2 mL de metanol ao extrato seco, obtendo-se um extrato concentrado em solução metanólica (equivalente aos 300 mL iniciais do filtrado de cultura). Com auxílio de pipeta de Pasteur, o extrato foi transferido para tubo Eppendorf (2,5 mL) e conservado a 8°C.

Para as determinações por HPLC, o extrato foi novamente filtrado em membrana de 0,2 µm. O aparelho foi equipado com uma coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5 µm (4,6 mm x 250 mm) e acoplado a um detector UV/VIS a 220 nm. Como fase móvel, utilizou-se uma solução de metanol 35% (pH 3), em água ultrapura, eluindo-se a um fluxo constante de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, a 26°C. Para a curva padrão, foram utilizadas concentrações de 1 – 5 – 10 – 30 e 100 mg L<sup>-1</sup> de AIA em metanol 35%. Uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada.

O padrão de AIA apresentou tempo de retenção de 17,99 min (Figura 5.5). Apesar da concentração indicada no rótulo (99%, Vetec), obteve-se uma média de 87,2% de AIA. Em vista disso, as concentrações utilizadas na curva de calibração foram corrigidas de acordo com este percentual. A curva padrão está apresentada na Figura 5.6.



**Figura 5.4 - Extração de substâncias indólicas, por metodologia adaptada de STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984).**

Todas as amostras de extrato concentrado precisaram ser diluídas para que pudessem ser lidas em concentrações menores, que permitiram a separação das substâncias e o registro dos diferentes tempos de retenção. Isso deve ter acontecido pelo fato de as amostras terem sido submetidas aos procedimentos de extração e concentração. A determinação de AIA foi realizada pelo método de padronização externa, comparando-se as alturas dos picos que apresentaram tempos de retenção semelhantes aos obtidos pelos padrões. Os dados obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A técnica adotada na determinação de AIA está resumida na Figura 5.7.

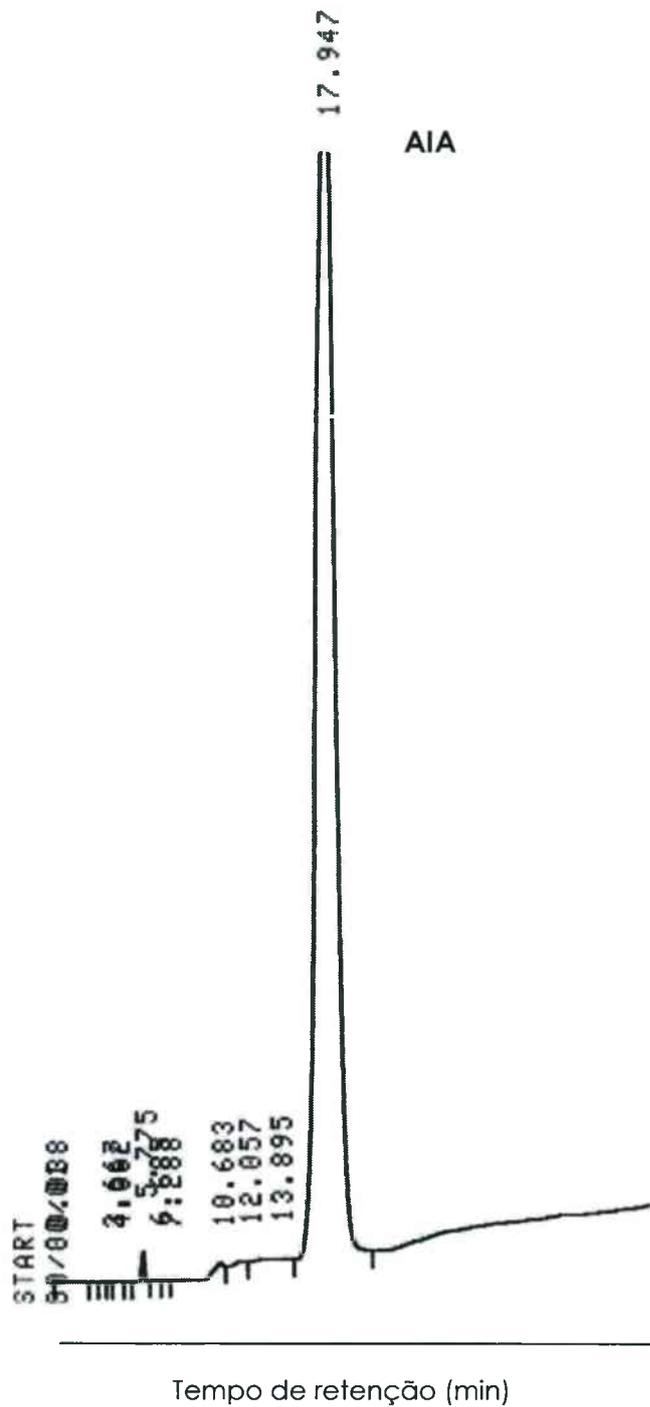
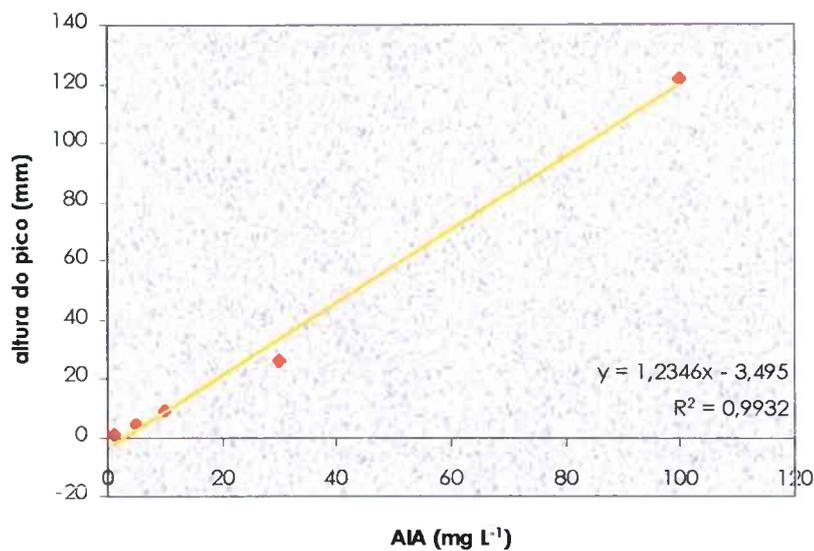


Figura 5.5 - Cromatograma do padrão de 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-acético em HPLC (Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5 μm (4,6 mm x 250 mm), com detecção por UV/VIS a 220 nm.



**Figura 5.6 - Curva de calibração para determinação de AIA por HPLC. Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5  $\mu$ m (4,6 mm x 250 mm). Detecção por UV/VIS a 220 nm.**

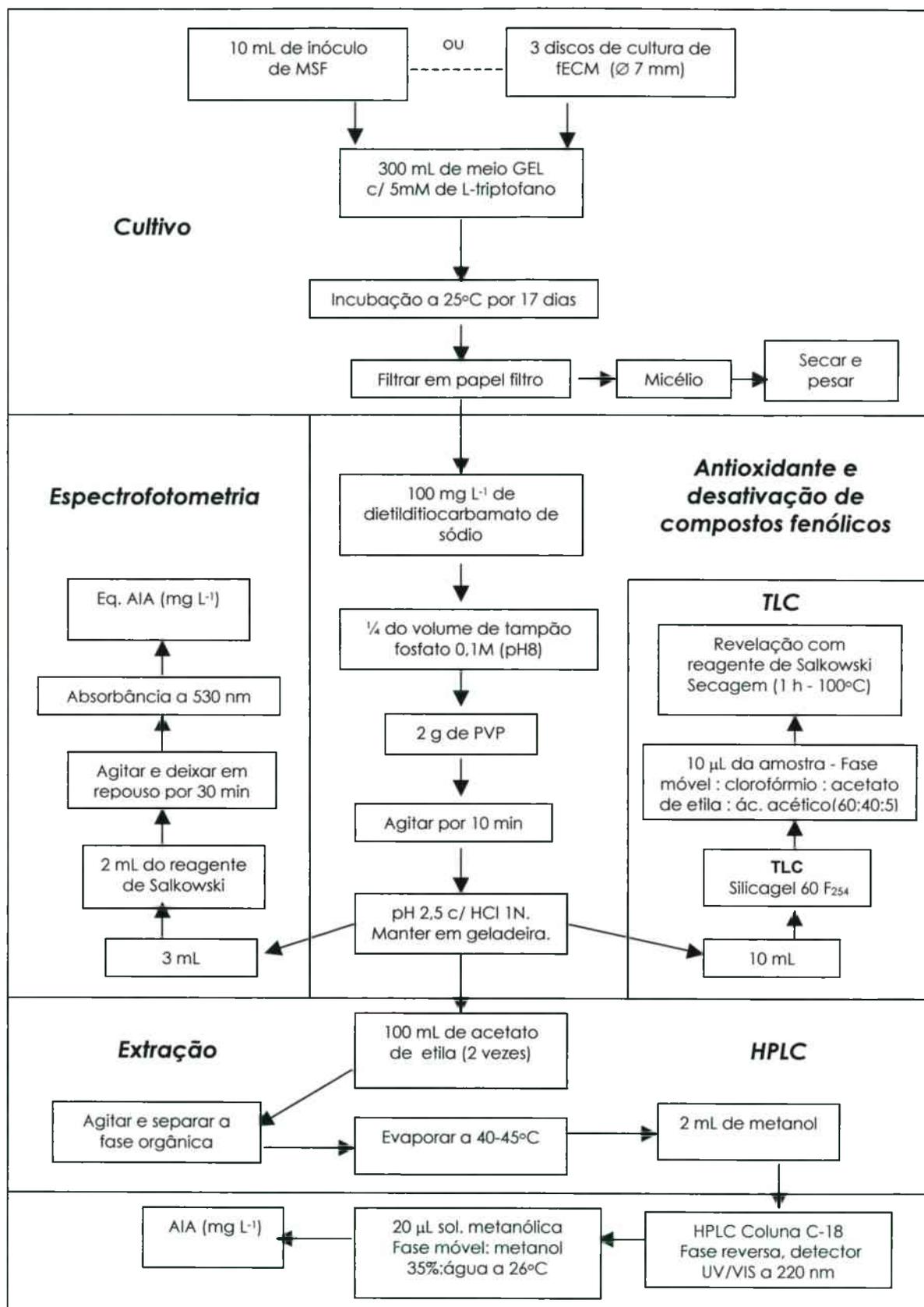


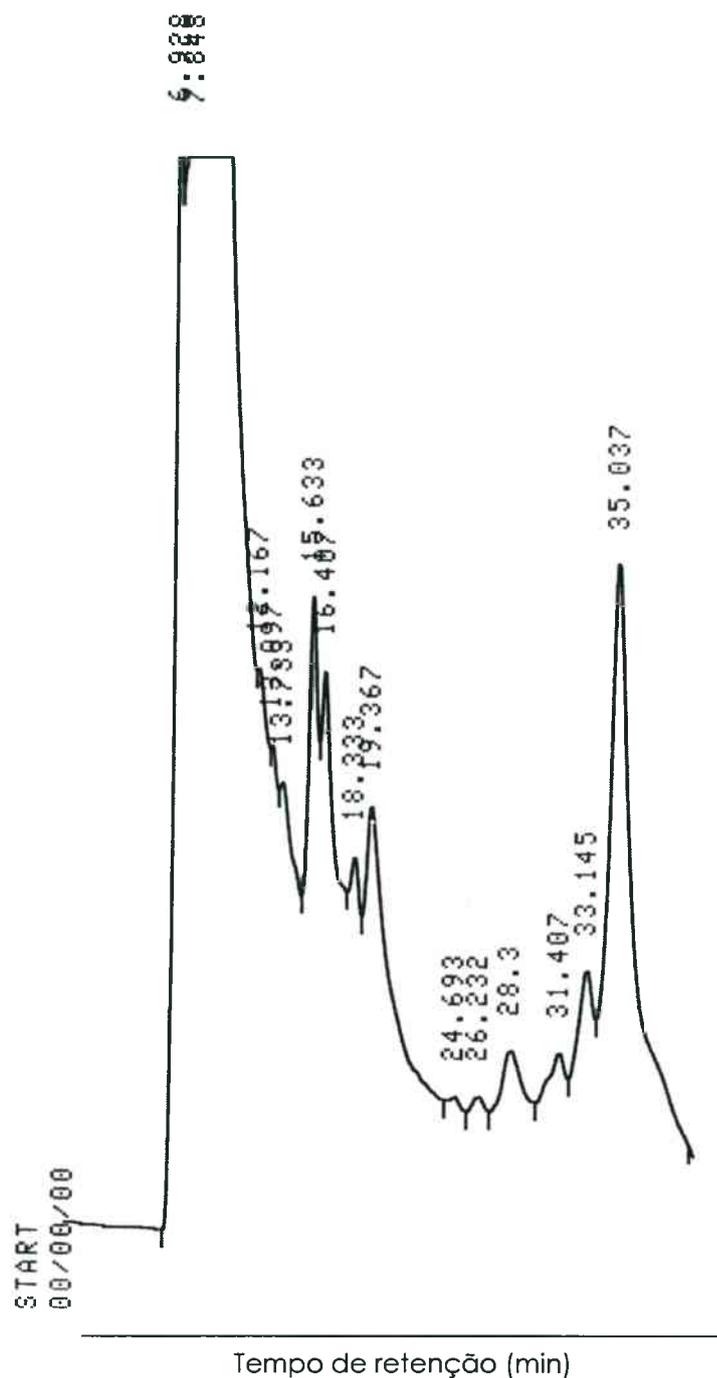
Figura 5.7 - Técnica para determinação de AIA, adaptada de STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984), RANDI & CROZIER (1991), SARWAR & KREMER (1995) e CATTELAN (1999).

## 5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

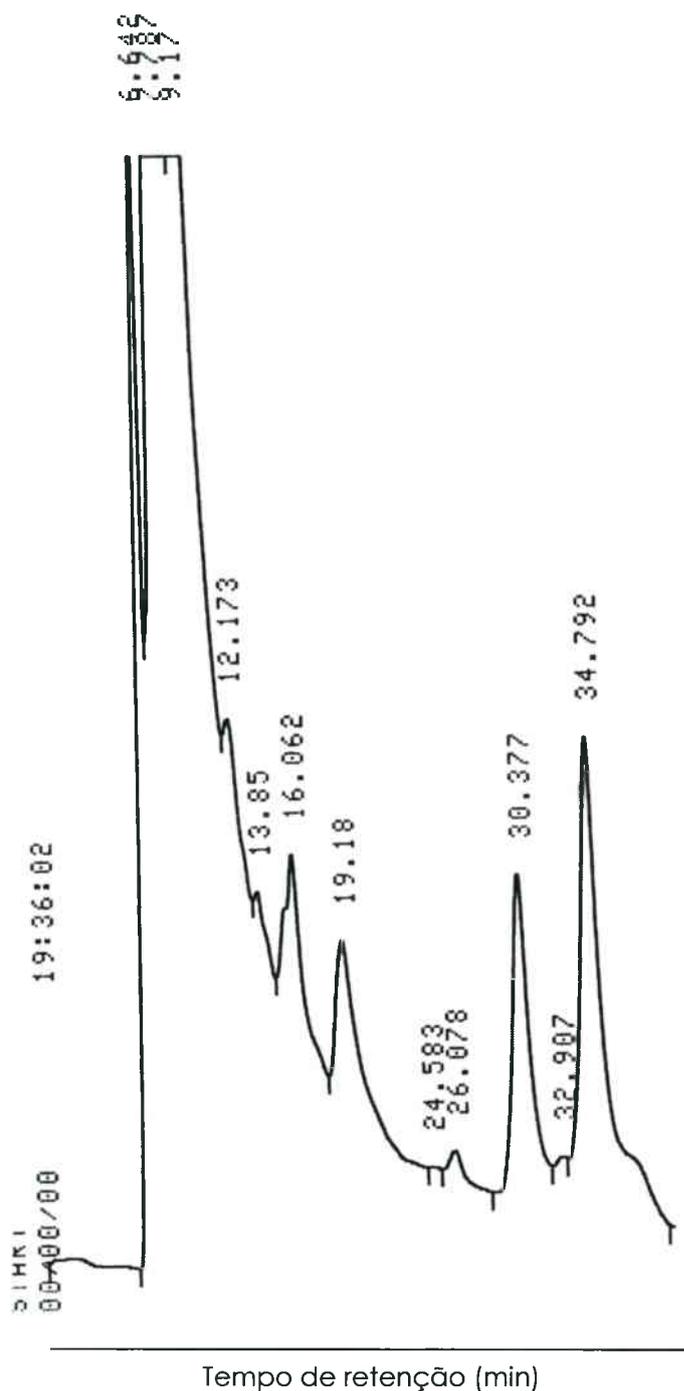
### 5.3.1 - Produção de ácidos orgânicos

Inúmeros problemas de metodologia ocorreram a partir da eluição, por HPLC, da primeira amostra de meio, correspondente à testemunha não inoculada. Teoricamente livre de ácidos orgânicos, a amostra de meio GEL apresentou, no cromatograma, sinal extremamente alto e contínuo, sobreposto às áreas que correspondem aos tempos de retenção dos padrões testados, especialmente na faixa que se estende dos 6 aos 10 min, coincidindo com os picos dos ácidos glicônico e oxálico (Figura 5.8). Como esse comportamento impediu a comparação entre os tempos de retenção, a determinação de ácidos orgânicos nas amostras foi impossível, nas condições utilizadas. Mesmo testando a detecção por UV/VIS em outro comprimento de onda (254 nm) e menor atenuação, o problema permaneceu constante, como pode-se verificar no cromatograma correspondente ao caldo de cultura do isolado UFSC-Rh106 (Figura 5.9).

Entretanto, inúmeras observações merecem ser registradas, para que possam ser evitadas em estudos posteriores. As análises demonstraram que as condições utilizadas não são as ideais. Nesse caso, seria interessante testar colunas cromatográficas diferentes. Um outro fator de erro foi devido aos procedimentos de cultivo dos microrganismos. BOLAN et al. (1994) utilizaram esse procedimento para a determinação de ácidos em extratos de solo, sem a utilização de um meio de cultura, o qual, neste caso, possui componentes que interferem na análise cromatográfica.



**Figura 5.8 - Cromatograma da testemunha não inoculada em HPLC (Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5  $\mu$ m (4,6 mm x 250 mm), com detecção por UV/VIS a 210 nm.**



**Figura 5.9 - Cromatograma do caldo de cultura do isolado UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) em HPLC. Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5  $\mu\text{m}$  (4,6 mm x 250 mm), com detecção por UV/VIS a 210 nm.**

Isso permite concluir que o meio GEL possui uma grande quantidade de compostos orgânicos complexos, provavelmente adicionados através do extrato de levedura (vide composição no Capítulo 2). Como se sabe, trata-se de uma fonte de carbono e, principalmente, de fatores de crescimento. Entre as fontes de carbono produzidas pelas leveduras no processamento industrial, há uma quantidade considerável de ácidos orgânicos e aminoácidos. Assim, um procedimento de extração e concentração, semelhante ao utilizado na determinação de substâncias indólicas, seria inútil, já que todos os ácidos orgânicos do extrato de levedura seriam extraídos em adição aos produzidos pelos microrganismos.

No entanto, os estudos anteriores relatados nesta dissertação (vide Capítulo 3) permitem afirmar que nos caldos de cultura existem substâncias específicas, produzidas pelos microrganismos testados, que não estão presentes na testemunha e são capazes de solubilizar fosfatos e proporcionar incrementos na absorção de fósforo pelas plantas de pínus (vide Capítulo 4). Se as substâncias detectadas na testemunha fossem as mesmas que foram produzidas pelos microrganismos testados, os resultados positivos obtidos nesses estudos não seriam possíveis.

A quantificação da produção de ácidos orgânicos, tida como um dos principais mecanismos de solubilização de fosfatos, continua sem resolução para os isolados testados. É um tema que pode ser retomado e ampliado no futuro. Não está totalmente claro que a acidificação seja o principal fator envolvido na disponibilização do fósforo por parte destes isolados. Para seguir a investigação sobre este assunto, torna-se necessária a repetição deste experimento com a utilização de um meio mais simples como, por exemplo, o TSA (meio de tripticaseína de soja), a 50% ou menos (BOLAN et al., 1994).

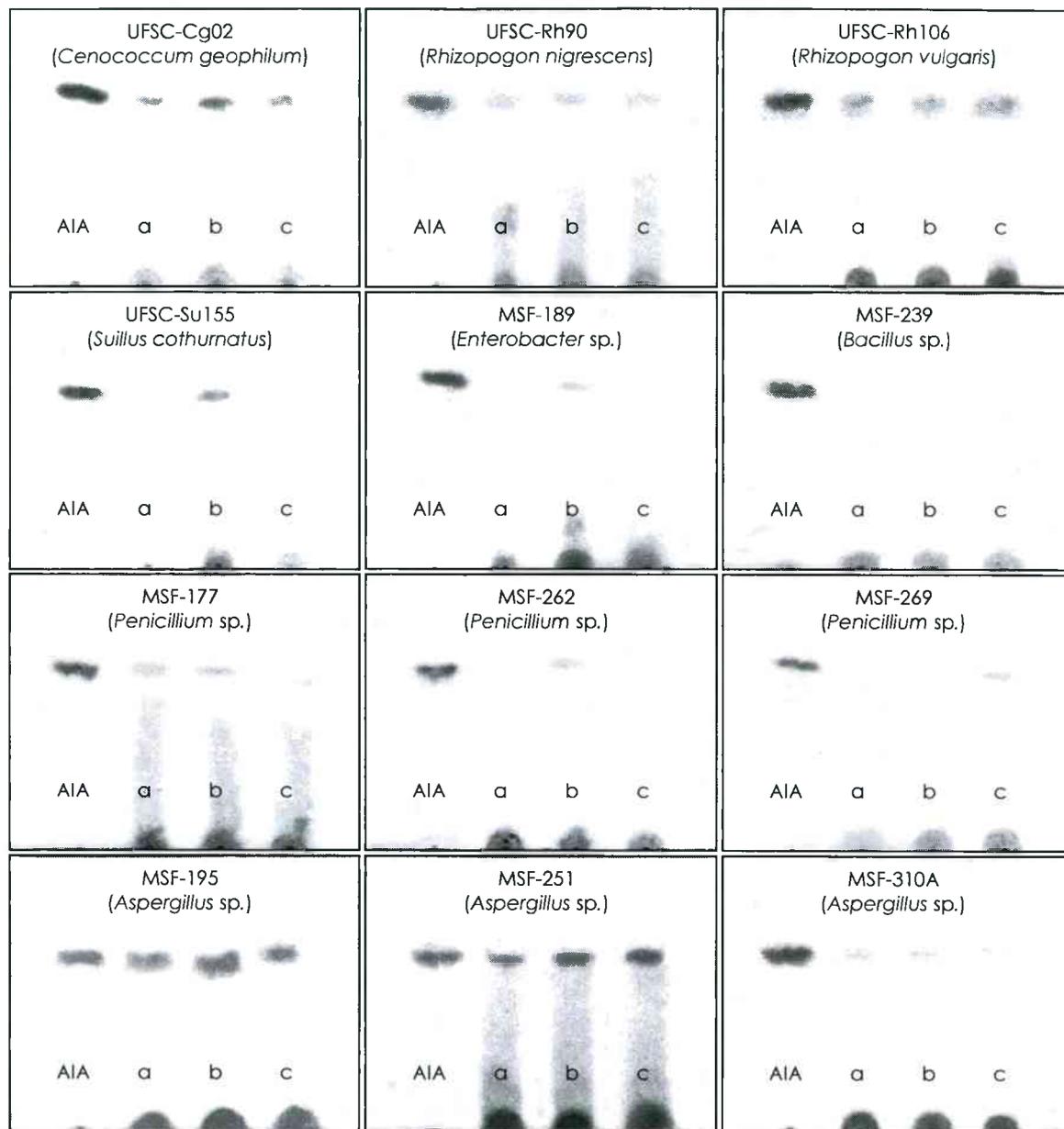
### 5.3.2 - Produção de ácido indol-3-acético

Na determinação qualitativa por TLC, ficou clara a produção de AIA por alguns dos isolados testados, tanto entre os fECM quanto entre os MSF (Figura 5.10). Essa observação é possível pela comparação do posicionamento da banda do padrão de AIA com as bandas obtidas pela eluição das amostras de caldo de cultura dos isolados ( $R_f$  0,62 a 0,67). Pode-se verificar que entre os fECM, três isolados apresentaram produção de substâncias indólicas nas três repetições: UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*), UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) e UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*). O isolado UFSC-155 (*Suillus cothurnatus*) apresentou produção visível em apenas uma das repetições (Tabela 5.1).

Entre os MSF, a produção de AIA foi detectada, nas três repetições, nas amostras de meio cultivadas com os isolados MSF-195, MSF-251 e MSF-310A (*Aspergillus* spp.). Três isolados apresentaram bandas equivalentes ao AIA em apenas uma ou duas repetições: MSF-189 (*Enterobacter* sp.), MSF-262 e MSF-269 (*Penicillium* spp.). O único isolado que não apresentou bandas de AIA em nenhuma repetição foi o MSF-239 (*Bacillus* sp.).

Como o volume eluído foi o mesmo em todas as amostras, verificou-se que algumas apresentam maior concentração de substâncias indólicas, o que pôde ser percebido visualmente pela maior densidade das bandas. É o caso do fECM UFSC-Rh106 e dos solubilizadores MSF-177, MSF-195 e MSF-251, os dois últimos com bandas tão densas quanto à apresentada pelo padrão.

A análise por TLC permite afirmar que os isolados UFSC-Cg02, UFSC-Rh90, UFSC-Rh106, MSF-195, MSF-251 e MSF-310A são produtores de substâncias indólicas. Com relação aos demais isolados, que não apresentaram bandas semelhantes ao padrão em todas as repetições, os resultados foram inconclusivos. Em vista disso, as amostras de todos os isolados, e não apenas dos considerados positivos, foram submetidas aos procedimentos de determinação quantitativa de AIA por espectrofotometria e HPLC.



**Figura 5.10 - Cromatogramas de substâncias indólicas produzidas por fECM e MSF, obtidos por TLC.**

Alguns resultados verificados na determinação qualitativa por TLC puderam ser confirmados nas análises por espectrofotometria e HPLC (Tabela 5.1). Na espectrofotometria, os valores de equivalentes de AIA produzidos pelos isolados variaram entre 0,03 e 4,79 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, os únicos valores significativos, tanto entre os MSF quanto entre os fECM, foram obtidos pelas amostras dos isolados MSF-251 e MSF-195 (*Aspergillus* spp.). O mesmo comportamento foi obtido nos resultados por HPLC, onde estes isolados produziram 2,5 e 4,61 mg de AIA L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os dados desses dois isolados conferem com as bandas mais densas reveladas por TLC (Figura 5.10), demonstrando que o método, apesar de qualitativo, é extremamente eficiente, podendo ser utilizado, com simplicidade e rapidez, em estudos preliminares de seleção de microrganismos promotores do crescimento vegetal.

Nos dados de produção específica, que estabelecem a quantidade produzida (mg de AIA L<sup>-1</sup>) por unidade de matéria seca (g), observa-se que, além dos dois *Aspergillus* spp., os isolados UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) e UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) também apresentam valores significativamente superiores aos demais isolados (Tabela 5.1).

Os valores de AIA apresentados pelos MSF neste estudo, obtidos por espectrofotometria e HPLC, são semelhantes aos obtidos por outros autores. Bactérias solubilizadoras de fosfatos estudadas por LEINHOS & VACEK (1994) apresentaram valores de Eq. AIA entre 0,02 e 3,98 mg L<sup>-1</sup>. STRZELCZYK et al. (1997), estudando a produção de auxinas (Eq. AIA) pelo fECM *Cantharellus cibarius* em diferentes meios, obtiveram valores entre 0,05 e 1754 mg L<sup>-1</sup>.

No entanto, os isolados MSF-195 e MSF-251, que apresentaram os maiores valores de produção de AIA neste estudo, não foram os que possibilitaram o maior crescimento e absorção de fósforo das plantas de *P. taeda* no experimento em casa-de-vegetação (vide Capítulo 4). Não houve correlação entre os dados obtidos nos dois experimentos, para nenhum dos parâmetros avaliados na planta. Como já se discutiu no Capítulo 4, em parte, os resultados em casa-de-vegetação podem ter sido mascarados pelo aumento na concentração de fósforo solúvel, uma vez que os isolados testados demonstraram grande potencial de solubilização (vide Capítulo 3). Havendo um

considerável aumento na disponibilidade de nutrientes, o efeito do AIA sobre o crescimento das plantas não foi evidente.

**Tabela 5.1 - Produção de ácido indol-3-acético (AIA) em meio GEL cultivado com fungos ectomicorrízicos (fECM) e microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF).**

Tratamento	Matéria seca (g)	TLC (a, b, c)	Espectrofotom. Eq. AIA (mg L <sup>-1</sup> )	HPLC AIA (mg L <sup>-1</sup> )	Prod. Específica AIA (mg L <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )
Testemunha*	-	- - -	0,00 b	0,02 c	-
UFSC-Cg02	0,26 e	+++	0,06 b	0,19 c	0,96 c
UFSC-Rh90	0,36 e	+++	0,10 b	0,42 c	1,17 c
UFSC-Rh106	0,67 d	+++	0,12 b	0,55 c	0,78 d
UFSC-Su155	0,74 cd	- + -	0,03 b	0,37 c	0,50 d
MSF-189	N.D.	- + -	0,06 b	N.D.	N.D.
MSF-239	N.D.	- - -	0,03 b	0,08 c	N.D.
MSF-177	0,93 c	+++	0,06 b	0,37 c	0,40 d
MSF-262	0,90 cd	- + -	0,06 b	0,31 c	0,36 d
MSF-269	1,50 a	- - +	0,00 b	N.D.	N.D.
MSF-195	1,22 b	+++	2,17 a	2,50 b	1,93 b
MSF-251	1,21 b	+++	4,79 a	4,61 a	3,69 a
MSF-310A	1,33 ab	+++	0,00 b	0,14 c	0,10 d

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições. (+): positivo na repetição, (-): negativo na repetição. N.D.: não determinado.

Com relação aos métodos de detecção, pode-se observar que, de modo geral, os isolados com pequena produção de AIA por espectrofotometria, apresentam valores superiores através dos procedimentos por HPLC. Somente os valores obtidos pelas amostras dos isolados MSF-195 e MSF-295 apresentaram comportamento contrário. Como as amostras submetidas à técnica de HPLC passaram pelo procedimento de extração, onde se pressupõe uma perda, seria esperado que todas apresentassem valores inferiores aos obtidos por espectrofotometria. Além disso, o método de detecção por espectrofotometria, após a reação colorimétrica proporcionada pela adição do reagente de Salkowski, determina substâncias indólicas em geral, o que justificaria um valor superior ao obtido por HPLC, específico em relação ao AIA.

O método de detecção por espectrofotometria, nas condições adotadas neste ensaio, demonstrou uma baixa sensibilidade. Por ter apresentado problemas de precipitação após a adição do reagente de Salkowski, é provável que uma parte do AIA tenha sido descartada após o procedimento de centrifugação. A precipitação pode ter ocorrido em decorrência das características do meio GEL, já que foi observada também na testemunha não inoculada. Outra possibilidade é que a reação colorimétrica proporcionada pela adição reagente de Salkowski, no meio acidificado, tenha sido minimizada na presença dessas substâncias presentes no meio de cultura. Nas análises de TLC, houve detecção de substâncias indólicas na amostra do isolado MSF-310A, não detectada por espectrofotometria. Uma possibilidade para minimizar esse problema seria uma alteração nos procedimentos, realizando a leitura por espectrofotometria das amostras em solução metanólica, após a extração e concentração. Assim como no ensaio anterior, a utilização de um meio diluído, e sem a adição do extrato de levedura, pode ser uma solução.

A grande quantidade e concentração de substâncias desconhecidas no meio GEL, que impediu a determinação de ácidos orgânicos, também foi observada nos cromatogramas de AIA por HPLC. Neste caso, a presença dessas substâncias só não impediu a detecção de AIA porque apresentaram tempos de retenção menores do que o apresentado pelo padrão (Figura 5.11).

Tem sido relatado que as características nutricionais e ambientais do meio de cultura são extremamente importantes na ativação ou inativação da produção de AIA pelos isolados, principalmente quando se pretende correlacionar os resultados neles obtidos com as situações existentes na natureza. A presença do L-triptofano, por exemplo, pode aumentar ou diminuir a produção desse hormônio vegetal, dependendo da espécie ou mesmo do isolado. STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ (1984) observaram que inúmeras bactérias de vida livre no solo e micorrizosféricas, bem como o fECM *Amanita muscaria*, só apresentavam produção de substâncias indólicas em meio de cultura com a adição de triptofano. Entretanto, STRZELCZYK et al. (1997) observaram que a síntese de auxinas pelo fECM *Cantharellus cibarius* (isolado 5400), nos meios MNM e Lamb foi diminuída na presença desse aminoácido a pH 5,0. No mesmo

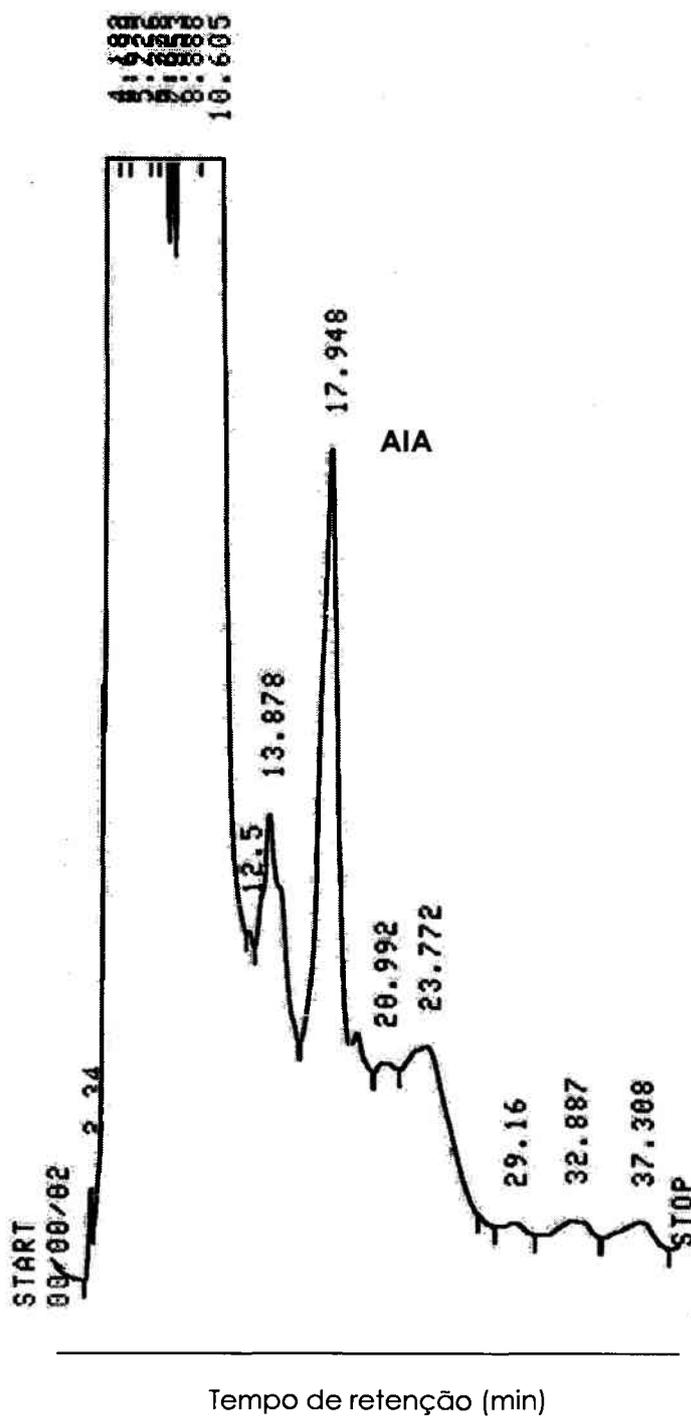


Figura 5.11 - Cromatograma do extrato de caldo de cultura do isolado MSF-195 (*Aspergillus* sp.) em HPLC (Coluna de fase reversa Sigma-Aldrich Nucleosil C18 - 5  $\mu\text{m}$  (4,6 mm x 250 mm), com detecção por UV/VIS a 220 nm.

trabalho, outro isolado (5410) da mesma espécie apresentou comportamento contrário, aumentando em até 7 vezes a produção de AIA no meio Lamb com adição do triptofano e pH 5,0. Com relação ao pH, STRZELCZYK, POKOJSKA, KAMPERT (1992) observaram que os fECM *Hebeloma crustuliniforme* (isolado 5397), *Cenococcum graniforme* e *Pisolithus tinctorius* apresentaram maior produção de AIA no meio Lamb com pH 7,0, quando comparados à obtida em pH 5,8 e 4,0.

As relações que acarretam benefícios mútuos para os organismos, assim como quaisquer outras interações ecológicas, são sempre complexas e difíceis de reproduzir e avaliar sob condições de laboratório. Apesar das dificuldades encontradas, é preciso salientar que os resultados obtidos neste estudo representam um avanço na elucidação dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal proporcionada pelos isolados testados.

#### 5.4 - CONCLUSÕES

1. O meio GEL não é adequado para a avaliação da produção de ácidos orgânicos por MSF e fECM;
2. Os solubilizadores MSF-195 e MSF-251 (*Aspergillus* spp.) e os fungos ectomicorrízicos UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) e UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) apresentam potencial de produção de AIA em meio de cultura.

## CAPÍTULO 6

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudando diferentes grupos de microrganismos promotores do crescimento vegetal - solubilizadores de fosfatos e fungos ectomicorrízicos - procurou-se estabelecer novos conhecimentos que contribuam para a utilização conjunta dos mesmos. O solo é um ecossistema diversificado, onde um grande número de interações biológicas ocorre ao mesmo tempo. É preciso entender melhor algumas destas interações para poder tirar maior proveito, estimulando os possíveis efeitos benéficos às plantas.

Um detalhe que merece ser destacado, neste estudo, é a avaliação da interação entre dois fungos distintos, um ectomicorrízico e outro solubilizador de fosfato de vida livre. Isso chama a atenção porque a maioria dos estudos publicados utiliza a combinação de um fungo ectomicorrízico e uma ou mais bactérias da rizosfera ou micorrizosfera. Os relatos de microrganismos auxiliares da micorrização referem-se especificamente às bactérias. No entanto, nos estudos aqui relatados, os melhores resultados na solubilização em meio líquido e na absorção de fósforo pelas plantas de *P. taeda* foram obtidos com a inoculação conjunta dos isolados UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*) e MSF-262 (*Penicillium* sp.). Essa interação veio apresentando um comportamento que despertou interesse desde o teste de crescimento em meio sólido, repetindo os efeitos positivos na solubilização em meio líquido e, posteriormente, na absorção de fósforo pelas plantas, onde ficou claro um efeito sinérgico entre esses isolados.

Outra constatação que pôde ser observada claramente, e que constitui um destaque positivo desta pesquisa, foi a capacidade e o potencial de solubilização de fosfatos pelos fungos ectomicorrízicos. Dos quatro isolados testados, três apresentaram grande potencial de solubilização do fosfato de cálcio. Comparados aos microrganismos de vida livre, há poucas espécies de fungos ectomicorrízicos relatados como solubilizadores de fosfatos. Estes sempre

têm sido destacados por sua capacidade de aumentar a absorção de nutrientes e água, dentre outros benefícios. Porém, são poucos os autores que citam a possibilidade de os mesmos promoverem o crescimento do hospedeiro pela solubilização de fosfatos. No presente estudo, alguns fungos ectomicorrízicos, como o UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) apresentaram potencial de solubilização superior aos obtidos pela maioria dos microrganismos solubilizadores de vida livre, especialmente selecionados por essa característica.

A constatação de que alguns isolados testados apresentam capacidade e potencial de produção de ácido indol-3-acético, uma substância promotora do crescimento vegetal, também corrobora as hipóteses levantadas em inúmeros trabalhos do grupo de Microbiologia do Solo da UFSC. Trata-se de uma primeira comprovação qualitativa e quantitativa entre os isolados existentes nas coleções desses laboratórios. A partir desses resultados, inúmeros outros isolados poderão ser testados, utilizando os métodos aqui descritos.

Mesmo na avaliação mais simples, no estudo do crescimento dos isolados em meios com diferentes composições, surgiram conclusões práticas. Não se conheciam dados sobre a possibilidade de cultivo dos isolados de microrganismos solubilizadores de fosfatos no meio MNM e dos fungos ectomicorrízicos no meio GEL. Também era desconhecido o comportamento de crescimento conjunto entre MSF e fECM em qualquer meio. Novas pesquisas do grupo, envolvendo bactérias auxiliares da micorrização, fazem agora uso dos meios aqui testados, sendo que dois desses são novos, propostos a partir da modificação dos dois meios conhecidos.

Na metodologia adotada, mesmo com os problemas relacionados a alguns procedimentos, há o aspecto positivo de que algumas técnicas, até então nunca utilizadas nos laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas, puderam ser testadas e avaliadas. Algumas necessitam de novas avaliações ou mesmo a repetição completa do experimento. Justamente por ter consciência do papel disseminador que uma Dissertação deve ter, procurou-se descrever todos essas técnicas e procedimentos de forma detalhada, sugerindo as prováveis correções e alterações, visando possibilitar a retomada e a ampliação dos inúmeros temas abordados.

Os dados econômicos sobre a produção de essências florestais no Brasil e, especificamente, em Santa Catarina, são impressionantes. Por se tratar de uma atividade ainda pouco divulgada pelos meios convencionais de comunicação, foi surpreendente verificar que se trata de um setor que movimenta um montante de recursos financeiros que, no País, ultrapassa o obtido pela cultura do café e, em Santa Catarina, pelos reconhecidos setores metal-mecânico e têxtil.

É provável que os dados sócio-econômicos relacionados ao setor florestal - e principalmente aos produtos advindos da industrialização de essências exóticas como o pínus e o eucalipto - não sejam melhor divulgados no Brasil em função das grandes polêmicas geradas a partir da implantação dessas espécies.

Historicamente, sabe-se que os problemas ecológicos relacionados ao setor florestal são inegáveis e bem mais antigos do que as plantações de espécies exóticas. São cinco séculos de exploração de recursos naturais em florestas nativas brasileiras. Sem qualquer possibilidade de reposição à mesma velocidade que ocorre a destruição, este fato vem acarretando prejuízos imensos à fauna e à flora do planeta.

No século 20, inúmeras florestas nativas brasileiras continuaram sendo destruídas, muitas das quais com o objetivo de implantar florestas de pínus e eucalipto, com recursos financiados pelo extinto IBDF. Entretanto, a destruição de florestas não foi um ato exclusivo do setor florestal. Ocorreu também como resultado da expansão das áreas agrícolas convencionais, estimulada pela chamada "revolução verde". Apesar dos problemas ecológicos, sabe-se que com a expansão demográfica ocorrida no século 20, não seria possível deixar de ampliar as áreas de plantio de alimentos e, também, de essências florestais.

O consumo de produtos industrializados do setor florestal, como papel, carvão e madeira, cresceu na mesma velocidade observada na população brasileira. Partindo do pressuposto de que esses produtos eram exclusivamente obtidos a partir de florestas nativas, pode-se afirmar que, atualmente, os florestamentos são mais do que necessários.

Outro problema ecológico surgiu com a instalação das indústrias de beneficiamento da madeira e produção de papel e celulose. Inicialmente, as indústrias florestais, assim como as de outros setores, não demonstraram qualquer

preocupação com o meio ambiente e em muito colaboraram com a destruição de ecossistemas. Essa realidade, embora ainda longe de ser resolvida na totalidade, vem sendo alterada nas últimas décadas, por imposição internacional. Com o surgimento das chamadas "certificações", as indústrias precisam rever seus procedimentos de produção e evitar a liberação de resíduos.

É estranho o fato de que, em se tratando de um setor econômico tão representativo, não haja maior envolvimento das empresas florestais em parcerias com instituições de ensino e pesquisa no Brasil e em Santa Catarina. Apesar do aparente desinteresse da iniciativa privada, todos os ensaios desenvolvidos nesta Dissertação foram pensados no sentido de estabelecer novas biotecnologias que possibilitem aumentar a produtividade de pínus, a partir de um sistema ecologicamente sustentável. Partiu-se do pressuposto que, quanto maior a produção por área cultivada, menor a necessidade de expansão das áreas de plantio.

Os isolados testados nesta pesquisa são apenas uma pequena parte da ampla coleção de microrganismos do solo coletados e mantidos pelos laboratórios de Microbiologia do Solo e de Ectomicorrizas da UFSC, após mais de uma década de trabalho. Podem bem representar o enorme potencial genético existente, ratificando a hipótese de que os mesmos apresentam potencial para promover o crescimento vegetal por diferentes mecanismos, com a possibilidade de serem utilizados como inoculantes num futuro próximo, visando garantir maior produtividade, menor custo de produção e o desenvolvimento sustentável das atividades agroflorestais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AE, N. & OTANI, T. - The role of cell wall components from groundnut roots in solubilizing sparingly soluble phosphorus in low soils. **Plant Soil**, **196**: 265-270, 1997.
- AGNIHOTRI, V.P. - Solubilization of insoluble phosphates by some fungi isolated from nursery seedbeds. **Can. J. Microbiol.**, **16**: 877-880, 1970.
- ALBUQUERQUE, C. - O fósforo e a vida. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 3, Brasília, 1986. **Anais**. Brasília, IBRAFOS, 1986. p. 25-50.
- ALEXANDER, M. - **Introducción a la microbiología del suelo**. México, Libros y Editoriales, 1980. 491 p.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. - **Introductory micology**. 4. ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1996. 869 p.
- ANDERSON, C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. - Intra and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. **Mycol. Res.** **103**: 1579-1587, 1999.
- ANDRADE, A.C.S.; QUEIROZ, M.H.; HERMES, R.A.L.; OLIVEIRA, V.L.; - Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. **Mycorrhiza**, **10**: 131-136, 2000.
- AROCENA, J.M. & GLOWA, K.R. - Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. **Forest Ecology and Management** **133**:61-70, 2000.
- ARORA, D. & GAUR, A.C. - Microbial solubilization of different inorganic phosphates. **Indian J. Exp. Biol.**, **17**: 1258-1261, 1979.
- ASEA, P.E.A.; KUCEY, R.M.N.; STEWART, J.W.B. - Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biol. Biochem.**, **20**: 459-464, 1988.
- BABU-KHAN, S.; YEO, T.C.; MARTIN, W.L.; DURON, M.R.; ROGERS, R.D.; GOLDSTEIN, A.H. - Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **App. Environ. Microbiol.**, **61**: 972-978, 1995.
- BAJPAI, P.D. & SUNDARA-RAO, W.V.B. - Phosphate solubilising bacteria. Part I. Solubilisation of phosphate in liquid culture by selected bacteria as affected by different pH values. **Soil Sci. Plant Nutr.**, **17**: 41-43, 1971.

- BANIK, S. & DEY, B.K. - Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. **Plant Soil**, **69**: 353-364, 1982.
- BARDIYA, M.C. & GAUR, A.C. - Isolation and screening of microorganisms dissolving low-grade rock phosphate. **Folia Microbiolo.** **19**: 386-389, 1974.
- BARKER, S.J. & TAGU, D. - The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbiosis. **J. Plant Growth Regul.**, **19**: 144-154, 2000.
- BARTHAKUR, H.P. - Solubilization of relatively insoluble phosphate by some fungi isolated from the rhizosphere of rice. **Indian J. Agric. Sci.**, **48**: 762-766, 1978.
- BAYA, A.M.; BOETHLING, R.S.; RAMOS-CORMENZANA, A. - Vitamin production in relation to phosphate solubilizing by soil bacteria. **Soil Biol. Biochem.**, **13**: 527-531, 1981.
- BELIMOV, A.A.; SEREBRENNIKOVA, N.V.; STEPANOK, V.V. - Interaction of associative bacteria and an endomycorrhizal fungus with barley upon dual inoculation. **Microbiol.**, **68**: 104-108, 1999.
- BÉREAU, M. & GARBAYE, J. - First observations on the root morphology and symbioses of 21 major tree species in the primary tropical rain forest of French Guyana. **Ann. Sci. For.** **51**: 407-416, 1994.
- BOJINOVA, D.; VELKOVA, R.; GRANCHAROV, I.; ZHELEV, S. - The bioconversion of tunisian phosphorite using *Aspergillus niger*. **Nutr. Cycling Agroecosys.**, **47**: 227-232, 1997.
- BOLAN, N.S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S.; BASKARAN, S. - Influence of low molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. **Biol. Fertil. Soils**, **18**: 311-319, 1994.
- BONFANTE, P. & PEROTTO, S. - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytol.**, **130**: 3-21, 1995.
- BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. - Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.**, **11**: 119-126, 1979.
- BRADY, N.C. - **Natureza e propriedades dos solos**. 7. ed. Rio de Janeiro, Freitas Bastos, 1989. 898 p.
- BRAGA, N.R.; MASCARENHAS, H.A.A.; BULISANI, E.A.; RAIJ, B.; FEITOSA, C.T.; HIROCE, R. - Eficiência agrônômica de nove fosfatos em quatro cultivos consecutivos de soja. **R. Bras. Ci. Solo**, **15**: 315-319, 1991.
- BREEMEN, N.van; LUNDSTRÖM, U.S.; JONGMANS, A.G. - Do plants drive podzolization via rock-eating mycorrhizal fungi? **Geoderma** **94**: 163-171, 2000.

- BREEMEN, N.van; FINLAY, R.; LUNDSTRÖM, U.S.; JONGMANS, A.G.; GIESLER, R.; OLSSON, M. - Mycorrhizal weathering: a true case of mineral plant nutrition? **Biogeochemistry** **49**: 53-67, 2000.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.L.; DELL, B. GROVE, T.; MALAJCZUK, N. - **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374 p.
- CARVALHO, P.C.T.; EIRA, A.F.; PELLEGRINO, D. - Solubilização quantitativa de fosfatos insolúveis por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. **Anais da ESALQ**, **26**: 173-185, 1969.
- CASIDA, L.E. - Phosphatase activity of some common soil fungi. **Soil Sci.**, **87**: 305-310, 1959.
- CATELAN, A.J. - **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina, Embrapa Soja, 1999. 36 p.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. - Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant Soil**, **184**: 311-321, 1996.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. - Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.**, **39**: 941-947, 1993.
- CHHONKAR, P.K. & SUBBA-RAO, N.S. - Phosphate solubilization by fungi associated with legume root nodules. **Can. J. Microbiol.**, **13**: 749-753, 1967.
- CLINE, G.R.; POWELL, P.E.; SZANISZLO, P.J.; REID, C.P.P. - Comparison of the abilities of hydroxamic and other natural acids to chelate iron and other ions in soil. **Soil Sci.**, **136**: 145-157, 1983.
- CUNNINGHAM, J.E. & KUIACK, C. - Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**: 1451-1458, 1992.
- DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, R.K. - Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant Soil**, **155/156**: 1-20, 1982.
- DEUBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. - Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, **163**: 387-392, 2000.
- DI SIMINE, C.D.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. - Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biol. Fertil. Soils**, **28**: 87-94, 1998.

- DINKELAKER, B.; ROMHELD, V.; MARSHNER, H. - Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). **Plant Cell Environ.**, **12**: 285-292, 1989.
- DIXON-HARDY, J.E.; KARAMUSHKA, V.I.; GRUZINA, T.G.; NIKOVSKA, G.N.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. - Influence of the carbon, nitrogen and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*. **Mycol. Res.**, **102**: 1050-1054, 1998.
- DOWNEY, J. & KESSEL, C.van. - Dual inoculation of *Pisum sativum* with *Rhizobium leguminosarum* and *Penicillium bilaji*. **Biol. Fertil. Soils**, **10**: 194-196, 1990.
- DOYLE, L.G.M.; SCHARF, R.; SILVA FILHO, G.N. - Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados de solos cultivados com fruteiras temperadas de Santa Catarina. **Biotemas**, **3**: 59-76, 1990.
- DUBEY, S.K. - Combined effect of *Bradyrhizobium japonicum* and phosphate-solubilizing *Pseudomonas striata* on nodulation, yield attributes and yield of rainfed soybean (*Glycine max*) under different sources of phosphorus in vertisols. **Indian J. Agr. Sci.**, **66**: 28-32, 1996.
- DUDDRIDGE, J.A.; MALIBARI, A.; READ, D.J. - Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. **Nature**, **287**: 232-238, 1991.
- DUFF, R.B.; WEBLEY, D.M.; SCOTT, R.O. - Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. **Soil Sci.**, **95**: 105-114, 1963.
- DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. - The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiol. Plant.**, **90**: 791-800, 1994.
- DUPONNOIS, R. & GARBAYE, J. - Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. **Can. J. Bot.** **68**: 2148-2152, 1990.
- EIRA, A.F. - Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., coords. - **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 243-256.
- ESPINOZA, W.; OLIVEIRA, A.J.; CONTINI, E. - **Produção e uso de rochas fosfáticas no Brasil**. Brasília, EMBRAPA, 1985. 106 p.
- FASSBENDER, H.W. - **Química de suelos - com ênfasis en suelos da América Latina**. Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1977. 398p.

- FRANCIS, R. & READ, D.J. - The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N., eds. - **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 11-25.
- FRANK, B. - On the root - symbiosis - dependending nutrition throught hypogeous fungi of certain trees. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, **3**: 128-145, 1885.
- FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. - Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biol. Fertil. Soils**, **24**: 358-364, 1997.
- GADD, G.M. - Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Adv. Microbial Physiol.**, **41**: 47-92, 1999.
- GARBAYE, J. - Competitivité des champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Rev. For. Franç.**, **36**: 33-43, 1984.
- GARBAYE, J. - Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D.G., ed. - **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris, Lavoisier, 1990. p. 197-248.
- GARBAYE, J. - Biological interactions in the mycorrhizosphere. **Experientia**, **47**: 370-375, 1991.
- GARBAYE, J. & BOWEN, G.D. - Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation. **Can. J. For. Res.**, **17**: 941-943, 1987.
- GAUR, A.C.; MEERA MADAN, B.; OSTWAL, K.P. - Solubilization of phosphatic compounds by native microflora of rock phosphates. **Indian J. Experim. Biol.**, **11**: 427-429, 1973.
- GAY, G.; NORMAND, L.; MARMEISSE, R.; SOTTA, B.; DEBAULD, J.C. - Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. **New Phytol.**, **128**: 645-657, 1994.
- GIACHINI, A.J. - **Levantamento de fungos ectomicorrízicos em plantações de Pinus e Eucalyptus em Santa Catarina**. Florianópolis, 1995. (Trabalho de Conclusão de Curso - Agronomia - Universidade Federal de Santa Catarina). 69 p.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. - Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, **92**: 1166-1177, 2000.

- GIOVANETTI, M. & MOSSE, B. - An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. **New Phytol.**, **84**: 489-500, 1980.
- GIULIETTI, M.; WEYNE, G.R.; GUARDANI, R. - Rotas opcionais visando o aproveitamento de fosfatos brasileiros na produção de fertilizantes. In: SEMINÁRIOS SOBRE A RECUPERAÇÃO DE FÓSFORO, São Paulo, 1987. **Anais**. São Paulo, IBRAFOS, 1987. p.15-19.
- GOLDSTEIN, A.H. - Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **Am. J. Altern. Agric.**, **1**: 57-65, 1986.
- GOLDSTEIN, A.H. - Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: \_\_\_\_\_, ed. - **Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology**. Washington, ASM Press, 1994. p. 197-203.
- GOLDSTEIN, A.H. - Recent progress in understanding the molecular-genetics and biochemistry of calcium-phosphate solubilization by gram-negative bacteria. **Biol. Agr. Hort.**, **12**: 185-193, 1995.
- GOLDSTEIN, A.H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. - Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiol. Ecol.**, **30**: 295-300, 1999.
- GOLDSTEIN, A.H. & LIU, S.T. - Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. **Bio/Technology**, **5**: 72-74, 1987.
- GOLDSTEIN, A.H.; ROGERS, R.D.; MEAD, G. - Separating phosphate from ores via bioprocessing. **Bio/Technology**, **11**: 1250-1254, 1993.
- GOMES, N.C.; OLIVEIRA, V.L.; SILVA FILHO, G.N. - Solubilization of natural phosphates by ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus* spp. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MANEGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, Perth, Western Australia, 1992. **Abstracts**. Perth, The Australian Institute of Agricultural Science, 1992. p. 58.
- GONZALES-EGUIARTE, D. & BAREA, J.M. - Fertilization biologica con fosfobacterias produtoras de fitohormonas en suelos deficientes en fósforo. Influencia de la adición de fósforo y materia organica. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, **17**: 227-232, 1975.
- GOODMAN, D.M.; DURALL, D.M.; TROFYMOW, J.A.; BERCH, S.M. - **A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae**. Ottawa, Mycologue Publications, 1996/1998. 75 p.

- GOTTSCHALK, G. - **Bacterial metabolism**. 2. ed. New York, Springer-Verlag, 1985. 359 p.
- GRIFFIN, D.H. - **Fungal physiology**. 2. ed. New York, Wiley-Liss, 1994. 458 p.
- GUPTA, R.; REHKA, S.; APARNA, S.; KUHAD, R.C. - A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** **40**: 255-260, 1994.
- GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L.J. - Cloning of mineral phosphate solubilizing genes from *Synechocystis* PCC 6803. **Curr. Sci.** **74**: 1097-1099, 1998.
- HARVEY, L.M. - Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotech. Adv.** **9**: 13-29, 1991.
- HASELWANDTER, K. & WINKELMANN, G. - Ferricrocin - an ectomycorrhizal siderophore of *Cenococcum geophilum*. **BioMetals**, **15**: 73-77, 2002.
- HOEFlich, V.A.; SCHAITZA, E.G.; MATTOS, P.P. - **Pesquisa florestal no Brasil: uma visão preliminar**. Instituto de Pesquisas Florestais (*On line*). Disponível na internet via <http://www.ipef.br>. Arquivo capturado em setembro de 2000.
- HOOKEr, J.E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D. - Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root system morphology. **Plant Soil**, **145**: 207-214, 1992.
- ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. - Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biol. Biochem.**, **27**: 265-270, 1995.
- ILLMER, P. & SCHINNER, F. - Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol. Biochem.**, **24**: 389-395, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA/IBGE - **Produção extrativa vegetal e silvicultura**. (*On line*). Disponível na internet via <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em maio de 2001.
- INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS/IPEF - **Consumo de carvão vegetal de origem nativo e reflorestado no Brasil**. (*On line*). Disponível na internet via <http://www.ipef.br>. Arquivo capturado em fevereiro de 2002a.
- INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS/IPEF - **Principais Estados exportadores de móveis no Brasil - 1997**. (*On line*). Disponível na internet via <http://www.ipef.br>. Arquivo capturado em fevereiro de 2002b.
- JANERETTE, C.A. - An introduction to mycorrhizae. **The American Biology Teacher**, **53**: 13-19, 1991.

- JANOS, D.P. - V.A. mycorrhizas in humid tropical ecosystems. In: SAFIR, G.R., ed. - **Ecophysiology of VA mycorrhizal plants**. Boca Raton, CRC Press, Inc., 1987. p. 108-114.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H.B. - *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. **FEMS Microbiol. Let.**, **153**: 273-277, 1997.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G.A. - Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biol. Fertil. Soils**, **26**: 79-87, 1998.
- KIM, K.Y.; McDONALD, G.A.; JORDAN, D. - Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biol. Fertil. Soils**, **24**: 347-352, 1997.
- KOIDE, R.T.; SUOMI, L.; BERGHAGE, R. - Tree-fungus interactions in ectomycorrhizal symbiosis. In: ROMEO et al., eds. - **Phytochemical signals and plant-microbe interactions**. New York, Plenum Press, 1998. p. 57-70.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖHMELD, V. - Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytol.**, **116**: 637-645, 1990.
- KROPP, B.R. & LANGLOIS, C.G. - Ectomycorrhizae in reforestation. **Can. J. For. Res.**, **20**: 438-451, 1990.
- KUCEY, R.M.N. - Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Can. J. Soil Sci.**, **63**: 671-678, 1983.
- KUCEY, R.M.N. - Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilajii* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 2699-2703, 1987.
- KUNDU, B.S. & GAUR, A.C. - Establishment of nitrogen-fixing and phosphate-solubilising bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. **Plant Soil**, **57**: 223-230, 1980.
- KUNDU, B.S. & GAUR, A.C. - Rice response to N<sub>2</sub>-fixing and P-solubilizing microorganisms. **Plant Soil**, **79**: 227-234, 1984.
- LAHEURTE, F. & BERTHELIN, J. - Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. **Plant Soil**, **105**: 11-17, 1988.

- LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R.D.; KUYPER, T.W.; BREEMEN, N.van. - Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **TRENDS in Ecology and Evolution** **16**: 248-254, 2001.
- LAPEYRIE, F.F. & BRUCHET, G. - Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. **New Phytol.**, **100**: 585-593, 1985.
- LAPEYRIE, F.F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. - Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Can. J. Bot.**, **69**: 342-346, 1991.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR., G. - The use of mycorrhizas in the temperate and tropical forests. **Symbiosis**, **3**: 179-206, 1987.
- LEINHOS, V. - Effects of pH and glucose on auxin production of phosphate-solubilizing rhizobacteria *in vitro*. **Microbiol. Res.**, **149**: 135-138, 1994.
- LEINHOS, V. & VACEK, O. - Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiol. Res.**, **149**: 31-35, 1994.
- LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. - Comparison between the utilization of phosphorus from insoluble phosphates by ectomycorrhizal fungi and rhizobacteria. In: EMS/1<sup>o</sup>SEM, 1, Dijon, 1985. - **Mycorrhizae: Physiology and genetics = Les mycorrhizes: Physiologie et génétique**. Paris, INRA, 1986. p. 345-349.
- LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. - Interactions between ectomycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacterial: phosphorus mobilization from different inorganic phosphates. In: GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; NANNIPIERI, P., eds. - **Current perspectives in environmental biogeochemistry**. Viterbo, Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia, 1988. p. 257-269.
- LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. - Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. **Plant Soil**, **117**: 103-110, 1989.
- LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. - Rhizodeposition and net release of soluble organic-compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. **Biol. Fertil. Soils**, **15**: 259-267, 1993.
- LINDERMAN, R.G. - Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopatol.**, **78**: 366-371, 1988.
- LOBO, M.G. - Evolução e perspectivas da indústria nacional de fosfatos. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 3, Brasília, 1986. **Anais**. Brasília, IBRAFOS, 1986. p. 77-94.

- LOBO, M.G. - Panorama da recuperação do fósforo. In: SEMINÁRIO SOBRE RECUPERAÇÃO DO FÓSFORO, São Paulo, 1987. **Anais**. São Paulo, IBRAFOS, 1987. p. 15-19.
- LOPES, A.S. & GOEDERT, W. - Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados para culturas anuais, perenes, pastagens e reflorestamento. In: SEMINÁRIO SOBRE RECUPERAÇÃO DO FÓSFORO, São Paulo, 1987. **Anais**. São Paulo, IBRAFOS, 1987. p. 24-49.
- LOUW, H.A. & WEBLEY, D.M. - A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. **J. Appl. Bact.**, **22**: 227-233, 1959.
- MALAVOLTA, E. - Fertilizantes, corretivos e produtividade: mitos e fatos. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20, Piracicaba, 1992. - **Adubação, produtividade e ecologia: simpósios**. Campinas, Fundação Cargill, 1992. p. 89-154.
- MALAVOLTA, E. - **Manual de química agrícola**. São Paulo, Ceres, 1976. 528 p.
- MALAVOLTA, E. & PONCHIO, C.O. - Utilização eficiente do fósforo no sistema solo-planta. In: SEMINÁRIO SOBRE RECUPERAÇÃO DO FÓSFORO, São Paulo, 1987. **Anais**. São Paulo, IBRAFOS, 1987. p. 75-132.
- MARSCHNER, H. - **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 1995. 889 p.
- MARX, D.H. - Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P., ed. - **Tropical mycorrhiza research**. Oxford, Clarendon Press, 1980, p. 13-71.
- MARX, D.H. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathol.**, **59**: 153-163, 1969.
- MARX, D.H. & CORDELL, C.E. - Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings from spores sprayed at different times and rates. USDA - Forest Service, **Research note SE-356**, 1990. p. 1-7.
- MARX, D.H.; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. - Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: LEATHAM, G. F., ed. - **Frontiers in industrial mycology**. New York, Chapman & Hall, 1992. p. 78-98.
- MASAOKA, Y.; KOJIMA, M.; SUGIHARA, S.; YOSHIHARA, T.; KOSHINO, M.; ICHIHARA, A. - Dissolution of ferric phosphate by alfafa (*Medicago sativa* L.) root exudates. **Plant Soil**, **155/156**: 75-78, 1993.

- MAXWELL, D.P. & BATEMAN, D.F. - Influence of carbon source and pH on the accumulation of oxalic acid in culture filtrates of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathol.**, **57**: 821, 1967.
- MELFI, A.J.; CERRI, C.C.; POGGIANI, F. - **Proteção e uso da terra** (On line). Disponível na internet via <http://www.usp.br/prpesq/uspfasobre/temas/meio/prod/massamb/terra.htm>. Arquivo capturado em setembro de 2000.
- MIKANOVÁ, O. & KUBÁT, J. - Inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains with different P-solubilizing activity and its effect on soybean yields. **Sci. Agric. Bohem.**, **25**: 63-67, 1994a.
- MIKANOVÁ, O. & KUBAT, J. - Phosphorus solubilization from hardly soluble phosphates by soil microflora. **Rostl. Výroba**, **40**: 833-840, 1994b.
- MIKOLA, P. - Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practices. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T., eds. - **Ectomycorrhizae, their ecology and physiology**. New York, Academic Press, 1973. p. 383-411.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. - **Comércio exterior agrícola** (On line). Disponível na internet via <http://www.agricultura.gov.br/Estatisticas/>. Arquivo capturado em fevereiro de 2002.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. - **Exportação brasileira: Santa Catarina, principais produtos exportados**. (On line). Disponível na internet via <http://www.mdic.gov.br>. Arquivo capturado em abril de 2002.
- MOLINA, R. & TRAPPE, J.M. - Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: DURYEY, M.L.; LANDIS, T.D., eds. - **Forestry nursery manual: production of bareroot seedlings**. Lancaster, Martinus Nijhoff, 1984. p. 211-213.
- MOLLA, M.A.Z. & CHOWDHURY, A.A. - Microbial mineralization of organic phosphate in soil. **Plant Soil**, **78**: 393-399, 1984.
- MORITA, T. - **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda., 1968. 627 p.
- MÜLLER, H.M. & FROSCH, S. - Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. II. Involvement of the Tricarboxylic Acid Cycle. **Arch. Microbiol.**, **104**: 159-162, 1975.
- NAHAS, E. - Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **12**: 567-572, 1996.

- NAHAS, E. - Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. - **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS / Lavras, UFLA/DCS, 1999. p. 467-486.
- NAHAS, E. & ASSIS, L.C. - Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. **Rev. Microbiol.**, **23**: 37-42, 1992a.
- NAHAS, E. & ASSIS, L.C. - Solubilização de fosfato de rocha por *Aspergillus niger* em diferentes tipos vinhaça. **Pesq. Agropec. Bras.**, **27**: 325-331, 1992b.
- NAHAS, E.; BANZATTO, D.A.; ASSIS, L.C. - Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. **Soil Biol. Biochem.**, **22**: 1101-1990, 1990.
- NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. - Microrganismos solubilizadores de fosfatos e produtores de fosfatases de vários solos. **R. Bras. Ci. Solo**, **18**: 43-48, 1994.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V.L.; ANJOS, J.T.; SILVA FILHO, G.N. - Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesq. Agropec. Bras.**, **37**: 841-845, 2002.
- NAUTIYAL, C.S. - An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Let.**, **170**: 265-270, 1999.
- NAUTIYAL, C.S.; BHADARIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R.; VERMA, D. - Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiol. Let.**, **182**: 291-296, 2000.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. - Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Tree**, **10**: 407-411, 1995.
- NGUYEN, C.; YAN, W.; LETACON, F.; LAPEYRIE, F. - Genetic-variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycellia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. **Plant Soil**, **143**: 193-199, 1992.
- NUERNBERG, N.J.; VIDOR, C.; STAMMEL, J.C. - Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, **8**: 197-203, 1984.
- OLIVEIRA, V.L. - **Interactions entre les micro-organismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne chez le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex Saint-Amans) Qué. et *Paxillus involutus* Batsch. ex Fr.** Nancy, 1988. (Tese - Doutorado - Université de Nancy I). 118 p.

- OLIVEIRA, V.L. & GARBAYE, J. - Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses mycorhiziennes. **Eur. J. For. Path.**, **19**: 54-64, 1989.
- OLIVEIRA, V.L. & GIACHINI, A.J. - Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. - **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS / Lavras, UFLA/DCS, 1999. p. 775-796.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; BELLEI, M.M. - Patterns of arbuscular and ectomycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. **Ann. Sci. For.**, **54**: 473-481, 1997.
- 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 J. Microbiol. Biotechnol.**, **14**: 211-218, 1998.
- PAUL, N.B. & SUNDARA-RAO, W.V.B. - Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. **Plant Soil**, **35**: 127-132, 1971.
- PAULINO, V.T. & AZCON, R. - Respostas de *Centrosema pubescens* Benth. à inoculação de micorriza vesículo-arbuscular e microorganismos solubilizadores de fosfatos em meio com fosfatos de rocha. **Rev. Bras. Ci. Solo**, **11**: 263-267, 1987.
- PASSOS, J.F.M.; SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. - Solubilização de fosfatos por fungos ectomicorrízicos. In: FERTBIO, Santa Maria, 2000. **Guia do congressista**. Santa Maria, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2000. p. 120.
- PETERSON, R.L. & FARQUHAR, M.L. - Mycorrhizas - Integrated development between roots and fungi. **Mycologia**, **86**: 311-326, 1994.
- PETERSON, R.L.; PICHÉ, Y.; PLENCHETTE, C. - Mycorrhizae and their potential use in the agriculture and forestry industries. **Biotechnol. Adv.** **2**: 101-120, 1984.
- PRADELLA, J.G.C.; ZUCCOLO, M.; LOPES, S.A.R.; OLIVEIRA, M.S. *Pisolithus tinctorius* vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. **Rev. Microbiol.**, **22**: 7-11, 1991.
- PUNJA, Z.K. & JENKINS, S.F. - Influence of medium composition on mycelial growth and oxalic acid production in *Sclerotium rolfsii*. **Mycologia**, **76**: 947-950, 1984.
- RAIJ, B.van. - **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo/Piracicaba, Ceres/POTAFOS, 1991. 343 p.
- RAIJ, B.van; ROSAND, P.C.; LOBATO, E., eds. - Adubação fosfatada no Brasil. In: **Adubação fosfatada no Brasil**. Brasília, EMBRAPA, 1982. p. 9-28.

- RAJAN, S.S.S. - Use of low grade phosphate rocks as biosuper fertilizer. **Fertilizer Res.**, **2**: 199-210, 1981.
- RALSTON, D.B. & McBRIDE, R.P. - Interaccion of mineral phosphate dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant Soil**, **45**: 493-507, 1976.
- RANDI, A.M. - **Germinação de *Stevia rebaudiana* Bert.** Campinas, 1980. (Dissertação - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas). 88 p.
- RANDI, A.M. & CROZIER, A. - Gibberellins, indole-3-acetic acid and the germination of spores of the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Revta. brasil. Bot.**, **14**: 67-72, 1991.
- RAO, A.V.; VENKATESWARLU, B.; KAUL, P. - Isolation of a phosphate dissolving soil actinomycete. **Curr. Sci.**, **51**: 1117-1118, 1982.
- RASANAYAGAM, S. & JEFFRIES, P. - Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. **Mycol. Res.**, **96**: 971-976, 1992.
- REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R.R.; TANGUAY, P.; ANTOUN, H. - Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-mutants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, **28**: 291-295, 1999.
- RIEDER, J.H. - Destinação racional dos jazimentos fosfáticos nacionais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 3, Brasília, 1986. **Anais**. Brasília, IBRAFOS, 1986. p.139-170.
- RITTER, G. & LYR, H. - The significance of mycorrhizal fungi for the utilisation of different sources of phosphate by *Pinus silvestris* L. In: MACURA, J. & VANCURA, V., eds. - **Plant microbe relationships**. Prague, Czechoslovakian Academy of Sciences, 1965. p. 277-282.
- ROSSI, M.J. - **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator tipo airlift**. Florianópolis, 2001. (Dissertação - Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina). 93 p.
- ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. - Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift biorreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (In Press), 2002.
- SALIH, H.M.; YAHYA, A.I.; ABDUL-RAHEM, A.M.; MUNAM, B.H. - Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. **Plant Soil**, **120**: 181-185, 1989.
- SARWAR, M. & KREMER, R.J. - Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, **20**: 282-285, 1995.

- SAYER, J.A.; RAGGETT, S.L.; GADD, G.M. - Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method of solubilizing ability and metal tolerance. **Mycol. Res.**, **99**: 987-993, 1995.
- SHAW, T.M.; DIGHTON, J.; SANDERS, F.E. - Interactions between ectomycorrhizal and saprophytic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*). **Mycol. Res.**, **99**: 159-165, 1995.
- SILVA FILHO, G.N. - **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. Porto Alegre, 1998. (Tese - Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul). 140 p.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. - Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos solubilizadores de fosfatos. In: FERTBIO, Santa Maria, 2000. **Anais**. Santa Maria, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2000. p. 8.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R.; KAMINSKI, A. - Seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos em solo esterilizado cultivado com diferentes espécies vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 23, Porto Alegre, 1991. **Programa e resumos**. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1991. p. 205.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R.; KAMINSKI, A. - Produção de matéria seca a absorção de fósforo pelo azevém, trevo branco e macieira cultivados em solos inoculados com microrganismos solubilizadores de fosfatos. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20, Piracicaba, 1992. **Anais**. Piracicaba, ESALQ/CENA, 1992. p. 424.
- SILVA FILHO, G.N.; SCHARF, R.; NARLOCH, C.; KAMINSKI, A.; DOROW, R. - População de microrganismos solubilizadores de fosfatos em viveiros e florestas de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24, Goiânia, 1993. **Resumos**. Goiânia, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993. p. 273-274.
- SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. - As práticas de manejo do solo na população microbiana. **R. Bras. Ci. Solo**, **8**: 291-296, 1984.
- SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. - Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **R. Bras. Ci. Solo**, **24**: 311-329, 2000.
- SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. - Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesq. Agropec. Bras.**, **36**: 1495-1508, 2001.
- SINGAL, R.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. - Rock phosphate solubilization under alkaline conditions by *Aspergillus japonicus* and *A. foetidus*. **Folia Microbiol.**, **39**: 33-36, 1994.

- SINGH, S. & KAPOOR, K.K. - Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. **Mycorrhiza**, **7**: 2499-253, 1998.
- SINGH, S. & KAPOOR, K.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. **Biol. Fertil. Soils**, **28**: 139-144, 1999.
- SINGH, S.; MISHRA, M.M.; KAPOOR, K.K. - Solubilization of insoluble by mesophilic fungi. **Rev. Écol. Biol. Sol**, **19**: 17-25, 1982.
- SLANKIS, V. - Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T., eds. - **Ectomycorrhizae: their ecology and physiology**. New York, Academic Press, 1973. p. 231-298.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. - **Mycorrhizal symbiosis**. 2 ed. Cambridge, Academic Press, 1997. 605 p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - **Setor florestal brasileiro (On line)**. Disponível na internet via [http://www.sbs.org.br/setor\\_florestal.htm](http://www.sbs.org.br/setor_florestal.htm). Arquivo capturado em abril de 2002.
- SPERBER, J.I. - Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Austr. J. Agric. Res.**, **9**: 782-787, 1958a.
- SPERBER, J.I. - The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Austr. J. Agric. Res.**, **9**: 778-781, 1958b.
- STRZELCZYK, E.; DAHM, H.; PACHLEWSKI, R.; ROZYCKI, H. - Production of indole compounds by the ectomycorrhizal fungus *Cantharellus cibarius* Fr. **Pedobiologia**, **41**: 402-411, 1997.
- STRZELCZYK, E. & LENIARSKA, U. - Production of B-group vitamins by mycorrhizal fungi and actinomycetes isolated from the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Soil**, **86**: 387-394, 1985.
- STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A.; KAMPERT, M. - The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi. **Symbiosis**, **14**: 201-215, 1992.
- STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A.; ROZYCKI, H.; PERRY, D.A.; LI, C.Y. - Growth of mycorrhizal fungi in dixenic cultures with bacteria in media of different composition. **Acta Microbiol. Polon.**, **42**: 41-50, 1993.
- STRZELCZYK, E. & POKOJSKA-BURDZIEJ, A. - Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Soil**, **81**: 185-194, 1984.

- STRZELCZYK, E. & ROZYCKI, H. - Production of B-group vitamins by bacteria isolated from soil, rhizosphere, and mycorrhizosphere of Pine (*Pinus sylvestris* L.). **Zbl. Mikrobiol.**, **140**: 293-301, 1985.
- SURANGE, S. - Comparative phosphate solubilizing capacity of some soil fungi. **Curr. Sci.**, **54**: 1134-1135, 1985.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; AKASAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. - Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, **12**: 15-22, 1982.
- SYLVIA, D.M. - Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: a "biofertilizer" perspective. In: SIQUEIRA, J.O. et al., eds. - **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS / Lavras, UFLA/DCS, 1999. p. 705-724.
- TAHA, S.M.; MAHMOUD, S.A Z.; HALIM EL-DAMATY, A.; ABD EL-HAFEZ, A.M. - Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soils. **Plant Soil**, **31**: 149-159, 1969.
- TAM, C.F. & GRIFFITHS, D.A. - Mycorrhizal associations in Hong Kong Fagaceae. IV. The mobilization of organic and poorly soluble phosphates by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**, **2**: 133-139, 1993.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEIS, S.J. - **Análise do solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, UFRGS/Faculdade de Agronomia, 1995. 174 p.
- TISDALL, J.M. - Possible role of microorganisms in aggregation in soils. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N., eds. - **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 115-121.
- TORESAN, L. - **Desempenho e competitividade do setor florestal brasileiro e catarinense**. Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina - Instituto Cepa/SC (*On line*). Disponível na internet via <http://www.icepa.com.br>. Arquivo capturado em abril de 2002.
- TORO, M.; AZCÓN, R.; HERRERA, R. - Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. **Biol. Fertil. Soils** **21**: 23-29, 1996.
- TRAPPE, J.M. - Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophic in the Angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G.R., ed. - **Ecophysiology of VA mycorrhizal plants**. Boca Raton, CRC Press, 1987. p. 5-25.
- VARMA, S. & MATHUR, R.S. - Biocoenotic association between nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing microorganisms. **Curr. Sci.**, **58**: 1099-1100, 1989.

- VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, I.; AZCON, R. - Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **44**: 546-549, 1995.
- VASSILEV, N.; FENICE, M.; FEDERICI, F. - Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. **Biotechnol. Tech.**, **10**: 585-588, 1996.
- VASSILEV, N.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; AZCÓN, R. - Olive mill waste water treatment by immobilized cells of *Aspergillus niger* and its enrichment with soluble phosphate. **Process Biochem.**, **32**: 617-620, 1997a.
- VASSILEV, N.; TORO, M.; VASSILEVA, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M. - Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. **Biores. Technol.**, **61**: 29-32, 1997b.
- VASSILEV, N. & VASSILEVA, M. - Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. **Mycol. Res.**, **96**: 563-570, 1992.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCÓN, R. - Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus niger*. **Biores. Technol.**, **59**: 1-4, 1997.
- VASSILEVA, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. - Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. **J. Biotechnol.**, **63**: 67-72, 1998.
- VASSILEVA, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. - Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp. on plant growth and phosphate uptake. **Biores. Technol.**, **67**: 229-232, 1999.
- VENKATESWARLU, B.; RAO, A.V.; RAINA, P. - Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from aridsol. **J. Ind. Soc. Sci. Soil**, **32**: 273-277, 1984.
- VIDHYASEKARAN, P.; BALARAMAN, K.; DEIVEEGASUNDARAM, M.; VISWANATHAN, G. - Phosphate dissolving activity of *Aspergillus awamori*. **Indian J. Microbiol.**, **13**: 51-53, 1973.
- VOIGT, E.L.; OLIVEIRA, V.L.; RANDI, A.M. - Mycorrhizal colonization and phenolic compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunnii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesq. Agropec. Bras.** **35**: 1905-1910, 2000.
- VORA, M.S. & SHELAT, H.N. - Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock phosphate-solubilizing microorganisms. **Indian J. Agr. Sci.**, **68**: 292-294, 1998.
- WALLANDER, H. - Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. **Plant Soil**, **218**: 249-256, 2000.

- WALLANDER, H.; WICKMAN, T.; JACKS, G. - Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. **Plant Soil**, **196**:123-131, 1997.
- WATTEAU, F. & BERTHELIN, J. - Iron solubilization by mycorrhizal fungi producing siderophores. **Symbiosis**, **9**: 59-67, 1990.
- WENZEL, C.L.; ASHFORD, A.E.; SUMMERELL, B.A. - Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah (*Telopea speciosissima* SM-R-BR). **New Phytol.**, **128**: 487-496, 1994.
- WHITELAW, M.A. - Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Adv. Agron.** **69**: 99-151, 2000.
- WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; HELYAR, K.R. - Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biol. Biochem.**, **31**: 655-665, 1999.
- WILHELM, S.W. & TRICK, C.G. - Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response. **Limnol. Oceanogr.**, **39**: 1979-1984, 1994.
- WILKINS, D.A. - The influence of sheathing (ecto) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. **Agr. Ecos. Environ.**, **35**: 245-260, 1991.
- YOUNG, C.C. - Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soils. **Soil Sci. Plant Nutr.**, **36**: 225-231, 1990.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA. (Dados que originaram a Figura 2.1).

Meio	Diâmetro da colônia dos isolados (cm) *					
	MSF-062 (48 horas)	MSF-221 (72 horas)	MSF-251 (72 horas)	MSF-293 (96 horas)	MSF-306 (24 horas)	MSF-310A (96 horas)
MNM	0,43 c	0,73 b	2,20 b	0,33 b	0,57 c	0,83 c
GEL	0,83 a	1,50 a	2,63 a	0,87 a	3,37 a	1,87 b
GMM	0,67 ab	1,57 a	2,73 a	1,03 a	2,67 b	2,53 a
GMA	0,60 bc	1,27 a	2,80 a	0,87 a	3,37 a	2,40 a

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

### Anexo 2 - Fungos ectomicorrízicos nos meios MNM, GEL, GMM e GMA. (Dados que originaram a Figura 2.2).

Meio	Diâmetro da colônia dos isolados (cm) *				
	UFSC-Sc42 (22 dias)	UFSC-Sc91 (32 dias)	UFSC-Rh106 (18 dias)	UFSC-Su114 (22 dias)	MARX 270 (23 dias)
MNM	4,75 a	3,67 b	7,33 a	2,65 b	4,20 a
GEL	4,28 b	4,30 a	6,10 b	3,82 a	5,27 a
GMM	4,23 bc	4,18 ab	5,78 b	4,13 a	6,25 a
GMA	4,02 c	3,88 ab	5,73 b	3,82 a	6,47 a

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

**Anexo 3 - Preparo de 1 L da solução P-B (molibdato de amônio)**

- a) Dissolver 3,8 g de molibdato de amônio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  em 150 mL de água destilada previamente aquecida a 60°C, em copo de Becker de 200 mL;
- b) Deixar esfriar, transferir para um balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água destilada;
- c) Transferir para um frasco com capacidade de 1 L;
- d) Em outro balão, colocar 80 mL de água destilada;
- e) Adicionar 70,7 mL de HCl concentrado ( $d=1,191$ ; 37,7% e 12,31N) e agitar;
- f) Completar o volume com água destilada e agitar;
- g) Transferir para o frasco de 1 L, onde já se encontra a solução de molibdato de amônio, e agitar;
- h) Adicionar 600 mL de água destilada, utilizando balão volumétrico de 200 mL, e agitar bem para a perfeita homogeneização.

**Anexo 4 - Preparo da solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico)**

- a) Preparar um estoque de pó redutor, misturando e triturando em almofariz os seguintes reagentes:
  - 2,50 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico,
  - 5,00 g de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ),
  - 146,00 g de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ );
- b) Guardar o pó redutor em vidro fosco, envolto com folha de papel alumínio (no máximo por 40 dias);
- c) Dissolver 32,0 g do pó redutor em 200 mL de água destilada morna (50-60°C), em copo de Becker de 1000 mL;
- d) Transferir para um vidro fosco escuro e deixar em repouso até cristalizar (3 a 6 dias);
- e) Filtrar o cristalizado e guardar a solução (no máximo por 3 semanas).

**Anexo 5 - Diâmetro da colônia (mm) dos fECM UFSC-Cg02 (*Cenococcum geophilum*), UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), UFSC-Rh106 (*Rhizopogon vulgaris*) e UFSC-Su155 (*Suillus cothurnatus*) confrontados com MSF, nos meios GMM e GEL a 25° C.**

Isolado	Meio GMM*			Meio GEL*		
	Dias após confrontação			Dias após confrontação		
	2	4	6	2	4	6
<b>UFSC-Cg02</b>	11,15 a	15,32 a	22,86 a	9,47 a	16,38 a	25,24 ab
X MSF-189	7,62 a	14,77 a	18,40 a	6,16 a	12,31 a	18,47 bc
X MSF-239	7,84 a	15,47 a	15,47 a	4,46 a	11,15 a	11,15 c
X MSF-177	5,17 a	13,16 a	15,79 a	4,19 a	12,55 a	12,55 c
X MSF-262	7,59 a	11,25 a	13,06 a	6,61 a	10,85 a	17,46 bc
X MSF-269	7,52 a	15,14 a	20,81 a	1,96 a	7,96 a	18,01 bc
X MSF-195	3,81 a	5,77 a	13,29 a	8,70 a	15,01 a	27,64 a
X MSF-251	5,67 a	11,35 a	13,10 a	4,17 a	14,86 a	21,25 ab
X MSF-310A	10,53 a	19,37 a	21,22 a	4,17 a	12,50 a	18,75 bc
<b>UFSC-Rh90</b>	17,97 a	40,46 a	44,94 a	23,46 a	43,20 a	59,26 a
X MSF-189	18,39 a	32,76 a	36,21 a	18,46 a	28,17 a	29,32 c
X MSF-239	14,87 a	28,12 a	38,24 a	18,13 a	31,00 a	33,24 c
X MSF-177	19,35 a	34,10 a	42,07 a	17,75 a	34,30 a	45,52 b
X MSF-262	16,25 a	38,38 a	45,36 a	19,52 a	33,20 a	49,08 ab
X MSF-269	14,12 a	31,81 a	40,07 a	19,42 a	38,80 a	44,51 b
X MSF-195	16,96 a	36,35 a	47,22 a	23,33 a	42,00 a	47,86 b
X MSF-251	16,68 a	32,21 a	42,89 a	13,95 a	30,20 a	33,10 c
X MSF-310A	18,45 a	34,59 a	42,60 a	18,28 a	34,40 a	39,07 bc
<b>UFSC-Rh106</b>	17,94 a	29,26 ab	42,46 ab	23,38 a	46,95 a	75,09 a
X MSF-189	14,42 a	19,51 b	20,34 c	24,48 a	48,76 a	57,80 ab
X MSF-239	9,32 a	16,96 b	23,74 bc	21,35 a	45,49 ab	58,34 ab
X MSF-177	18,74 a	28,12 ab	36,27 ac	22,65 a	41,45 ab	43,38 bd
X MSF-262	10,73 a	23,23 ab	30,42 ac	21,45 a	44,09 ab	58,47 ab
X MSF-269	14,30 a	28,59 ab	35,25 ac	17,76 a	39,55 ab	50,91 bc
X MSF-195	14,82 a	27,78 ab	27,78 bc	20,54 a	27,68 b	29,07 d
X MSF-251	12,12 a	23,31 ab	27,99 bc	24,55 a	31,45 ab	47,92 bd
X MSF-310A	14,38 a	35,25 a	47,61 a	17,03 a	30,11 ab	37,15 cd
<b>UFSC-Su155</b>	9,48 a	26,47 ab	41,61 ab	20,51 a	35,90 a	51,28 a
X MSF-189	14,56 a	26,50 ab	32,46 bd	13,18 ac	19,61 ac	24,37 c
X MSF-239	17,35 a	28,41 a	35,04 ac	8,82 bc	22,93 ac	32,05 bc
X MSF-177	6,84 a	18,95 ac	29,39 cd	13,06 ac	24,68 ac	31,28 bc
X MSF-262	12,02 a	13,68 c	16,86 e	15,96 ac	18,74 bc	20,26 c
X MSF-269	13,98 a	27,21 a	43,53 a	5,85 c	14,55 c	25,09 c
X MSF-195	8,43 a	15,78 c	26,29 cd	11,19 ac	16,78 bc	24,12 c
X MSF-251	14,07 a	20,91 ac	27,75 cd	12,56 ac	25,20 ac	34,44 bc
X MSF-310A	13,86 a	17,37 bc	22,54 de	17,78 ab	33,33 ab	44,45 ab

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna do mesmo isolado não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

**Anexo 6 - Largura da faixa de crescimento (mm) dos microrganismos solubilizadores de fosfatos MSF-189 (*Enterobacter* sp.), MSF-239 (*Bacillus* sp.), MSF-177, MSF-262, MSF-269 (*Penicillium* spp.), MSF-195, MSF-251 e MSF-310A (*Aspergillus* spp.) confrontados com fungos ectomicorrízicos, nos meios GMM e GEL a 25° C.**

Isolado	Melo GMM*			Melo GEL*		
	Dias após confrontação			Dias após confrontação		
	2	4	6	2	4	6
<b>MSF-189</b>	6,00 a	7,33 a	7,33 a	4,00 a	6,00 a	6,33 a
X UFSC-Cg02	4,33 ab	5,67 ab	7,00 a	4,33 a	5,67 ab	5,67 ac
X UFSC-Rh90	4,00 b	5,00 b	5,33 ab	4,00 a	5,00 bc	5,00 bc
X UFSC-Rh106	4,33 ab	4,33 b	5,67 ab	3,33 a	4,33 c	4,67 c
X UFSC-Su155	3,33 b	4,33 b	4,33 b	4,33 a	5,00 bc	6,00 ab
<b>MSF-239</b>	3,67 a	4,67 a	4,67 a	4,33 a	6,00 a	7,00 a
X UFSC-Cg02	3,67 a	3,67 a	3,67 a	4,67 a	5,67 ab	6,67 a
X UFSC-Rh90	2,33 a	2,33 a	2,67 a	3,00 b	4,00 bc	4,00 b
X UFSC-Rh106	2,67 a	2,67 a	2,67 a	3,00 b	3,00 c	4,00 b
X UFSC-Su155	4,00 a	4,67 a	4,67 a	4,00 a	5,00 ab	6,00 a
<b>MSF-177</b>	6,33 a	14,00 a	18,00 a	6,00 a	10,67 a	14,33 ab
X UFSC-Cg02	5,67 ab	12,00 ab	15,33 ab	7,00 a	11,33 a	15,00 ab
X UFSC-Rh90	5,00 ab	10,00 ab	13,67 ab	3,67 b	8,00 b	12,00 b
X UFSC-Rh106	4,00 b	8,33 b	11,33 b	3,33 b	8,67 b	14,67 ab
X UFSC-Su155	5,33 ab	11,67 ab	16,33 ab	5,67 ab	11,00 a	16,67 a
<b>MSF-262</b>	6,00 a	13,00 ab	19,67 ab	6,67 a	14,00 a	19,67 a
X UFSC-Cg02	7,00 a	14,00 a	21,00 a	6,00 ab	13,00 ab	19,00 ab
X UFSC-Rh90	6,00 a	13,00 ab	17,67 ab	6,00 ab	12,67 ab	19,00 ab
X UFSC-Rh106	5,67 a	10,33 b	15,33 b	4,67 b	10,67 ab	17,00 ab
X UFSC-Su155	6,00 a	10,33 b	14,67 b	5,33 ab	10,00 b	14,33 b
<b>MSF-269</b>	13,33 a	26,67 a	39,67 a	12,00 a	24,67 a	38,00 a
X UFSC-Cg02	11,00 a	26,00 ab	37,00 ab	10,00 b	21,67 b	34,33 a
X UFSC-Rh90	11,67 a	27,00 a	31,33 bc	9,00 b	21,33 b	28,00 b
X UFSC-Rh106	9,67 a	22,67 bc	28,67 c	9,00 b	19,67 b	28,67 b
X UFSC-Su155	12,00 a	22,33 c	29,00 c	10,00 b	19,67 b	28,00 b
<b>MSF-195</b>	17,67 a	30,67 a	47,33 a	15,67 a	31,33 a	47,67 a
X UFSC-Cg02	12,33 a	25,33 a	36,33 b	16,00 a	30,33 a	45,00 a
X UFSC-Rh90	15,33 a	30,33 a	38,00 b	13,67 b	28,00 a	34,00 b
X UFSC-Rh106	13,67 a	26,33 a	34,33 b	13,67 b	21,33 b	32,00 b
X UFSC-Su155	13,67 a	27,33 a	38,00 b	13,33 b	26,00 a	37,33 ab
<b>MSF-251</b>	17,67 a	30,67 a	47,33 a	15,00 a	31,67 a	49,67 a
X UFSC-Cg02	13,33 a	29,00 a	44,33 a	12,33 bc	31,00 ab	45,67 ab
X UFSC-Rh90	13,67 a	30,33 a	42,67 a	12,00 bc	29,33 ab	37,67 c
X UFSC-Rh106	14,00 a	28,33 a	36,00 a	10,67 c	26,33 b	43,00 bc
X UFSC-Su155	14,33 a	28,00 a	40,33 a	13,33 ab	31,00 ab	37,00 c
<b>MSF-310A</b>	14,33 a	22,67 a	32,33 a	14,67 a	23,00 a	34,00 a
X UFSC-Cg02	11,67 a	19,33 a	29,00 a	11,67 a	22,00 a	32,33 a
X UFSC-Rh90	13,33 a	21,00 a	27,33 a	12,33 a	23,00 a	29,00 a
X UFSC-Rh106	12,33 a	22,67 a	28,33 a	12,33 a	21,00 a	28,33 a
X UFSC-Su155	13,67 a	22,33 a	32,00 a	12,67 a	24,33 a	32,33 a

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna do mesmo isolado não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Médias de três repetições.

**Anexo 7 - Quantidade de fósforo no meio GEL (mg L<sup>-1</sup>) inoculado com MSF e fECM e incubado por 15 dias a 25°C. (Dados que originaram as Figuras 3.5, 3.6 e 3.7).**

		fECM*					
		Sem fECM	Cg-02	Rh-90	Rh-106	Su-155	Média
MSF	Sem MSF	101 fE	172 eD	393 bdB	509 aA	312 bdC	297 d
	189	257 ceC	158 eD	453 abA	408 bdB	255 cdC	306 d
	239	296 cB	456 cA	439 acA	448 acA	327 bcB	393 c
	177	215 deE	323 dD	473 aB	382 cdC	522 aA	383 c
	262	355 bC	671 bA	454 abB	489 abB	372 bC	468 b
	269	186 eD	147 eD	423 acA	357 cdB	287 cdC	280 d
	195	323 bcB	222 eC	396 bdA	436 acA	279 cdB	331 cd
	251	282 bdB	220 eC	365 cdA	340 dA	248 dBC	291 d
	310A	873 aA	822 aB	362 dD	431 bcC	449 aC	587 a
	Média	321 B	355 B	418 A	422 A	339 B	

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições.

**Anexo 8 - Preparo de 200 mL do reagente de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951, citado por CATTELAN, 1999):**

- Dissolver 4 mL de uma solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M, em 200 mL de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 35%.
- Solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M: em um balão volumétrico de 50 mL, dissolver 6,76 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em um pouco de água destilada, agitar e completar o volume.
- Solução de  $\text{HClO}_4$  35%: diluir 100 mL de ácido comercial (70%), em 100 mL de água destilada.