

INCREMENTO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO PELA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS  
BENÉFICAS E FUNGOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

INCREMENTO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO PELA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS  
BENÉFICAS E FUNGOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

027/2017

A282 Aguiar, Kamilla Pereira.

Incremento da solubilização de fosfato e promoção do crescimento de plantas de milho pela associação de bactérias benéficas e fungos / Kamilla Pereira Aguiar – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.  
90 f. : il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.  
Bibliografia: f. 66 – 90.  
Orientador: Fábio Lopes Olivares.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Bioinsumo Agrícola. 3. Prospecção Microbiana. 4. Promoção de Crescimento Vegetal. 5. Milho. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 633.152

INCREMENTO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO PELA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS  
BENÉFICAS E FUNGOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Produção Vegetal.”

Aprovada em 31 de março de 2017

Comissão Examinadora:

---

Prof. Jader Galba Busato (D. Sc., Produção Vegetal) –UnB

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Aline Chaves Intorne (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia) – UENF

---

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Microbiologia do Solo) - UENF  
Orientador

**Este trabalho é dedicado a Deus e à minha família,  
sem eles nada disso seria possível; aos meus  
amigos, colegas de laboratório e professores,  
fundamentais para realização desta conquista.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal da UENF pela oportunidade;

A UENF e CAPES pela bolsa concedida para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares pela orientação, incentivo, paciência, amizade e por todas as oportunidades, por acompanhar meu crescimento e compartilhar seus ensinamentos;

Ao prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos pelo carinho e importantes contribuições para a finalização deste trabalho;

Ao querido amigo Vicente Mussi pela importante contribuição na identificação macro e micromorfológica dos fungos isolados;

Aos meus queridos amigos Pedro, Bia, Fernanda e Marcella por estarem sempre dispostos a ajudar, e por colaborarem na execução da identificação molecular dos fungos isolados;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela contribuição em minha formação acadêmica;

Aos colegas de laboratório, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração;

Às queridas amigas Dariellis Balmore, Débora Dantas, Jucima Anunciação, Lívia Lima e Tatiane Sanches, pelo carinho, amizade e incentivo;

Aos meus pais Rita Maria Pereira Aguiar e Mateus Aguiar, pelo amor incondicional;

Aos meus irmãos Saulo José Pereira Aguiar e Cassiana Pereira Aguiar, pelo carinho, apoio e incentivo;

Ao meu companheiro Diego Melo, por estar sempre ao meu lado, acreditar em mim e tornar minha vida mais leve.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>HIPÓTESE</b> .....	4
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	4
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	4
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1. A cultura de milho e o uso de fertilizantes minerais.....	6
2.2. Bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	8
2.3. Fungos promotores de crescimento de plantas.....	10
2.4. Interações entre bactérias promotoras de crescimento de plantas e Fungos.....	12
2.5. Microrganismos solubilizadores de fósforo (P) e mecanismos de solubilização.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1. Isolamento das bactérias.....	17
3.2. Isolamento de fungos.....	18
3.3. Caracterização morfológica dos fungos isolados de plantas de milho.....	19
3.4. Extração de DNA e identificação molecular dos fungos.....	20
3.4.1. Isolamento das pontas de hifas dos isolados fúngicos.....	20
3.4.2. Extração e quantificação do DNA genômico dos isolados fúngicos .....	21
3.4.3. Eletroforese em gel de agarose.....	22
3.4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCP).....	22
3.4.5. Purificação do produto da PCR para sequenciamento.....	23
3.4.6. Análise das sequências.....	24
3.4.7. Árvore filogenética.....	24

3.5. Caracterização <i>in vitro</i> dos mecanismos de promoção de crescimento dos isolados fúngicos.....	25
3.5.1. Solubilização de P.....	25
3.5.2. Solubilização de Zn.....	26
3.5.3. Degradação de celulose.....	26
3.6. Ensaio de compatibilidade fungo-bactéria.....	26
3.7. Análise <i>in vitro</i> da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos isolados e em co-cultivo com bactérias benéficas.....	27
3.8. Efeito da co-inoculação do fungo (F10) e bactéria (B8) no crescimento de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1. Isolamento e caracterização macro e micromorfológica dos fungos.....	30
4.2. Análise dos isolados fúngicos por meio de técnicas moleculares.....	35
4.2.1. Extração de DNA.....	35
4.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e árvore filogenética dos isolados fúngicos.....	36
4.3. Mecanismos de promoção de crescimento dos isolados fúngicos.....	41
4.4. Seleção dos isolados fúngicos e bactérias compatíveis.....	43
4.5. Análise <i>in vitro</i> da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos e sua interação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em meio sólido.....	47
4.6. Análise <i>in vitro</i> da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos e sua interação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em meio líquido.....	54
4.7. Valores de pH em meio líquido suplementado com fosfato tricálcico e fosfato de rocha de Araxá.....	57
4.8. Efeito da co-inoculação do fungo (F10) e da bactéria (B8) no crescimento de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	59
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## RESUMO

Aguiar, Kamilla Pereira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2017. Título "**Incremento da solubilização de fosfato e promoção do crescimento de plantas de milho pela associação de bactérias benéficas e fungos.**" Orientador: Prof. Fábio Lópes Olivares.

O fósforo (P) é um macronutriente de grande importância para as plantas, porém, grande quantidade encontra-se indisponível no solo. Uma alternativa promissora, visando melhorar a produtividade das culturas é a aplicação de microrganismos solubilizadores de P. Assim, o objetivo do trabalho foi isolar fungos de diferentes partes da planta de milho e avaliar sua interação com bactérias benéficas como estratégia para o incremento de processos de biomineralização de fosfatos e promoção de crescimento de plantas de milho. Os fungos foram isolados da filosfera, limbo foliar e rizosfera de plantas de milho e sua identificação foi realizada por meio de avaliações macro e micromorfológicas em meio BDA e técnicas moleculares. A aplicação isolada dos fungos identificados, ou em com bactérias benéficas às plantas foi avaliada quanto à capacidade de solubilizar fosfato tri-cálcico e fosfato de rocha de Araxá, em meio sólido Pikovskaya. A partir destes resultados, duas interações foram escolhidas para posterior teste de solubilização em meio líquido: 1) Sinérgicas: *Curvularia geniculata* (F10) com as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 (B2) e *Serratia marcescens* 22 GI (B8); 2) Antagônicas: *Curvularia geniculata* (F2) com as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 (B2) e *Serratia marcescens* 22 GI (B8). A interação fungo-bactéria mais promissora foi inoculada em sementes de milho suplementadas

com duas fontes fosfatadas. Doze fungos foram isolados de diferentes partes de plantas de milho. De acordo com as análises moleculares, estes fungos pertencem às seguintes espécies: *Penicillium kloeckeri* (F1), *Curvularia geniculata* (F2, F8, e F10), *Curvularia lunata* (F3, F4, F5, F7 e F9), *Fusarium incarnatum* (F6), *Trichoderma harzianum* (F11) e *Aspergillus caesiellus* (F12). Das 88 interações fungo-bactéria avaliadas, 15 apresentaram halo solubilizador maior que a cultura individual em meio sólido suplementado com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  enquanto 34 apresentaram este potencial em meio sólido suplementado com fosfato de rocha Araxá. Os fungos F6 e F12 não mostraram habilidade para solubilização de P no meio sólido  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ , porém quando co-inoculados com as bactérias apresentaram efeito solubilizador positivo. O mesmo aconteceu com os fungos F4 e F12 em meio sólido fosfato de rocha Araxá. Os isolados capazes de solubilizar fosfato em meio sólido mantiveram esta habilidade em meio líquido. A inoculação do fungo *Curvularia geniculata* (F10) e da bactéria *Serratia marcescens* (B8) associados às fontes de fósforo influenciou significativamente a maioria das características biométricas avaliadas em plantas de milho, com maiores incrementos associados à inoculação conjunta desses microrganismos.

**Palavras-chave:** Biotecnologia agrícola; bioinsumo agrícola; prospecção microbiana.

## ABSTRACT

Aguiar, Kamilla Pereira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2017. Title "**Increased phosphate solubilization and growth promotion of corn plants by the association of beneficial bacteria and fungi.**" Advisor: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Phosphorus (P) is an essential macronutrient that plays an important role in plant growth and development. However, a high content of this nutrient is not available in soil. In order to improve crop productivity, the application of phosphorus-solubilizing microorganisms consists in a promising alternative approaches. Thus, the aim of this study was to isolate fungus from different parts of maize plants and evaluate its interaction between beneficial bacteria as a strategy to increasing phosphate biomineralization and growth promotion processes for maize plants. The fungi strains were isolated from phyllosphere, leaf blade and rhizosphere of maize plants and its identification was performed by macro and micromorphological observations of strains grown in BDA medium and molecular analysis. The ability of fungi strains, individual or combined with beneficial bacteria, for P-solubilization in Pikovskaya solid medium, supplemented with two phosphate sources ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  or rock phosphate from Araxá) was evaluated. The resulting data related to P-biomineralization allowed the selection of two synergistic interactions (*Curvularia geniculata* (F10) with both *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 (B2) and *Serratia marcescens* 22 GI (B8) bacteria) and two antagonistic interactions (*Curvularia geniculata* (F2) with both *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 (B2) and *Serratia marcescens* 22 GI (B8) bacteria) for P-solubilization assays performed in liquid medium. The more promising fungus-

bacteria interaction was inoculated in maize seeds supplemented with two phosphate sources. In this study twelve fungi strains were isolated from different parts of maize plants. Molecular analysis revealed that fungi strains belong to following species: *Penicillium Kloeckeri* (F1), *Curvularia geniculata* (F2, F8, and F10), *Curvularia lunata* (F3, F4, F5, F7 and F9), *Fusarium incarnatum* (F6), *Trichoderma harzianun* (F11) and *Aspergillus caesiellus* (F12). From 88 fungus-bacteria interactions, which have been evaluated, 15 showed solubilization halo higher than the individual fungus inoculation in solid medium supplemented with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  whereas 34 showed this ability in solid medium supplemented with rock phosphate from Araxá. F6 and F12 fungi strains did not show P-solubilization ability in solid medium with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ . However, positive effect of P-solubilization was observed when these fungi strains were co-inoculated with the bacteria strains. Similar results were observed about F4 and F12 fungi strains in solid medium with rock phosphate from Araxá. The fungi strains, which solubilized phosphate in solid medium, maintained this ability also in liquid medium. The inoculation with *Curvularia geniculata* (F10) and *Serratia marcescens* (B8) associated with both phosphorus source interfered significantly the most of biometric parameters evaluated, with higher increases related to combined inoculation of these microorganisms.

**Keywords:** Agricultural biotechnology, agricultural biofuel, microbial prospecting.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de biofertilizantes na agricultura constitui uma prática eficiente que estimula a produtividade de diversas culturas sem causar agressões ao meio ambiente (Santos et al., 2010). Substituir as elevadas demandas de insumos sintéticos, como por exemplo, pesticidas e fertilizantes minerais, por materiais biológicos nativos do solo é característica dos sistemas agrícolas sustentáveis. Tal tecnologia resulta na conservação do solo e da água, além de suprimir doenças nas plantas e contribuir para a nutrição vegetal (Pereg & McMillan, 2015).

Entre o conjunto de estratégias e ações que englobam o uso de insumos biológicos na agricultura, a inoculação de microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas a partir da disponibilização de nutrientes (biofertilizantes) representa uma importante alternativa para a produção agrícola sustentável, e por isso, tem sido alvo de estudos por diversos grupos de pesquisa (Alves et al., 2002; Baldotto et al., 2012; Busato et al., 2017; Mittal et al., 2008). Alguns processos microbianos como fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fósforo inorgânico, desempenham um papel fundamental na oferta complementar de N e P para as diferentes culturas, contribuindo de forma considerável para os vários sistemas de produção (Baldotto et al., 2012).

Para manter a produtividade das diferentes culturas é necessária a aplicação de grandes doses de fertilizantes fosfatados (Raij, 1991). No entanto, a agricultura moderna assegura que o uso eficiente do fósforo depende do fósforo derivado de rocha fosfática, um recurso não renovável, que pode ser esgotado em poucos anos comprometendo os rendimentos agrícolas (Cordell et al., 2009).

Neste contexto, existe na literatura numerosos estudos relacionados com o aumento da disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) por meio da inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato. Alguns trabalhos têm demonstrado uma atividade solubilizadora eficiente por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (Illmer & Schinner, 1992; Whitelaw, 2000). Outros têm demonstrado que bactérias do gênero *Acinetobacter* promovem o crescimento de repolho, pepino, margarida, cevada, trigo e grão, por meio da produção de fitormônios e solubilização de Pi (Kang et al., 2009; Peix et al., 2009). Outras pesquisas apontam o aumento da eficiência do uso de rochas fosfatadas quando associadas com bactérias solubilizadoras de P (Oliveira et al., 2009). A aplicação combinada de fosfato de rocha Araxá com bactérias do gênero *Burkholderia* melhorou de forma significativa o crescimento de plantas das cultivares de abacaxi “Imperial” e “Pérola” (Baldotto et al., 2014).

Fungos e bactérias ocupam nichos similares no solo e podem se relacionar sinergicamente, beneficiando o desenvolvimento das plantas. Alguns gêneros de fungos micorrízicos arbusculares podem favorecer a entrada de bactérias benéficas em plantas, promovendo efeitos positivos sobre as mesmas. Paula et al. (1991) observaram a presença de bactérias diazotróficas endofíticas em esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (*Glomus clarum*), e sugeriram que a incorporação dessas bactérias nas plantas pode estar relacionada à presença do FMA. De acordo com esse trabalho, o mecanismo de penetração das hifas infectivas pode acarretar na maior exsudação de nutrientes pela planta, o que acelera o crescimento das bactérias. Kothari et al. (1991) verificaram que o aumento de bactérias benéficas em plantas micorrizadas poderia ser devido ao crescimento das hifas fúngicas, que fornecem substrato adicional (exsudatos e lisados de hifas) para o crescimento bacteriano. Esses pesquisadores sugerem que FMAs influenciam diretamente a comunidade microbiana na rizosfera, podendo contribuir para o desenvolvimento de diferentes culturas.

Vários trabalhos estudam a relação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de P. A interação entre a bactéria *Bacillus subtilis* e o fungo micorrízico *Glomus* sp., por exemplo, aumentou significativamente a biomassa e o acúmulo de N e P em tecidos de cebola em um solo com baixa disponibilidade de P (Toro et al., 1997). A combinação entre as

bactérias *P. fluorescens* estirpes 92rk e P190r e o fungo *Glomus mosseae* BEG12 também aumentou o conteúdo de P em folhas de plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Guadalete (Gamarelo et al., 2004).

Entretanto, são escassos os estudos sobre as interações sinérgicas entre outros fungos do solo e bactérias capazes de incrementar a disponibilidade de P para o desenvolvimento das culturas. Baldotto & Olivares (2008) na avaliação das relações estruturais da comunidade bacteriana na filosfera de 50 espécies de plantas, por meio de microscopia eletrônica, descreveram a presença de biofilmes constituídos pela associação entre bactérias e fungos filamentosos. Os autores sugeriram que a formação de biofilmes na superfície das folhas depende da colonização por hifas, o que poderia em associação com a planta hospedeira, liberar nutrientes para manter o crescimento das bactérias e criar um ambiente ecologicamente mais vantajoso para ambos os microrganismos.

A fim de intensificar as pesquisas sobre as interações benéficas entre fungos e bactérias, como uma alternativa eficaz para redução de fertilizantes fosfatados, o presente trabalho tem como propósito isolar fungos da rizosfera, filosfera e limbo foliar de milho e avaliar sua interação com bactérias benéficas como estratégia para o incremento de processos de biomineralização de fosfatos e promoção de crescimento de plantas de milho.

## **Hipóteses**

Fungos oriundos da filosfera, limbo foliar e rizosfera de plantas de milho interagem com bactérias benéficas causando efeitos positivos em plantas de milho.

A aplicação de fontes fosfatadas insolúveis associadas à inoculação de fungos e bactérias solubilizadoras de fósforo promove respostas positivas em plantas de milho por meio do incremento de biomassa.

## **Objetivo Geral**

Isolar fungos da rizosfera, filosfera e limbo foliar de plantas de milho e avaliar sua interação com bactérias benéficas como estratégia para o incremento de processos de biomineralização de fosfatos e promoção de crescimento de plantas de milho.

## **Objetivos Específicos**

Isolar fungos da rizosfera, filosfera e limbo foliar de plantas de milho (*Zea mays* L.) crescidas em substrato contendo vermicomposto à base de esterco bovino;

Realizar caracterizações morfológica e molecular dos fungos isolados;

Avaliar características de promoção de crescimento vegetal dos fungos;

Analisar a compatibilidade dos fungos e bactérias promotoras de crescimento de plantas por plaqueamento em meio sólido;

Avaliar o potencial dos fungos isolados e em co-inoculação com bactérias benéficas quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e fosfato de rocha Araxá em meio sólido;

Selecionar interações sinérgicas e antagônicas com base nos testes de solubilização em meio sólido para realização dos experimentos de solubilização em meio líquido;

Testar a combinação mais promissora entre fungos e bactérias associadas a duas fontes fosfatadas para o incremento de processos de biomineralização de fosfatos em plantas de milho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura de milho e o uso de fertilizantes minerais

Na classificação botânica, o milho pertence a ordem Poales, família Poaceae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Trata-se de um dos cultivos agrícolas mais importantes do mundo, podendo ser utilizado como base da alimentação humana e de animais, bem como na indústria para a produção de amido, óleo, álcool, alimentos e bebidas. Na safra 2016/2017 foram cultivados 5.481,2 mil hectares com essa cultura, projetando boas médias de produtividade, provavelmente acima de 7.000 kg há<sup>-1</sup> (CONAB, 2017).

De acordo com a Legislação Brasileira de Fertilizantes e Corretivos (1980), os fertilizantes minerais são produtos de natureza inorgânica, naturais ou sintéticos, fornecedores de nutrientes vegetais. Para obter rendimentos elevados em diversas culturas, especialmente no milho, é necessária a aplicação de doses consideráveis de fertilizantes minerais ao solo.

Segundo Gondim et al. (2010), o nitrogênio (N) é o nutriente mais limitante para o crescimento e desenvolvimento da cultura de milho, já que exerce importante função nos processos bioquímicos da planta, como por exemplo, biossíntese de proteínas e clorofilas (Cancellier et al., 2010). As doses de fertilizantes nitrogenados indicadas em média apresentam valores superiores a 150 kg ha<sup>-1</sup>, podendo variar de acordo com a quantidade de matéria orgânica presente no solo (Amado, 2002).

Outro nutriente importante para o desenvolvimento das plantas, inclusive do milho, é o fósforo (P). A escassez deste nutriente pode causar uma série de deficiências ao vegetal, por isso, a aplicação de fertilizantes fosfatados tornou-se uma importante ferramenta para se alcançar elevados rendimentos nas diferentes culturas (Busato, et al., 2017). Porém, a aplicação desses insumos agrícolas,

além de ser uma prática onerosa, pode provocar danos ao meio ambiente (Adesemoye et al., 2009).

A preocupação com a preservação e a conservação do meio tem resultado na busca por tecnologias que permitam aumentar a eficiência do uso de insumos biológicos, garantindo a qualidade e o rendimento vegetal sem prejudicar o ambiente (Busato, et al., 2017; Santos et al., 2010). Dessa forma, existe um grande interesse em práticas alternativas que visem à redução na aplicação de fertilizantes minerais sem alterar a produtividade das diferentes culturas agrícolas (Braz & Nahas, 2012; Ferreira et al., 2016; Oliveira et al., 2013). Neste contexto, o uso de microrganismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar a agricultura, constituindo uma alternativa viável na substituição dos métodos tradicionais de adubação por fertilizantes (Baldotto et al., 2010; Canellas et al., 2013).

*Azospirillum brasilense* é um exemplo de microrganismo intensamente estudado no Brasil e no exterior como inoculante para diferentes culturas. Esta bactéria destaca-se por ser capaz de promover o crescimento vegetal a partir da fixação biológica de nitrogênio, aumentando significativamente a produtividade de culturas agrônômicas como milho, cana-de-açúcar e trigo (Hungria et al., 2010; Novakowski et al., 2011; Silva et al., 2009). Resultados de mais de trinta anos de pesquisa demonstraram que a inoculação com tal bactéria tem uma taxa de sucesso entre 60 e 70%, com aumentos significativos na produtividade de grãos (Okon & Labandera-Gonzales, 1994).

A maior participação de processos biológicos aplicados à produção agrícola pode resultar em benefícios econômicos e socioambientais, reduzindo a dependência por fontes de energia e matéria não renováveis. Uma patente de processo foi desenvolvida pelo Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) com base no uso combinado de ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Este novo conceito de biofertilizante, aplicado no sulco de plantio e por aspersão foliar tem sido testado com sucesso para diferentes espécies vegetais nos últimos 13 anos, incluindo plantas de milho (Canellas et al., 2013).

## 2.2. Bactérias promotoras de crescimento de plantas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) colonizam a superfície e o interior das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo aumentar a taxa de germinação de sementes, o desenvolvimento dos órgãos vegetais, a produção de flores e o rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (Dey et al., 2004).

As BPCP associadas às plantas são chamadas endofíticas quando habitam o interior da planta hospedeira, sem lhe causar dano aparente (Sturz et al., 2000). Essas bactérias estão em vantagem neste habitat por não competirem por nutrientes, o que normalmente ocorre no solo da rizosfera. Além disso, tendem a ter maior eficácia na promoção do crescimento vegetal, já que estão no interior dos tecidos, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas (Roesch et al., 2007). As BPCV que crescem e vivem sobre a superfície de plantas (rizoplano ou filoplano) são conhecidas como epifíticas (Andrews & Harris, 2000).

As BPCP podem causar alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas, tais como: modificar tecidos radiculares, alterar o metabolismo, excretar enzimas, toxinas e antibióticos e assimilar nutrientes minerais (Moreira & Siqueira, 2006). Além desses efeitos, esse grupo de microrganismo é capaz de proporcionar o alongamento das raízes primárias ou proliferação de raízes laterais e adventícias (Adesemoye et al., 2009; Belimova et al., 2005). Esse fenômeno é vantajoso para as plantas, pois aumenta a sua capacidade em absorver água e nutrientes (Silveira, 2008).

Entre as BPCP, destacam-se *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Serratia* (Asghar et al., 2002). O *Azospirillum* spp. tem sido responsável pelo aumento no rendimento de diferentes culturas no campo, quando aplicados na forma de inoculantes. Esse microrganismo promove o crescimento de plantas devido à fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios vegetais (Okon & Vanderleyden, 1997).

As BPCP apresentam mecanismos de ação direta e indireta na promoção do crescimento vegetal (Oliveira et al., 2003). Dentre os mecanismos de ação direta pode-se citar: fixação biológica de N<sub>2</sub>, produção de fitormônios, síntese de

sideróforos, solubilização de fosfatos e aceleração da mineralização de nutrientes. Já nos mecanismos indiretos, elas atuam na indução de resistência sistêmica das plantas, antagonismo a patógenos, aumento da resistência das plantas a situações de estresse e produção de antibiótico (Cattelan & Hartel, 2000).

As bactérias capazes de fixar  $N_2$  atmosférico são conhecidas como diazotróficas, e podem desempenhar importante papel na recuperação dos ecossistemas, já que algumas delas são capazes também de produzir e liberar substâncias relacionadas ao crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e citocininas, contribuindo para melhorar a nutrição mineral e a utilização de água pelas plantas (Bazzicalupo & Okon, 2000). Döbereiner & Baldani (1995) observaram que a inoculação de *Herbaspirillum* spp. em plântulas de arroz cultivadas em solução de Hoagland contendo N marcado aumentou cerca de 40% do N-total acumulado nas plântulas. Já em casa de vegetação, Baldani et al. (2000) observaram aumentos variando entre 17 e 19% do N incorporado à planta devido à fixação biológica de  $N_2$  com a inoculação de estirpes de *H. seropedicae*.

Singh & Kappor. (1999) observaram que a co-inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares contribuiu com o aumento da matéria seca e da absorção de nutrientes em trigo cultivado em solos com baixa disponibilidade de nutrientes. Luz (2001b) observou um efeito indireto na promoção de crescimento vegetal por meio da inoculação de estirpes de *Pseudomonas putida* e *Pantoea agglomerans* em plantas de trigo. De acordo com o autor, estas bactérias promoveram um maior crescimento da planta a partir da supressão de fungos patogênicos. Barka et al. (2006) observaram que plantas tratadas com *Burkholderia phytofirmans* apresentaram aumento nos teores de prolina, amido e compostos fenólicos e aumento de resistência ao frio. A produção de prolina pode mediar o ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons inorgânicos (Grover et al., 2011).

Pesquisas envolvendo microrganismos benéficos em práticas agrícolas aumentaram significativamente nos últimos anos, pois tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas entre outras aplicações, os microrganismos representam uma alternativa eficiente na substituição de produtos químicos, podendo favorecer desta maneira a preservação do ambiente (Souza, 2001).

### 2.3. Fungos promotores de crescimento de plantas

Os fungos desempenham um papel fundamental nos ecossistemas terrestres, exercendo grande influência na estruturação do solo e no crescimento, nutrição e adaptação das plantas aos ambientes (Siqueira et al., 2007). São organismos eucariotos, heterotróficos, uni ou pluricelulares podendo ser classificados de acordo com suas funções nos grupos ecológicos em: fungos saprófitos, parasitas e simbiontes (Legislação Brasileira de Fertilizantes e Corretivos, 1980). Os fungos saprófitos são capazes de degradar e absorver compostos da matéria orgânica morta desempenhando uma importante função na ciclagem de nutrientes. A decomposição é feita a partir da liberação de enzimas e metabólitos secundários no substrato, que podem proporcionar diversos benefícios ao desenvolvimento das plantas (Kanagawa & Neves, 2011). Já os fungos parasitas utilizam a matéria orgânica de organismos vivos como substrato causando uma série de prejuízos ao hospedeiro (Kanagawa & Neves, 2011). Os fungos simbiontes são aqueles que estabelecem uma relação íntima com o hospedeiro, no qual os dois organismos são beneficiados (Read, 1991).

Um exemplo de relação simbiótica com fungo amplamente citada na literatura é a associação micorrízica. Esse termo foi proposto pelo botânico Albert Bernard Frank, em 1885, para caracterizar a associação entre raízes de plantas e determinados fungos do solo (Souza et al., 2006). Esta associação já era conhecida há pelo menos 50 anos antes de Frank, mas considerada de natureza parasítica (Souza et al., 2006). Através de diversos estudos, hoje se sabe que os fungos micorrízicos contribuem de forma significativa para a nutrição das plantas, sendo incapazes de atacar ou causar danos às raízes (Siqueira & Moreira, 1996). A micorrização produz modificações fisiológicas nas raízes da planta hospedeira, resultando em uma melhoria para o seu crescimento, desenvolvimento e resistência/tolerância a estresse biótico e abiótico (Barea et al. 2005).

Algumas espécies de fungos possuem a habilidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos inorgânicos tornando esse nutriente prontamente disponível para as plantas (Whitelaw, 2000). Esse mecanismo de promoção de crescimento vegetal é conhecido na literatura como solubilização de P e fungos que possuem essa capacidade podem representar uma alternativa eficiente na melhoria do aproveitamento dos fosfatos naturais (Silva Filho et al., 2002).

A ação solubilizadora de fosfato de alguns fungos tem sido associada à produção de ácidos orgânicos (Bolan et al., 1997). Reyes et al. (1999) encontraram correlação positiva entre a solubilização de fosfato por *Penicillium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico.

Seshadri et al. (2010) inocularam dez estirpes de *Aspergillus niger* em meio sólido Pikovskaya suplementado com fosfato tricálcico e bicálcico e observaram que todas as estirpes foram capazes de solubilizar esse nutriente. Ribas et al. (2016) avaliaram o potencial *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. para a solubilização de fosfato de cálcio e sua capacidade de produzir enzimas fosfatases e observaram que todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato e apresentaram atividade enzimática.

*Trichoderma* spp. têm sido amplamente citadas como agentes de biocontrole de uma gama considerável de fitopatógenos do solo. No entanto, outra propriedade muito estudada é a relação dos isolados de *Trichoderma* spp. com a melhoria do percentual germinativo e do crescimento de algumas culturas (Baker, 1987). Segundo Avis et al. (2008), o controle de patógenos pode conduzir a um forte incremento na captação e na solubilização de nutrientes no solo e produção de hormônios de crescimento.

De acordo com Resende et al. (2004), a aplicação de *Trichoderma harzianum* em sementes de milho promoveu maior acúmulo da matéria seca nas raízes das plantas. Segundo Datnoff & Pernezny (2001), a inoculação da espécie *Trichoderma harzianum* estimulou o crescimento de plântulas de tomate em casa de vegetação e após o transplântio para o canteiro definitivo.

Pesquisas sobre os fungos benéficos do solo têm se intensificado nas últimas décadas com o objetivo prático de aumentar a produção, reduzir o uso de fertilizantes químicos e contribuir para sustentabilidade da agricultura, que será menos dependente de insumos químicos (Siqueira & Moreira, 1996). O uso de fungos promotores de crescimento de plantas na forma de inoculantes pode constituir uma alternativa viável para o sucesso desses objetivos.

## 2.4. Interações entre bactérias e fungos promotores de crescimento de plantas

O estudo das interações entre os microrganismos do solo é importante para compreender a dinâmica dos processos que caracterizam as relações entre o solo e as plantas na biosfera (Pereira et al., 2013). As pesquisas sobre tais interações e suas influências no desenvolvimento de espécies vegetais têm contribuído para o entendimento dos processos relacionados a uma agricultura com menor emprego de insumos químicos (Sala et al., 2007).

Alguns grupos de pesquisa têm relatado efeitos benéficos resultantes da interação entre bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Pasqualini et al., 2013; Minaxi et al., 2013; Saxena et al., 2013). De acordo com Artursson et al. (2006), os benefícios dessa interação podem ocorrer em razão do incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, o que por sua vez, proporciona melhores condições para o estabelecimento da associação com as bactérias diazotróficas.

Balota et al. (1997) observaram a eficiência da co-inoculação da bactéria diazotrófica E (E-30) e FMA *Glomus manihotis* em plântulas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). O tratamento apresentou incrementos de 50% na parte aérea e 105% nas raízes.

Sala et al. (2007) estudaram o efeito da co-inoculação de duas bactérias diazotróficas endofíticas (*Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigerae*) com dois fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (*Glomus* sp. e *Acaulospora* sp.) e observaram efeito sinérgico da inoculação mista na colonização das raízes de trigo. De acordo com os autores, as plantas de trigo associadas ao *Glomus*, na presença dos isolados bacterianos, apresentaram maior crescimento, acúmulo e aproveitamento dos nutrientes.

Por outra parte, alguns pesquisadores têm se empenhado em estudar a co-inoculação entre dois ou mais microrganismos colonizadores do solo.

Braz & Nahas. (2012) observaram o efeito da inoculação conjunta entre microrganismos solubilizadores de fósforo (*Aspergillus niger* e *Burkholderia cepacia*) em meio líquido de solubilização. De acordo com os autores, a biomassa microbiana foi reforçada, acompanhada de aumentos nos níveis de fosfato solúvel

e acidez titulável, bem como aumento da fosfatase ácida, evidenciando efeitos sinérgicos entre os microrganismos.

De acordo com Camacho et al. (2001), a co-inoculação da estirpe *Bacillus* sp. CECT 450 com *Rhizobium tropici* CIAT 899 aumentou a nodulação no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). No entanto, as mesmas bactérias co-inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 reduziram a nodulação em soja (*Glycine max* L. Merr.), o que mostra que as interações são espécie-específicas.

Rojas et al. (2001) avaliaram a co-inoculação de duas bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas da rizosfera de manguezais em plântulas de mangue, foi observado aumento de N e P com a aplicação do inóculo misto.

Entender as interações entre microrganismos benéficos do solo é de fundamental interesse para diferentes grupos de pesquisa, já que essas combinações podem ser aplicadas como inoculantes eficazes dentro de sistemas sustentáveis de produção agrícola (Pereira et al., 2013).

## **2.5. Microrganismos solubilizadores de fósforo (P) e mecanismos de solubilização**

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham um papel importante no suprimento de P para diversas culturas (Silva Filho & Vidor, 2001). Estes são capazes de solubilizar formas inorgânicas não disponíveis de P, tornando-as prontamente assimiláveis para plantas (Son et al., 2006).

Vários experimentos foram realizados na tentativa de avaliar a capacidade dos microrganismos em solubilizar P. Dentre os fungos mais promissores para solubilização estão os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Nahas et al., 1990). Entre as bactérias, há estudos indicando que os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter* e *Agrobacterium* apresentam alta atividade solubilizadora (Souchie et al., 2007).

Singh & Reddy, (2011) inocularam o fungo solubilizador de P *Penicillium oxalicum* em plantas de trigo e milho e observaram aumento significativo no crescimento e no rendimento das duas culturas em comparação aos tratamentos não inoculados.

Narloch et al. (2002) estudaram o efeito dos fungos solubilizadores de fosfato *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. aplicando em conjunto diferentes doses do nutriente sobre a produção da matéria seca e na absorção de P pela cultura do rabanete. De acordo com os autores, os isolados diferiram quanto à capacidade de promover a produção de matéria seca, dependendo da dose de P aplicada. Plantas submetidas à inoculação do isolado *Penicillium* sp. com adição de 17,5 mg kg<sup>-1</sup> de P apresentaram produção de matéria seca equivalente às obtidas por plantas com até 70,0 mg de P por kg de solo sem inoculação.

Hameeda et al. (2008) inocularam duas estirpes eficientes na solubilização de P, *Serratia marcescens* EB 67 e *Pseudomonas* sp. CDB 35, em plantas de milho e observaram que os dois microrganismos aumentaram a biomassa vegetal e o rendimento de grãos de milho em relação ao controle não inoculado. Akhtar et al. (2010) inocularam *Bacillus* sp em sementes de algodão e observaram aumento significativo no crescimento e rendimento das plantas em todos os parâmetros avaliados (número de sementes, número de capulhos, peso dos capulhos, comprimento de fibra, altura da planta), além de aumento na concentração de P na planta e no solo.

Shankaraiah et al. (2000) estudaram o efeito da inoculação do solo com as bactérias solubilizadoras de fosfato *Agrobacterium radiobacter* e *Bacillus megaterium* e o fungo *Aspergillus awamori* com diferentes níveis e fontes fosfatadas sobre o crescimento, a produção e a qualidade da cana-de-açúcar e observaram que a inoculação melhorou a eficiência na utilização dos nutrientes, proporcionando economia em fertilizantes fosfatados (25%) e aumento na produção (8-10%).

A capacidade de solubilização de P por diferentes grupos de microrganismos do solo tem sido atribuída à redução do pH no meio (Souche & Abboud, 2007; Silva Filho et al., 2002). Alguns mecanismos de solubilização, como produção de ácidos orgânicos e extrusão de prótons H<sup>+</sup>, têm sido relacionados aos processos de acidificação (Nahas, 1996).

Diversas espécies de fungos e bactérias apresentam habilidade em liberar ácidos orgânicos de baixo peso molecular que atuam dissolvendo o material fosfático, ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato, liberando o P em solução (Sagoe et al., 1998).

De acordo com Illmer et al. (1995), a espécie *Aspergillus niger* foi eficaz na solubilização de  $\text{AlPO}_4$  devido à produção dos ácidos cítrico, oxálico e glucônico. Reyes et al. (1999) observaram correlação positiva entre a solubilização de fosfatos por *Penicillium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico. Barroso & Nahas. (2008) avaliaram a eficiência de solubilização de  $\text{FePO}_4$  por *Aspergillus niger*, em meio de cultura com diferentes fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) e com concentrações crescentes de fosfato e afirmaram que a produção de ácidos foi o principal mecanismo de solubilização do  $\text{FePO}_4$ , devido à correlação positiva entre a produção de fosfato e a acidez do meio. Lin et al. (2005) estudaram os mecanismos de solubilização de P do isolado bacteriano *Burkholderia cepacia* CC-A174 e observaram que seu elevado potencial de solubilização foi devido à produção de ácido glucônico.

Outro mecanismo de solubilização de P é por extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ). De acordo com Fernandes & Souza (1990), com a absorção de amônio, a célula microbiana tem que promover a extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ) para manter a sua eletroneutralidade e o transporte ativo secundário em funcionamento, acidificando o meio e, conseqüentemente, solubilizando o fosfato. Silva Filho & Vidor. (2001) avaliaram a capacidade e o potencial de solubilização de 21 microrganismos solubilizadores de P nos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces* em meio de cultura contendo diferentes fosfatos (Ca, Al ou Fe) e diferentes fontes de N (peptona, amônio e nitrato). De acordo com os autores, a maioria dos isolados solubilizou fosfato de Ca apenas na presença do N amoniacal.

No solo, há uma grande variedade de substratos orgânicos. Alguns grupos de microrganismos possuem habilidade em mineralizar fósforo orgânico tornando esse nutriente prontamente disponível para as plantas (Rodríguez & Fraga, 1999). O processo de mineralização ocorre a partir da liberação de enzimas denominadas fosfatases e fitases, que catalisam a hidrólise de compostos fosfatados orgânicos, promovendo produção de fósforo solúvel (Schmidt & Laskowski, 1961).

Nahas (2002) avaliou a influência da planta (braquiária e guandu), dos fertilizantes (superfosfato simples e fosfato de rocha) e da calagem nas populações de microrganismos produtores de fosfatases ácida e alcalina e observou que do total de bactérias, 70,6% apresentaram atividade de fosfatase

alcalina e 58,2% de fosfatase ácida e dos fungos, 64,3% e 84,7%, respectivamente. De acordo com o autor, esses dados mostram um número significativo de microrganismos com habilidade de mineralização do fósforo orgânico. Abd-Alla (1994) avaliou o comportamento da espécie *Rhizobium leguminosarum* estirpe TAL 1236 em diferentes compostos de fósforo orgânico e observou que a bactéria foi capaz de produzir fosfatases ácidas e alcalinas. Todavia, a sua capacidade de produzir fosfatase alcalina foi muito maior.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Isolamento das bactérias**

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ.

As bactérias do presente trabalho (Tabela 1) foram isoladas e caracterizadas em estudos anteriores, sendo oriundas da coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (LBCT-UENF). As estirpes utilizadas são reconhecidamente promotoras do crescimento vegetal e pertencem a sete espécies bacterianas distintas. Foram selecionadas com intuito de ampliar a variabilidade para os estudos de interação com fungos.

**Tabela 1.** Isolados de diferentes espécies bacterianas e suas características fenotípicas relacionadas à promoção do crescimento de plantas (PCP).

Código	Identificação	Mecanismo de PCP	Referências
B1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC 54	FBN <sup>2</sup> , SP <sup>3</sup> , PF <sup>4</sup>	(Baldani et al., 1986)
B2	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> <sup>1</sup> estirpe RAM 10	FBN, SP	(Baldani et al., 1986)
B3	<i>Burkholderia silvatlantica</i> estirpe 101	FBN, SP	(Perin et al., 2006)
B4	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> estirpe HCC 103	FBN, SP	(Baldani et al., 1996)
B5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> estirpe PAL 5	FBN, SP, PF	(Cavalcante & Döbereiner, 1988)
B6	<i>Azospirillum</i> sp. (UENF 412522)	FBN, SP	(Tarrand et al., 1978)
B7	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (estirpe 21 G1)	SP, SZn <sup>5</sup> , DC <sup>6</sup>	(Aguar, 2012)
B8	<i>Serratia marcescens</i> (estirpe 22 G1)	FBN, SP, SZn, DC	(Aguar, 2012)

<sup>1</sup> *H. seropedicae* estirpe RAM 10 possui inserção através de transposon Tn5 do gene *gfp* (“green fluorescent protein”), e foi cedida pela Dra. Rose Adele Monteiro (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFRP), sendo derivada originalmente da estirpe *H. seropedicae* ZA95 isolada de arroz (Baldani *et al.*, 1986); <sup>2</sup> FBN = Fixação Biológica de N<sub>2</sub>; <sup>3</sup> SP= Solubilização de Fosfatos; <sup>4</sup> PF = Produção de Fitormônios; <sup>5</sup> SZn = Solubilização de Zinco; e <sup>6</sup> DC = Degradação de Celulose.

### 3.2. Isolamento de fungos

Os fungos utilizados foram isolados da rizosfera, da filosfera e do limbo foliar de plantas de milho (*Zea mays* L.) variedade UENF/506-11. Para tanto, sementes de milho foram lavadas em água destilada estéril e, posteriormente, com hipoclorito 5 % por 10 minutos, seguido por três lavagens de 3 minutos cada com água destilada estéril e pré-germinadas em placas de Petri contendo meio solidificado ágar-água autoclavado. Após dois dias, as plântulas de milho foram transferidas para copos de plástico (500 mL) contendo 450 g de vermicomposto produzido a partir de esterco bovino. O material foi mantido em casa de vegetação e todos os dias as plantas receberam 50 mL de água. Aos 14 dias as plantas de milho foram coletadas para a realização do isolamento dos fungos.

Para isolamento foram utilizadas três estratégias: 1- O vermicomposto rizosférico foi coletado e submetido a diluições seriadas em solução salina (8,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl) e a seguir foi plaqueado em meio batata-dextrose-ágar (BDA),

contendo 20 g L<sup>-1</sup> de Dextrose, 15 g L<sup>-1</sup> de Ágar, 4 g L<sup>-1</sup> de infusão de batata e 100 mg L<sup>-1</sup> de tetraciclina (Zauza et al., 2007). Foram utilizados 10 g do vermicomposto rizosférico, inicialmente diluído em 90 mL de solução salina e esse material foi submetido à agitação durante 60 minutos (diluição 10<sup>-1</sup>). Em seguida, foram feitas diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>, transferindo-se sucessivamente 1 mL da suspensão, de cada diluição, para tubos com 9 mL de solução salina. Das diluições 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de Petri com meio de cultivo BDA, incubadas a 28 °C, para o crescimento dos fungos (fungos rizosféricos); 2- Para o isolamento de fungos endofíticos do limbo foliar, 1 g de folhas de milho foram previamente desinfestadas (imersão das sementes em etanol 95 %, por 90 segundos sob agitação de 100 rpm, fazendo 4 lavagens sucessivas de 3 minutos cada em água destilada estéril, imergindo posteriormente durante 10 minutos em hipoclorito 5%, fazendo 3 lavagens de 3 minutos cada com água destilada estéril) e maceradas em 90 mL de solução salina. Em seguida, foram submetidas ao mesmo método de diluição seriada; 3- para o isolamento de fungos associados à filosfera das plantas, quatro segmentos de 1 cm<sup>2</sup> de folhas de milho não desinfestadas foram incubadas na superfície das placas contendo meio sólido BDA, à temperatura de 28 °C, por 7 dias.

Todos os fungos isolados foram repicados até a obtenção de cultura pura e foram armazenados em vidros de penicilina contendo 5 mL de meio sólido BDA inclinado e coberto com óleo mineral autoclavado. Para a execução dos diferentes ensaios, discos de 5 mm de cada isolado fúngico foram retirados do estoque, inoculados em meio sólido (BDA) e incubados a 28 °C por 7 dias.

### **3.3. Caracterização morfológica dos fungos isolados de plantas de milho**

A caracterização morfológica dos isolados fúngicos foi realizada por meio das avaliações macro e micromorfológica, após o crescimento de cada fungo em meio de cultura BDA (batata-ágar-dextrose), a 28 °C. Para a classificação macromorfológica, discos de 5 mm dos isolados foram colocados, separadamente, no centro das placas de Petri em meio BDA. Após 7 dias foram observadas as características das colônias quanto a coloração, aspecto da colônia (grumosa, aveludada ou lisa), abundância do micélio (abundante ou escasso) e forma dos bordos (regular ou irregular) (Nogueira et al., 2005). A

classificação micromorfológica foi feita pela observação dos esporos e esporóforos, estruturas importantes para a identificação taxonômica. Para realização desta análise, seguiu-se a técnica do microcultivo em lâmina Ridell (1950) (Figura 1). Após 7 dias de crescimento, as estruturas reprodutivas foram visualizadas em microscópio óptico Axioplan (Zeiss). Os isolados foram inicialmente identificados com o auxílio de chave morfológica *Illustrated genera of imperfect fungi*.



**Figura 1.** Técnica de microcultivo para a observação de estruturas microscópicas dos isolados fúngicos (Ridell, 1950).

### 3.4. Extração de DNA e identificação molecular dos fungos

#### 3.4.1. Isolamento das pontas das hifas dos isolados fúngicos

O isolamento das pontas das hifas foi obtido a partir dos fungos purificados. Um disco (5 mm de diâmetro) do isolado foi transferido para placas contendo ágar-água (20 %) e incubado por quatro dias a 28 °C. Ao observar a formação das primeiras hifas fúngicas, essas estruturas foram removidas com auxílio de um bisturi esterilizado e transferidas para placas de Petri contendo meio

BDA com a utilização de uma lupa. Após sete dias na estufa a 28 °C, os isolados foram utilizados na extração de DNA genômica.

### **3.4.2. Extração e quantificação do DNA genômico dos isolados fúngicos**

O DNA genômico dos fungos foi extraído utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) (Pinho et al., 2012), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. O micélio dos fungos foi retirado cuidadosamente das placas com BDA com o auxílio de palitos autoclavados e o macerado em nitrogênio líquido com pistilo. A maceração foi feita colocando o tubo externamente em contato com o nitrogênio. No material foi adicionado 100 µl de Nuclei Lysis Solution e 100 mg de PVP (polivinilpirrolidona), para continuação do processo de maceração. Posteriormente, foi adicionado 500 µl de Nuclei Lysis Solution e centrifugado a 14000 rpm por 15 min. Esse material foi incubado a 65 °C por 15 min e armazenado no freezer por 5 min. Após esse procedimento, foram adicionados ao material, 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e centrifugado por 10 min a 14000 rpm. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi aplicado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol resfriado. Esse material foi cuidadosamente misturado por aproximadamente 5 min, incubado no freezer por 20 min e centrifugado a 14000 rpm por 5 min. Nessa etapa, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspenso em 600 µL de etanol 70% resfriado. Em seguida o microtubo foi invertido várias vezes para purificar o DNA e foi centrifugado a 14000 rpm por 5 min. Logo após, o etanol foi removido e o material foi ressuspenso novamente em etanol 70% para outra lavagem, repetindo o procedimento descrito acima. Após remover o etanol, os eppendorfs foram deixados em posição horizontal, com a tampa aberta sobre o papel toalha para a secagem do pellet por 15 min. Com o material devidamente seco, foram aplicados 75 µL de “DNA Rehydration Solution” e 3 µL de RNA Solution. Posteriormente, o material foi misturado invertendo os eppendorfs várias vezes por 2 min e incubado, a 37 °C por 15 min. O DNA eluído foi armazenado a -20 °C até sua utilização. Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação no aparelho espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific®) para mensurar a concentração do DNA genômico, com leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm.

### **3.4.3. Eletroforese em gel de agarose**

A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gel consiste em 100 mL de solução TAE 1 X e 0,8 g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra de DNA foi misturada a 3  $\mu\text{L}^{-1}$  de gelred e 3  $\mu\text{L}^{-1}$  de blue Juice e aplicados ao gel de eletroforese em tampão TAE 1 X. A corrida de eletroforese foi realizada a 80 V, por 1 h. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado marcador Lambda DNA (100 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

### **3.4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As reações de amplificação foram realizadas com os primers ITS1, ITS 4, EF1, EF2 e Bt1a e Bt1b (Tabela 2). As condições da reação foram as seguintes: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,06  $\mu\text{M}$  de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , e volume final de 50  $\mu\text{l}$ . A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler, com desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; seguida de extensão final de 3 min a 72 °C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 2% (p/v) com o peso molecular Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

**Tabela 2.** Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primers) para reações de sequenciamento.

Fungo	Primer	Sequência (5'>3')	Referência
<i>Penicillium</i> sp.	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Curvularia</i> sp.	Bt1a	TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG	Glass & Donaldson (1994)
	Bt1b	GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	
	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Helminthosporium</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Gliocladium</i> sp.	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Fusarium</i> sp.	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
	EF1	ATGGGTAAGGA(A G)GACAAGAC	Geiser et al.,2004
	EF2	GGA(G A)GTACCAGT(G C)ATCATGTT	
<i>Aspergillus</i> sp.	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Trichoderma</i> sp.	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

### 3.4.5. Purificação do produto da PCR para sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96), seguindo as recomendações do fabricante. Foram adicionados cuidadosamente 36 µL do reagente AMPure em cada poço da placa contendo 20 µL dos produtos de PCR de cada fungo e esse material foi misturado 10 vezes com pipeta eletrônica. As amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. A placa com a reação foi colocada sobre a placa magnética Agencourt SPRIPlate 96, durante 2 min. Em seguida, a solução foi retirada da placa e descartada. Alíquotas de 200 µL de etanol 70% foram adicionadas em cada poço da placa de reação e incubadas durante 30 s à temperatura ambiente. Logo após, o etanol foi descartado e repetiu-se esse processo por 2 vezes. Essas etapas foram realizadas com a placa de reação sobre a placa magnética Agencourt SPRIPlate 96. Em seguida, foram adicionados 40 µL de tampão Tris-acetato, pH 8,0, em cada poço da placa de reação e esse material foi misturado com pipeta 10 vezes,

ficando por 1 min sobre a placa magnética Agencourt SPRIPLate 96. As amostras purificadas foram transferidas para uma nova placa e enviadas para sequenciamento na empresa ACTGENE- Serviço de Sequenciamento.

#### **3.4.6. Análise das sequências**

As sequências de fungos obtidas foram comparadas com aquelas disponibilizadas no banco de dados do NCBI (Nacional Center Biotechnology Information – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), pelo programa BLAST (Basic local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) para nucleotídeos. As sequências em estudo foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (Thompson et al., 1994) e agrupadas pelo método Neighbour-joining utilizando o programa Mega 5.1 ([www.Megasoftware.net](http://www.Megasoftware.net)) (Tamura et al., 2007).

#### **3.4.7. Árvore filogenética**

Regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências foram junto com o conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) existente no software MEGA v. 5 (Tamura et al. 2013). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes.

A análise multigene de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (Posada & Buckley 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os modelos foram estimados separadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). Os modelos de evolução selecionados para cada região gênica foram: F1 (GTR+I+G para ITS e HKY+I+G para  $\beta$ -Tubulina); F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9, F10 (K80+G para ITS e GTR+G para Tef-1 $\alpha$ ); F6 (GTR+I+G para ITS e GTR+G para Tef-1 $\alpha$ ); F11 (GTR+I+G para ITS e GTR+G para Tef-1 $\alpha$ ); F12 (GTR+G para ITS e HKY+I para  $\beta$ -Tubulina). A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10 000 000 de

gerações. As árvores foram amostradas a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2 500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7 500 árvores remanescentes. A convergência dos log de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (Rambaut & Drummond 2013). A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut 2009) e exportada para programas gráficos.

### **3.5. Caracterização *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento dos isolados fúngicos**

#### **3.5.1. Solubilização de P**

O crescimento e atividade solubilizadora de fosfato dos isolados fúngicos foi avaliado em meio sólido Pikovskaya ágar (0,5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2 g L<sup>-1</sup> NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> KCl; 0,02 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,002 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 10,0 g L<sup>-1</sup> glicose; 0,5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 15 g Ágar (Pikovskaya, 1948), suplementado com 1 g fosfato de cálcio tribásico Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ou 1 g de fosfato de rocha Araxá e 0,03 g L<sup>-1</sup> de rosa bengala, com três repetições para cada ensaio. As placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C. A capacidade de solubilização foi identificada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia. O índice de solubilização (IS) foi determinado pela relação entre o diâmetro do halo (cm) e o diâmetro da colônia (cm) (Berraquero et al., 1976).

#### **3.5.2. Solubilização de Zn**

Para determinar a capacidade de solubilização de zinco, os isolados fúngicos foram inoculados no centro da placa de Petri com meio sólido contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCl, 0,1 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0 g L<sup>-1</sup> de ZnO e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar. As placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C, com três repetições para cada fungo. A avaliação da solubilização foi realizada determinando o índice de solubilização (IS) (Berraquero et al., 1976).

### 3.5.3. Degradação de Celulose

O meio de cultivo mineral mínimo ( $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ;  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ;  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$ ;  $10,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) suplementado com caboximetilcelulose ( $0,1 \text{ g Kg}^{-1}$ ) como única fonte de carbono, foi utilizado para avaliar a capacidade celulolítica dos fungos. A atividade foi avaliada após o período de incubação, onde foram adicionados sobre a placa de cultivo 10 mL de solução corante de vermelho congo ( $0,0025 \text{ g Kg}^{-1}$ ) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, durante 30 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida o material inoculado foi lavado por 5 min em 5 mL de solução de NaCl (0,5 M) preparados no mesmo tampão. O halo amarelo ao redor da colônia indicou a atividade de degradação de celulose (Cavalheiro et al., 2009).

### 3.6. Ensaios de compatibilidade fungo-bactéria

Os isolados fúngicos foram crescidos separadamente, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA por 7 dias a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Já as bactérias foram crescidas em meio de cultivo Dygs líquido (Döbereiner, et al., 1995b) durante 48 h, contendo 2 g-dextrose; 1,5 g peptona bacteriológica;  $0,5 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$ ; 2 g extrato de levedura;  $0,5 \text{ g de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 g de ácido L-Glutâmico; 1 L de água destilada, esterilizada em autoclave, a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 20 min.

Para os ensaios *in vitro* de compatibilidade, foram inoculados no centro das placas de Petri, contendo meio BDA, discos de 5 mm, cortados no bordo das colônias dos fungos purificados e, em cada extremidade, foram inoculadas alíquotas de  $10 \text{ } \mu\text{L}$  das bactérias (quatro bactérias por fungo) e em seguida as placas foram incubadas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 dias. Após esse período, foi avaliada a formação da zona de compatibilidade ou halo de inibição do fungo sobre o crescimento das colônias bacterianas. Os testes foram realizados em triplicatas, 6 placas para cada fungo, totalizando 72 placas. A compatibilidade entre os microrganismos foi classificada de acordo com os seguintes critérios: quando o fungo ultrapassou totalmente a superfície da bactéria considerou-se alta compatibilidade ( $C_1$ ); quando as hifas tocarem as colônias bacterianas, sem cobri-las, média compatibilidade ( $C_{1/2}$ ), e considerou-se baixa compatibilidade ( $C_2$ ), no caso do fungo não tocar colônias bacterianas.

### 3.7. Análise *in vitro* da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos isolados e em co-cultivo com bactérias benéficas

O índice de solubilização (IS) de fosfato dos 12 fungos isolados, e a combinação de cada um deles com as bactérias benéficas, foram avaliados em meio sólido Pikovskaya ágar, como descrito no tópico 3.4.1, suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio tribásico, Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Meio SFS) ou com 1 g L<sup>-1</sup> fosfato de rocha Araxá, (Meio R). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 7 dias, a presença do halo translúcido ao redor das colônias indicou a capacidade de solubilização de fosfato pelos microrganismos. O índice de solubilização (IS) foi determinado pela relação entre o diâmetro do halo (cm) e o diâmetro das colônias mistas (cm) (Berraquero et al., 1976).

A partir dos resultados obtidos acima para as combinações de doze fungos e oito bactérias, foram selecionadas duas combinações sinérgicas (aquelas que a interação bactéria-fungo produziu halos de solubilização maiores que o fungo isolado) e duas combinações antagônicas (aquelas que a interação bactéria-fungo produziu halos de solubilização menores que o fungo isolado). Assim, foram testados os fungos F2 (*Curvularia geniculata*) e F10 (*Curvularia geniculata* CBS 18750) com as bactérias B2 (*Herbaspirillum seropedicae* RAM 10) e B8 (*Serratia marcescens* 22 GI). Para tanto, alíquotas de 100 µL de cada um dos microrganismos individuais (F2, F10, B2 e B8) e das interações (F2+B2, F2+B8, F10+B2 e F10+B8) foram transferidas para tubos de ensaio de 50 mL contendo meio líquido Pikovskaya, suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio tribásico, Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Meio SFS) ou com 1 g L<sup>-1</sup> fosfato de rocha Araxá, (Meio R). Os tubos permaneceram sob agitação constante no agitador orbital a 150 rpm durante 7 dias a 28 °C. Após esse período, foram centrifugados a 3200 rpm durante 15 min, e o sobrenadante foi usado para determinação do pH, por meio do pHmetro (Digimed DM 22) e para a quantificação dos níveis de fósforo solúvel pelo método colorimétrico do molibdato de amônio (Embrapa, 1997), com leitura da absorbância a  $\lambda = 600$  nm. Foi realizada análise estatística somente para o índice de solubilização (IS) final. Os dados foram submetidos à análise de classificação simples (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, em 95 % de confiança, utilizando-se o GraphPad Prisma® versão 6.

### 3.8. Efeito da co-inoculação do fungo (F10) e bactéria (B8) no crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.)

Nos experimentos foram usadas duas fontes de fósforo (Superfosfato simples-(SFS) e fosfato de Rocha Araxá-(R)) e dois microrganismos solubilizadores de P, o fungo *Curvularia geniculata* isolado (F10) e a bactéria *Serratia marcescens* (B8), que apresentaram efeito promissor para solubilização *in vitro*. Sementes de milho (*Zea mays*) da variedade UENF/506-11 foram previamente desinfestadas, como explicado no tópico 3.2 e cultivadas em tubos de ensaios de diâmetro 2 cm e altura 20 cm, contendo 40 g de areia lavada e autoclavado por 3 vezes a 120 °C por 1 h. Foi testado o efeito de fontes de P de baixa (R) e alta solubilidade (SFS), com doses de P equivalentes a 80 Kg ha<sup>-1</sup> (40 mg Kg de P). Para tal, foi utilizado um total de 7 tratamentos, 4 deles não receberam microrganismos, somente as duas fontes fosfatadas aplicadas separadamente (R) e (SFS) e em conjunto (R+SFS). Os 3 tratamentos restantes apresentavam a adubação com as duas fontes fosfatadas combinadas com a mesma dose de P-equivalente e inoculadas com os microrganismos solubilizadores de P separados (B8+R+SFS) e (F10+R+SFS) e em associação (F10+B8+R+SFS). Os fertilizantes foram aplicados de forma localizada, 3 cm abaixo da semente, para reduzir a fixação de P pelo substrato. O controle absoluto (Ca) recebeu apenas areia. A cada dois dias, as plantas receberam 4 mL de água destilada autoclavada.

A inoculação dos microrganismos foi realizada no momento do plantio por meio da aplicação direta sobre as sementes. Alíquotas de 1 mL da cultura líquida de bactérias foram ajustadas para 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por mL<sup>-1</sup> por meio de leitura em espectrofotômetro a densidade óptica de 600 nm. O inóculo fúngico foi padronizado a partir de suspensões dos discos de 0,5 cm de diâmetros em solução salina estéril 0,85 % (p/v) em proporção 1:1. O número de esporos foi ajustado para 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup> com auxílio da câmara de Neubauer.

Dez dias após a germinação, as plantas foram coletadas e segmentadas em parte aérea (PA) e raiz (R). A partir de então, foram determinados os parâmetros de crescimento: altura da PA (cm) e comprimento da R (cm) com régua de escala 1:100, massas frescas e secas da parte aérea (MFPA, MSPA) e raiz (MFR, MSR) em balança analítica, sendo MSPA e MSR obtidos após

secagem em estufa de circulação de ar forçado, a 65° C, por 72 h. Foi realizado delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições. A comparação entre médias dos tratamentos foi feita por meio do teste de Tukey em 95% de confiança, utilizando o GraphPad Prisma® versão 6.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Isolamento e caracterização macro e micromorfológica dos fungos**

Foram isolados doze fungos oriundos da filosfera, do limbo foliar e da rizosfera de plantas de milho tratadas com vermicomposto à base de esterco bovino (Tabela 3). Silva et al. (2006) isolaram 110 fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de plantas de pinha e observaram que as maiores taxas de colonização foram encontradas nas folhas. Todavia, os mesmos autores isolaram 90 fungos endofíticos de diferentes partes da planta de graviola, e não observaram diferenças significativas na taxa de colonização. De acordo com os autores, esses resultados indicam que qualquer uma das partes da planta pode ser utilizada no processo de isolamento de fungos endofíticos.

**Tabela 3.** Origem, posição taxonômica com base nos aspectos morfológicos e características dos fungos isolados da filosfera, rizosfera e limbo foliar de plantas de milho tratadas com vermicomposto à base de esterco bovino.

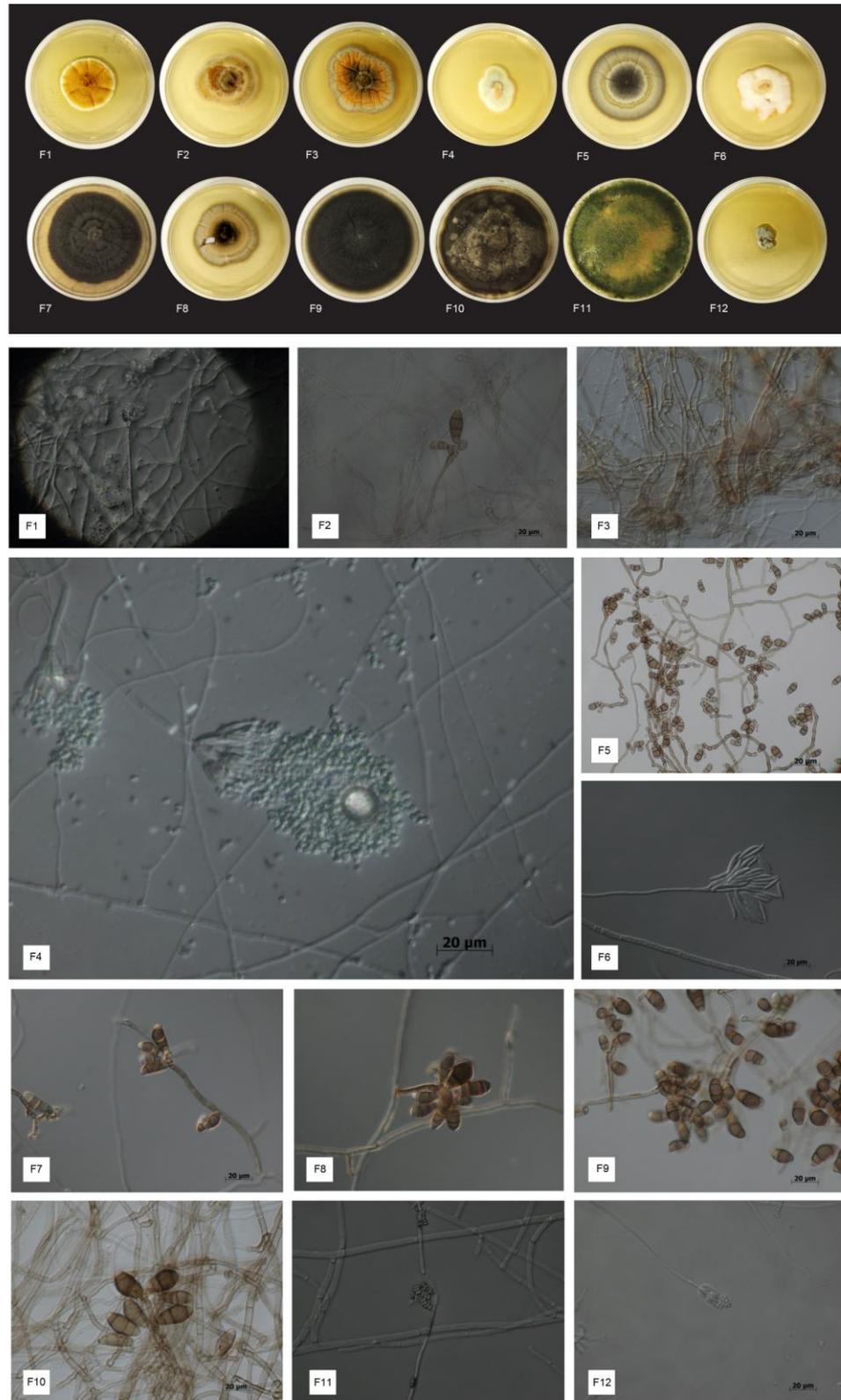
<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>
F1	Filosfera	Superfície foliar
F2	Limbo foliar	-5
F3	Filosfera	Superfície foliar
F4	Filosfera	Superfície foliar
F5	Limbo foliar	-5
F6	Limbo foliar	-5
F7	Limbo foliar	-5
F8	Limbo foliar	-5
F9	Limbo foliar	-5
F10	Limbo foliar	-5
F11	Rizosfera	-5
F12	Filosfera	Superfície foliar

Nas avaliações macromorfológicas foram encontradas variações visuais relevantes entre os isolados fúngicos, especialmente em relação à coloração e ao aspecto das colônias (Tabela 4). Quanto às características dos micélios, 50% apresentaram micélio abundante e 50% escasso. Quanto às colônias, 33,3% apresentaram aspecto grumoso, 41,6% aveludado e 25% liso. De acordo com o bordo, 66,6% exibiram formatos regulares e 33,3% irregulares.

**Tabela 4.** Características macromorfológicas das colônias de fungos em meio BDA após 7 dias de crescimento a 28°C.

<b>Código</b>	<b>Cor</b>	<b>Micélio aéreo</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Bordos</b>
F1	Amarelo	Abundante	Grumoso	Irregular
F2	Cinza	Abundante	Aveludado	Regular
F3	Marron	Escasso	Grumoso	Irregular
F4	Colorido	Abundante	Aveludado	Regular
F5	Verde	Escasso	Grumoso	Regular
F6	Branco	Abundante	Aveludado	Irregular
F7	Preto	Escasso	Liso	Regular
F8	Marron	Escasso	Liso	Regular
F9	Preto	Escasso	Liso	Regular
F10	Cinza	Abundante	Aveludado	Regular
F11	Verde	Abundante	Aveludado	Regular
F12	Cinza	Escasso	Grumoso	Irregular

De acordo com Peres et al. (2010), a caracterização morfológica fornece dados importantes sobre os microrganismos, porém é bastante limitado devido ao baixo número de caracteres para as avaliações. Com relação à caracterização micromorfológica, os fungos foram avaliados quanto à presença ou não de septos nas hifas e tamanho dos esporos (Figura 2). Foi possível observar esporos na maioria dos isolados fúngicos, com exceção do fungo F3, no qual só foi possível observar hifas (Figura 2).



**Figura 2.** Cultura pura dos fungos em meio sólido BDA e microscopia óptica desses microrganismos: Em que F1 (*Penicillium* sp.), F2 (*Curvularia* sp.), F3 (*Helminthosporium* sp.), F4 (*Gliocladium* sp.), F5 (*Curvularia* sp.), F6 (*Fusarium* sp.), F7 (*Curvularia* sp.), F8 (*Curvularia* sp.), F9 (*Curvularia* sp.), F10 (*Curvularia* sp.), F11 (*Trichoderma* sp), F12 (*Aspergillus* sp.).

As avaliações macro e micromorfológicas indicaram que apenas um fungo apresentou características morfológicas semelhantes ao gênero *Penicillium* sp (F1), seis ao gênero *Curvularia* sp. (F2, F5, F7, F8, F9 e F10), um ao gênero *Helminthosporium* sp.(F3), um ao gênero *Gliocladium* sp. (F4), um ao gênero *Fusarium* sp. (F6), um ao gênero *Trichoderma* sp. (F11) e um ao gênero *Aspergillus* sp. (F12) (Figura 2).

Os fungos pertencentes ao gênero *Curvulária* sp. apresentaram pouca variação no tamanho e coloração dos conídios. Mas, diferiram na coloração das colônias, assim como no aspecto do micélio. Possivelmente, esses microrganismos são de espécies ou estirpes diferentes. Tais resultados estão de acordo com os de Ferreira (2010), em que as análises morfológicas revelaram uma elevada variabilidade dos isolados de *Curvularia* sp cultivados em meio BDA a 28° C, de 7 a 14 dias. Segundo a mesma autora, estudos sobre morfologia envolvendo este gênero são escassos e não fornecem dados suficientes para propor uma identificação em espécie.

Tanto o gênero *Curvularia* sp. quanto o gênero *Fusarium* sp. são conhecidos na literatura por causar doenças em variadas espécies de plantas (Felipe et al., 2010; Silva et al., 2014; Brito & Nascimento, 2015). De acordo com Wilson (1995), fungos patogênicos podem apresentar uma fase endofítica em seu ciclo de vida, sem exibir sintomas da doença após a infecção. No presente trabalho as plantas de milho utilizadas para o isolamento dos fungos não apresentaram nenhuma característica ou efeito de infecção por fitopatógenos.

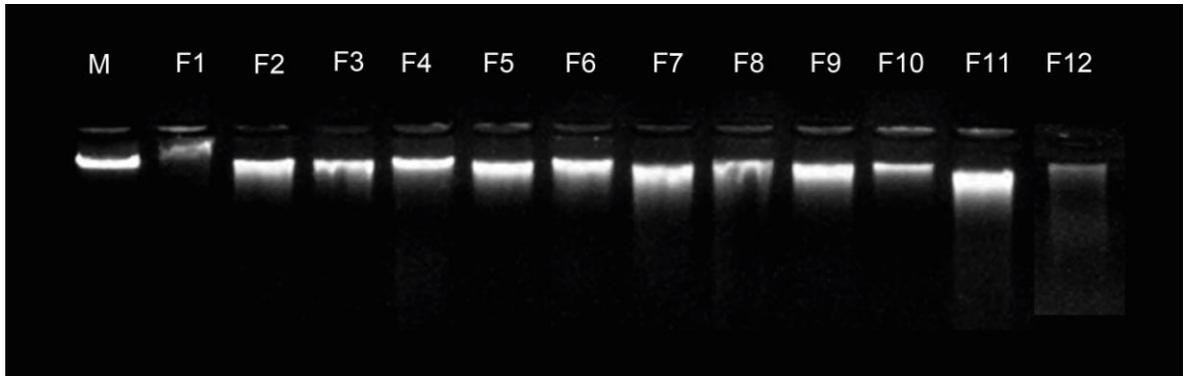
Rubine et al. (2005) identificaram 23 gêneros de fungos endofíticos em ramos de cacaueteiro e observaram que o gênero *Fusarium* sp. apresentou alta frequência no isolamento. Ferreira (2010) isolou fungos endofíticos do gênero *Curvularia* sp. em plantas de milho saudáveis. Segundo Kharwar et al. (2011), fungos considerados fitopatógenos podem habitar nos tecidos internos de espécies vegetais sem causar prejuízos aos hospedeiros. Esses fungos podem exibir diversas funções importantes para o hospedeiro, apresentando características potencialmente úteis na agricultura e contribuindo para a promoção de crescimento de plantas (Santos & Varavallo, 2011). Luz et al. (2006) isolaram fungos endofíticos conhecidos na literatura como fitopatogênicos de folhas, caules e raízes de plantas sadias de maracujazeiro-amarelo e avaliaram o potencial desses microrganismos em estimular o crescimento de mudas da

mesma planta. Os autores sugeriram que a inoculação da *Curvulária* sp proporcionou incrementos da biomassa fresca e seca da planta devido à produção de fitormônios pelo fungo.

## 4.2. Análise dos isolados fúngicos por meio de técnicas moleculares

### 4.2.1. Extração de DNA

Foi realizada a extração do DNA genômico de doze fungos oriundos da rizosfera, da filosfera e do limbo foliar de plantas de milho (*Zea mays*). Os DNAs apresentaram qualidade satisfatória para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 3). De acordo com Novais et al. (2010), a identificação de fungos apenas por análise das características morfológicas é ineficiente para caracterização em nível de espécie. Para tanto, as técnicas moleculares têm contribuído para expandir o conhecimento sobre a diversidade e distinguir diferenças entre isolados de uma mesma espécie (Avio et al., 2010).

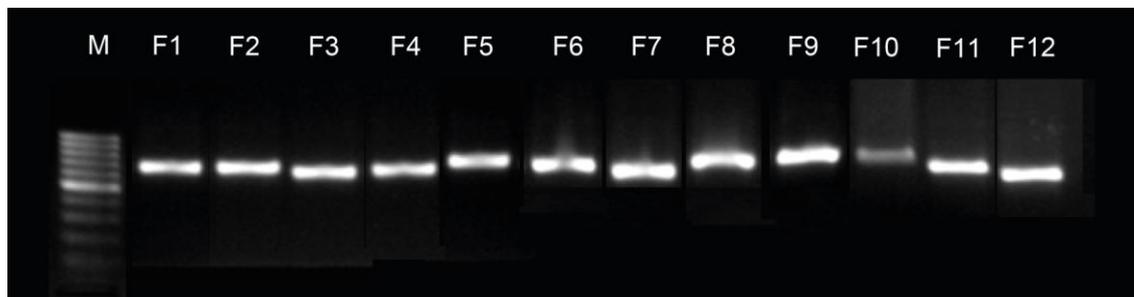


**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA genômico dos doze isolados fúngicos. Em que M- marcador de massa Lambda DNA ( $100 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ), F1 (*Penicillium* sp.), F2 (*Curvularia* sp.), F3 (*Helminthosporium* sp.), F4 (*Gliocladium* sp.), F5 (*Curvularia* sp.), F6 (*Fusarium* sp.), F7 (*Curvularia* sp.), F8 (*Curvularia* sp.), F9 (*Curvularia* sp.), F10 (*Curvularia* sp.), F11 (*Trichoderma* sp), F12 (*Aspergillus* sp.).

#### 4.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e árvore filogenética dos isolados fúngicos

Para a identificação molecular, regiões conservadas do gene do RNA ribossômico (ITS - Espaço Interno Transcrito) do DNA genômico dos isolados fúngicos foram amplificadas. De acordo com Lanfranco et al. (1998), a região ITS é de extrema importância em estudos de caracterização molecular de fungos, já que essas regiões são geralmente constantes, ou apresentam pequena variação dentro de espécies, mas são bastante distintas entre espécies de um gênero.

O tamanho dos fragmentos amplificados variou de aproximadamente 700 a 800 pares de base (Figura 4).

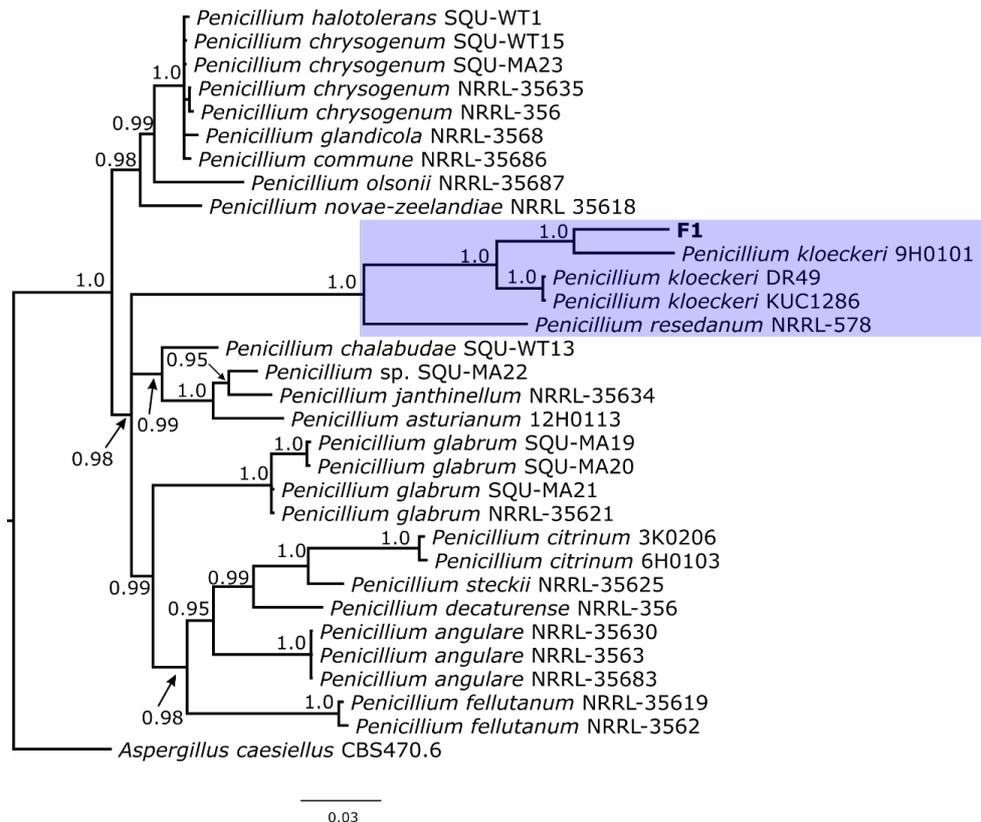


**Figura 4.** Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose 2 % dos isolados F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11 e F12, usando os primers ITS1 e ITS4. Em que M- marcador de peso molecular Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L, F1 (*Penicillium* sp.), F2 (*Curvularia* sp.), F3 (*Helminthosporium* sp.), F4 (*Gliocladium* sp.), F5 (*Curvularia* sp.), F6 (*Fusarium* sp.), F7 (*Curvularia* sp.), F8 (*Curvularia* sp.), F9 (*Curvularia* sp.), F10 (*Curvularia* sp.), F11 (*Trichoderma* sp.), F12 (*Aspergillus* sp.).

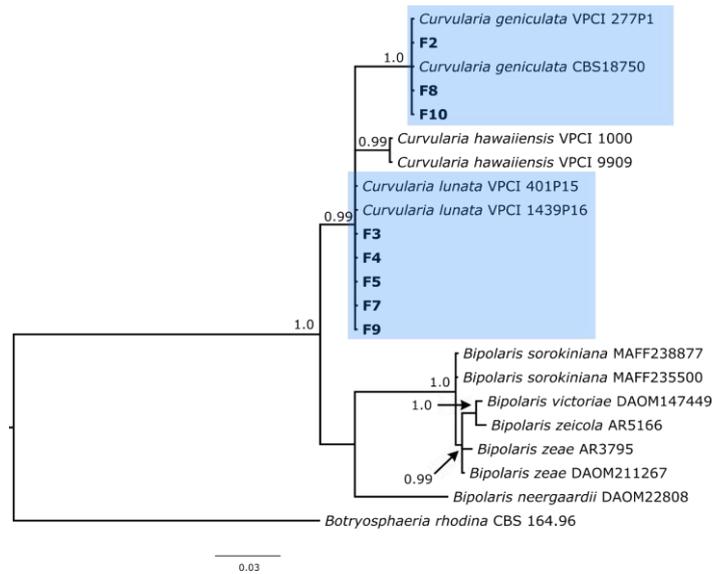
Os produtos de amplificação da PCR foram sequenciados e comparados com dados de sequências de espécies descritas no GenBank (National Institute of Health), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. As árvores filogenéticas baseadas na Inferência Bayesiana representam o nível de similaridades das sequências obtidas para os doze fungos depositados no GenBank.

A análise filogenética combinada das regiões gênicas ITS, Tef-1 $\alpha$  e  $\beta$ -Tubulina resultou na identificação de 6 espécies: *Penicillium kloeckeri* (F1), *Curvularia geniculata* (F2, F8 e F10), *Curvularia lunata* (F3, F4, F5, F7 e F9),

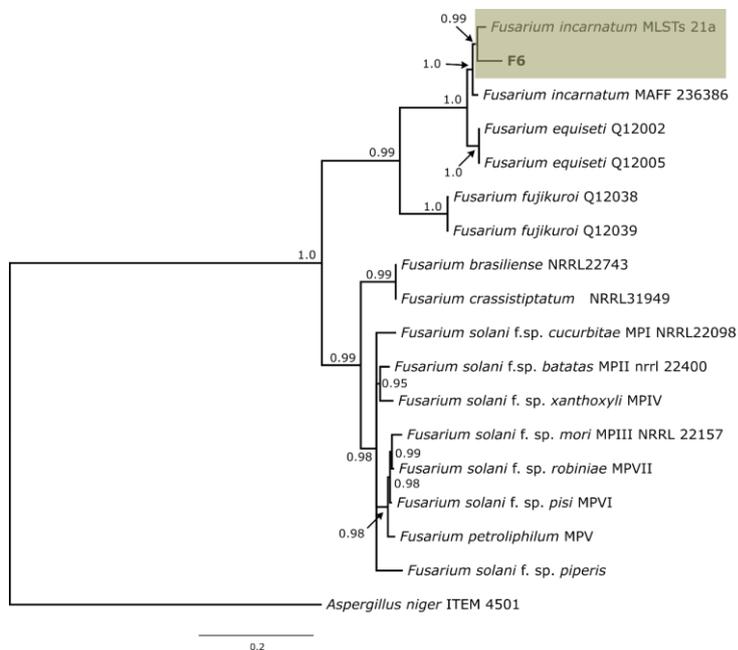
*Fusarium incarnatum* (F6), *Trichoderma harzianum* (F11) e *Aspergillus caesiellus* (F12). Estas espécies foram agrupadas em clados com bom suporte de probabilidade posterior, acima de 0,9 (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9).



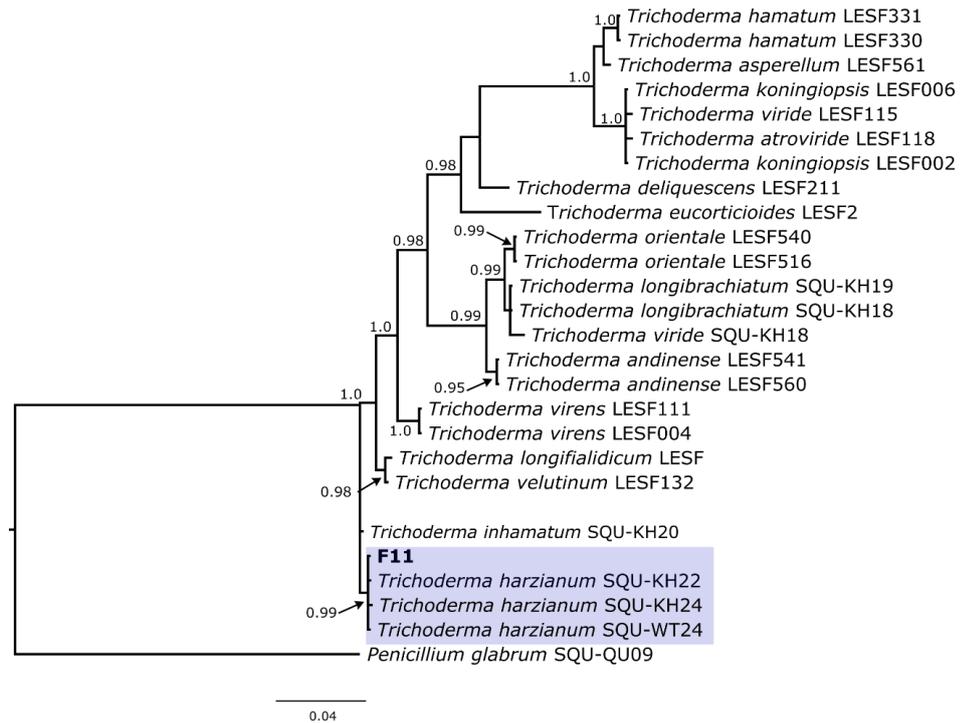
**Figura 5.** Árvore filogenética multigene baseada na Inferência Bayesiana de seqüências combinadas dos genes ITS e  $\beta$ -Tubulina de isolado de *Penicillium* obtido de plantas de milho tratadas com esterco bovino. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Aspergillus caesiellus* CBS470.6.



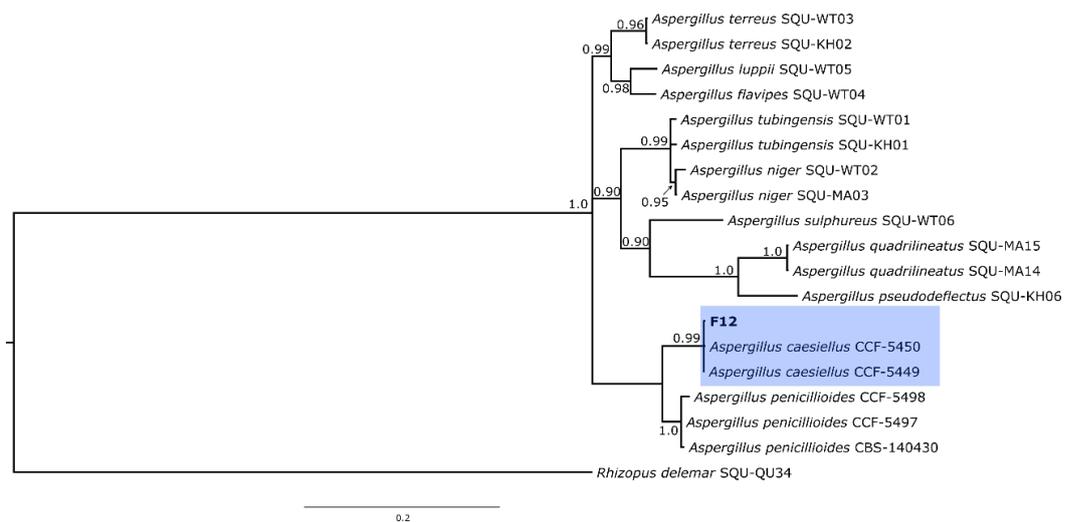
**Figura 6.** Árvore filogenética multigene baseada na Inferência Bayesiana de seqüências combinadas dos genes ITS e Tef-1 $\alpha$  de isolado de *Curvularia* obtido de plantas de milho tratadas com esterco bovino. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Botryosphaeria rhodina* CBS 164.96.



**Figura 7.** Árvore filogenética multigene baseada na Inferência Bayesiana de seqüências combinadas dos genes ITS e Tef-1 $\alpha$  de isolado de *Fusarium* obtido de plantas de milho tratadas com esterco bovino. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Aspergillus niger* ITEM 4501.



**Figura 8.** Árvore filogenética multigene baseada na Inferência Bayesiana de sequências combinadas dos genes ITS e Tef-1 $\alpha$  de isolado de *Trichoderma* obtido de plantas de milho tratadas com esterco bovino. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Penicillium glabrum* SQU-QU09.



**Figura 9.** Árvore filogenética multigene baseada na Inferência Bayesiana de sequências combinadas dos genes ITS e  $\beta$ -Tubulina de isolado de *Aspergillus* obtido de plantas de milho tratadas com esterco bovino. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Rhizopus delemar* SQU-QU34.

O fungo F1 foi identificado como *Penicillium kloeckeri*, pois apresentou probabilidade posterior (pp) de 1,0 agrupando no clado desta espécie (Figura 5). Os fungos F2, F8 e F9 mostraram alta similaridade no clado referente à espécie *Curvulária geniculata*, apresentando pp= 1,0 (Figura 6). Os fungos F3, F4, F5, F7 e F9 foram identificados como *Curvulária lunata*, pois apresentaram pp= 0,99 agrupando no clado da espécie *Curvulária lunata* (Figura 6). O fungo F6 foi identificado como *Fusarium incarnatum*, pois apresentou pp=0,99 agrupando no clado da espécie *Fusarium incarnatum* (Figura 7). O fungo F11 foi identificado como *Trichoderma harzianum*, pois apresentou pp= 0,99 agrupando no clado da espécie *Trichoderma harzianum* (Figura 8). O fungo F12 foi identificado como *Aspergillus caesillus*, pois apresentou pp= 0,99 agrupando no clado da espécie *Aspergillus caesillus* (Figura 9). Oliveira. (2014) isolou fungos endofíticos de folhas sadias de coqueiro e por meio da caracterização morfológica e molecular também observou a presença de fungos da espécie *Curvularia geniculata*. Huang et al. (2009) estudaram a caracterização molecular e árvores filogenéticas baseadas na Inferência Bayesiana de trinta e quatro fungos endofíticos isolados de plantas do gênero *Artemisia* e observaram a presença das seguintes espécies de *Curvularia*: *Curvularia lunata*, *Curvularia cymbopogonis*, *Curvularia gladioli*, *Curvularia gudauskasii*, *Curvularia heteropogonicola* e *Curvularia inaequalis*. Divakara et al. (2013) avaliaram por meio de técnicas moleculares diferentes espécies de *Fusarium* sp, isoladas de sementes de sorgo e identificaram as seguintes espécies: *F. verticillioides*, *F. thapsina* e *F. incarnatum*. Sette et al. (2006) caracterizaram, por meio de ferramentas moleculares, fungos filamentosos isolados de plantas de café e observaram a presença de espécies como: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma aureoviride*.

A identificação macro e micromorfológica dos isolados F2 e F3 em nível de gênero não foi compatível com a identificação molecular por meio das sequências do GenBank. Mergulhão et al. (2014) estudaram a caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) isolados de áreas de mineração de gesso e também observaram que a identificação morfológica dos isolados de FMA em alguns casos não foi confirmada pela identificação molecular. De acordo com os autores, a identificação taxonômica dos FMA apresenta algumas dificuldades, a classificação destes fungos sofreu

grandes mudanças, nos últimos anos, com a descrição de novas famílias, gêneros e espécies e a recombinação de táxons, demonstrando elevada complexidade de identificação.

#### 4.3. Mecanismos de promoção de crescimento dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato tricálcico, fosfato de rocha de Araxá, óxido de zinco e degradar celulose (Tabela 5). Grande parte dos isolados apresentou atividade positiva para todos os mecanismos de promoção de crescimento testados.

**Tabela 5.** Capacidade de solubilização de fosfato tricálcico, fosfato de rocha de Araxá, óxido de zinco e degradar celulose dos isolados fúngicos oriundos de plantas de milho (*Zea mays* L.).

Isolados	Índice de Solubilização (cm) e DO <sup>1</sup>			Degradação Celulose
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fosfato de Araxá	ZnO	
F1 <i>P. kloeckeri</i>	4,3± 1,04	3,5± 2,29	2,3±1,04	7,0± 00
F2 <i>C. geniculata</i>	3,8±0,86	4,0± 0,28	3,8± 2,25	2,6± 0,28
F3 <i>C. lunata</i>	2,0±1,15	3,0± 0,28	3,2± 1,17	1,0± 00
F4 <i>C. lunata</i>	2,0± 0,57	-	2,4± 1,15	-
F5 <i>C. lunata</i>	4,0± 0,47	4,5± 0,57	4,3± 00	1,5± 0,86
F6 <i>F. incarnatum</i>	-	2,0± 00	1,0± 00	4,0± 1,60
F7 <i>C. lunata</i>	4,0± 0,57	3,5± 00	4,5± 0,28	2,3± 1,25
F8 <i>C. geniculata</i>	3,0± 1,60	3,6± 0,28	4,6± 0,76	1,0± 00
F9 <i>C. lunata</i>	2,8± 1,25	1,8± 0,62	3,3± 0,57	-
F10 <i>C. geniculata</i>	2,3± 1,25	4,6± 0,76	3,7±0,28	1,0± 00
F11 <i>T. harzianum</i>	-	-	-	1,5± 0,47
F12 <i>A. caesiellus</i>	-	-	-	-

<sup>1</sup>DO: desvio padrão.

Curiosamente, não foi possível detectar halo de solubilização do fungo F12 (*A. caesiellus*) em nenhum dos meios analisados, já que esse gênero tem sido associado à produção de ácidos orgânicos, mostrando habilidade em solubilizar diferentes fontes fosfatadas (Coutinho et al., 2014; Nahas & Assis, 1992; Souchie et al., 2005b). Tal resultado pode ser explicado devido ao seu

crescimento extremamente lento. Souchie. et al. (2007) testaram seis meios de cultura sólidos para isolar microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) a partir do rizoplane e rizosfera de guandu e determinaram alguns critérios de seleção, como número de MSF presentes, tempo de aparecimento de colônias e facilidade de distinção do halo transparente. Os mesmos autores perceberam que alguns meios de cultura favorecem o crescimento e número de MSF.

O fungo F4 (*C. lunata*) não apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato de rocha de Araxá e degradação de celulose. Luz et al. (2006) isolaram um fungo do gênero *Curvularia* sp. de folhas de maracujazeiro-amarelo e observaram que o fungo não apresentou potencial para degradar celulose *in vitro*.

O fungo F11 (*T. harzianum*), não apresentou halo indicador de solubilização nos meios suplementados com as fontes fosfatadas e óxido de zinco. No entanto, esse fungo demonstrou potencial celulolítico, apresentando 1,5 cm de índice de solubilização (IS) (Tabela 5). De acordo com Florencio (2011), os fungos do gênero *Trichoderma* sp se destacam pela alta produção enzimática exibida. Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram o potencial de oitenta fungos filamentosos, isolados do solo da Mata Atlântica, em produzir celulases e observaram que dos 18 fungos do gênero *Trichoderma* sp., quatro apresentaram atividade positiva para degradação de celulose, com índice de solubilização variando entre 1,1 a 6,0 mm.

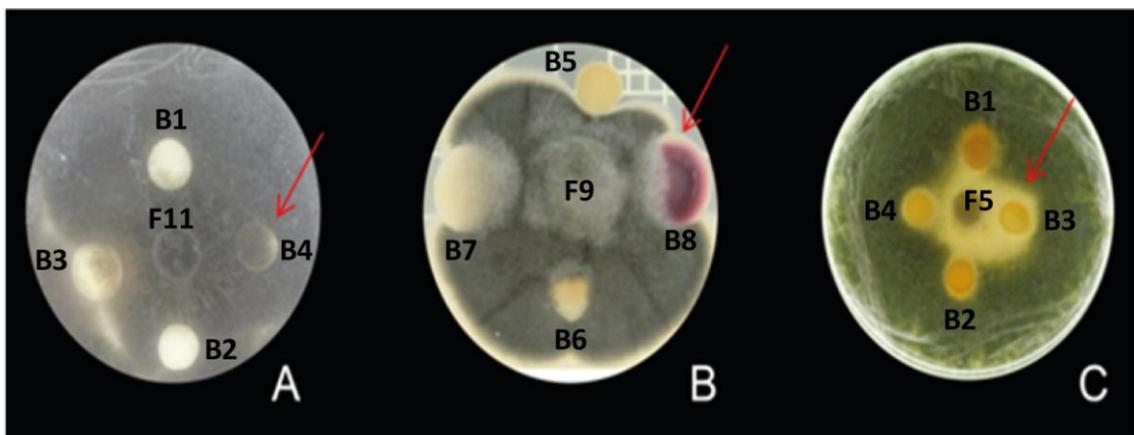
De acordo com Cunha et al. (2016), espécies do gênero *Penicillium* são importantes decompositores celulolíticos. Tal afirmação está de acordo com os dados obtidos neste trabalho, já que o fungo F1 (*P. kloeckeri*) foi o microrganismo mais promissor para degradação de celulose, apresentando IS de 7 cm (Tabela 5).

O isolado pertencente ao gênero *Fusarium* (*F. incarnatum*) (F6), não apresentou habilidade em solubilizar fosfato tricálcico. Porém, esse microrganismo apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato de rocha de Araxá (IS=2), óxido de zinco (IS=1) e degradação de celulose (IS=4) (Tabela 6). De acordo com Coughlan (1985), este gênero de fungo é conhecido por produzir celulase, podendo apresentar habilidade celulolítica. Por outra parte, Gomezjurado (2012) observou que dez isolados do gênero *Fusarium* sp apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido.

Dos oito isolados de *Curvularia* sp (F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9 e F10), a maioria foi capaz de produzir halo de solubilização nos diferentes meios testados, com exceção do fungo F4, que não apresentou habilidade em solubilizar fosfato de rocha de Araxá e degradar celulose e fungo F9, que não apresentou habilidade para degradação de celulose (Tabela 5). Estes fungos endofíticos, uma vez que foram isolados de plantas saudáveis, poderiam estar participando dos processos que contribuem ao desenvolvimento das plantas e, portanto, podem ser incluídos em sistemas de produção agrícolas sustentáveis.

#### 4.4. Seleção dos isolados fúngicos e bactérias compatíveis

A compatibilidade entre os microrganismos foi classificada de acordo com o crescimento do fungo sobre a bactéria em: alta ( $C_1$ ), média ( $C_{1/2}$ ) e baixa ( $C_2$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Ensaio de compatibilidade entre isolados de fungos e bactérias. (A) Alta compatibilidade,  $C_1$ ; (B) Média compatibilidade,  $C_{1/2}$  e (C) Baixa compatibilidade,  $C_2$ . Em que F5 (*Curvularia lunata*), F9 (*Curvularia lunata*), F11 (*Trichoderma harzianum*); e B1 (HRC54-*Herbaspirillum seropedicae*), B2 (RAM10-*Herbaspirillum seropedicae*), B3 (101- *Burkholderia silvatlantica*), B4 (HCC103-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), B5 (PAL5- *Gluconacetobacter diazotrophicus*), B6 (98- *Azospirillum* sp.), B7 (21GI- *Stenotrophomonas* sp.), B8 (22GI- *Serratia marcescens*).

Neste ensaio foi possível confirmar a predominância de interações entre os isolados fúngicos obtidos neste trabalho e as bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas em estudos anteriores (Aguiar, 2012; Baldani et al., 1986; Baldani et al., 1996; Cavalcante & Döbereiner, 1988; Perin et al., 2006; Tarrand et al., 1978) (Tabela 6).



O fungo F12 (*A. caesiellus*) foi o único microrganismo que, por apresentar um crescimento muito lento, não foi possível detectar halo de compatibilidade ou incompatibilidade neste estudo (Tabela 6).

Os isolados fúngicos que produziram os resultados mais frequentes de alta compatibilidade com as bactérias avaliadas foram os do fungo F2 (*C. geniculata*) que apresentou alta compatibilidade com todas as bactérias, seguido dos fungos F4 (*C. lunata*) e F6 (*F. incarnatum*) que mostraram alta compatibilidade com todas as bactérias exceto com as bactérias 5 (B5) (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e 8 (B8) (*Serratia marcescens*), para ambos os isolados fúngicos.

O fungo F11 (*T. harzianum*) exibiu média compatibilidade com todos os isolados bacterianos, exceto com a PAL 5 (B5), com o qual foi incompatível.

A compatibilidade entre fungos e bactérias pode desempenhar um importante papel na sobrevivência e desenvolvimento dos microrganismos. Deveau et al. (2010) demonstraram que a bactéria *P. fluorescens* BBc6R8 promove a viabilidade do fungo micorrízico *Laccaria bicolor* por produzir tiamina, uma vitamina hidrossolúvel que pertence ao complexo B. Por outra parte, esse fungo pode promover a sobrevivência da bactéria devido à produção da trealose, um dissacarídeo que se acumula em sua hifa. Essas interações, além de beneficiar os microrganismos envolvidos, podem estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos que incluem a aquisição de nutrientes (Tilak et al., 1989; Artursson et al., 2005).

Entre todos os isolados fúngicos, o fungo F1 (*P. kloeckeri*) mostrou a menor compatibilidade. Este fungo apresentou baixa compatibilidade com cinco das oito bactérias usadas neste ensaio (Tabela 6). Uma observação interessante nesta análise foi a baixa compatibilidade mostrada pela maioria dos fungos com a *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5. A atividade antifúngica de isolados pertencentes a esta espécie tem sido relatada por alguns autores. Piñon et al. (2002) descreveram o antagonismo desta bactéria com a bactéria *Xanthomonas albilineans* em meio de cultura BDA, e sugeriram que a inibição do crescimento do fungo foi causada pela produção de bacteriocinas, que são proteínas como complexos proteicos, geralmente um peptídeo, que podem causar danos a outros microrganismos. Mehnaz & Lazarovits (2006) demonstraram, *in vitro*, que a atividade antifúngica de duas cepas de *G. diazotrophicus* (Wt e nifD)

contra várias espécies de *Fusarium* spp está relacionada à liberação de compostos tóxicos pelas bactérias. É possível que no meio de cultura BDA, a PAL 5 esteja produzindo compostos que impeçam a proximidade das hifas de fungos.

Na literatura, existem alguns trabalhos citando a produção de substâncias antagônicas por *G. diazotrophicus* contra outros organismos (Chawla et al., 2014). Bansal et al. (2005) relacionaram a atividade antagônica de sete cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra o nematoide *Meloidogyne incognita* com a excreção de amônia e ácidos graxos voláteis pelas bactérias. Logeshwaran et al. (2011) identificaram o composto Pyoluteorina, um antibiótico produzido pela PAL-5, como responsável pela inibição do crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Tiarosporella phaseolina* e *Ceratocystis fimbriata*.

Além da *G. diazotrophicus*, espécies de *Burkholderia* e *Herbaspirillum* são reportadas na literatura com atividade antifúngica. Hu & Young (1998) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de diversas bactérias, e observaram que a maioria das espécies de *Burkholderia* sp. e *Herbaspirillum* sp. testadas inibiu o crescimento do fungo *Rhodotorula mucilaginosa*. De acordo com os autores, essa atividade é causada pela liberação de biocidas de baixo peso molecular, que poderiam ser o cepalycin (metabólito hemolítico, resistente ao calor) e cepacidine (antibiótico com grande potencial antifúngico). Mendes (2008) relacionou o antagonismo de 18 linhagens de *Burkholderia* sp. com *Fusarium moliforme* com a produção de pirrolnitrina (3-cloro-4-(3-cloro-2-nitrofenilpirrol) pela bactéria, um metabólito secundário derivado do triptofano que apresenta atividade antifúngica de amplo espectro (Kirner et al., 1998).

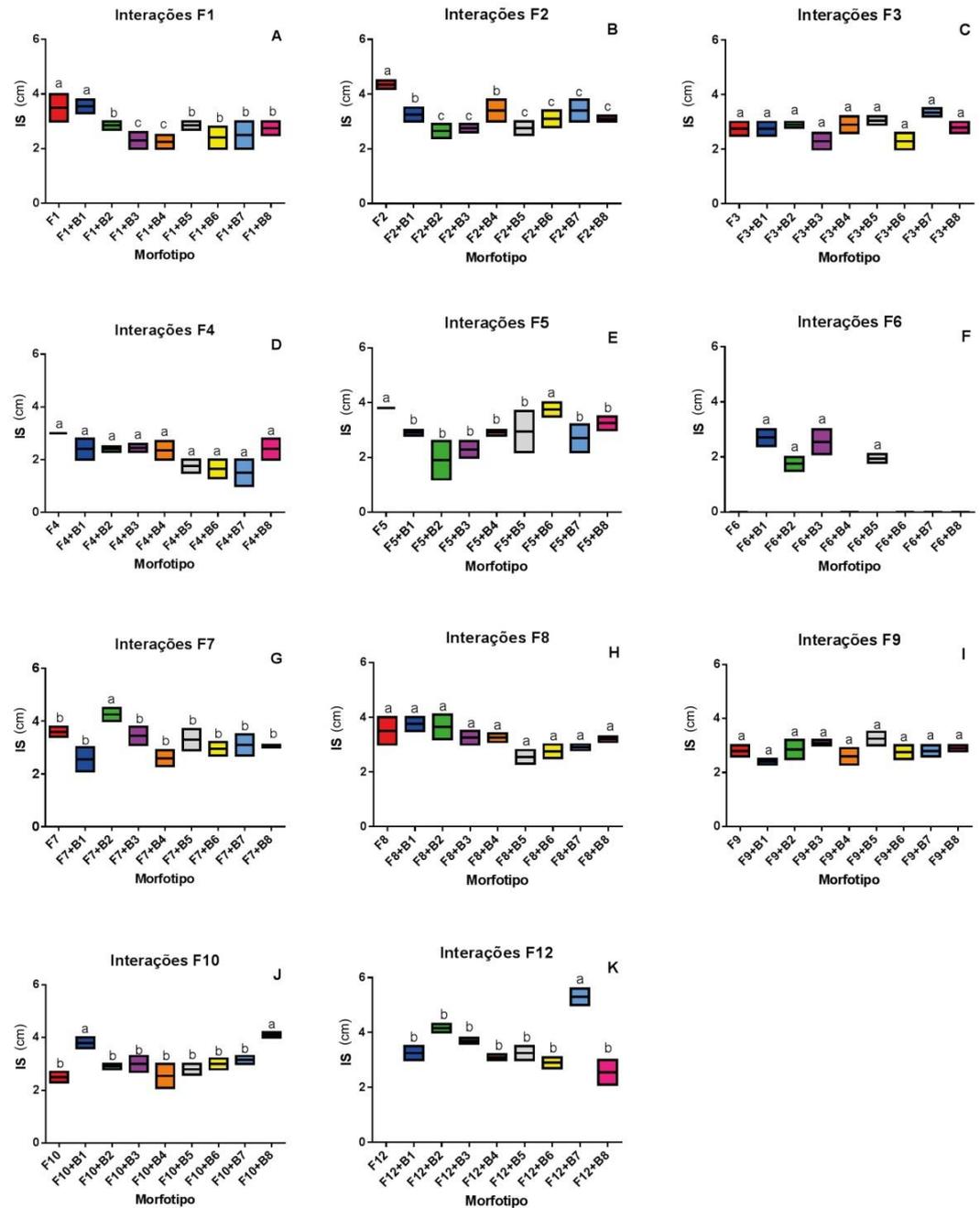
No entanto, neste trabalho, foi encontrada uma alta compatibilidade entre a bactéria 101 (*Burkholderia* sp) e o fungo F6 (*Fusarium* sp), assim como também compatibilidade alta e média entre espécies de *Herbaspirillum* testadas (HRC54 (B1), RAM10 (B2) e HCC103 (B4)) com a maioria dos fungos.

Jesus (2013), em testes de compatibilidade com nove actinomicetos oriundos de vermicompostos maturados e seis bactérias diazotróficas usando meio NB (caldo nutriente), observou que a bactéria PAL5 produziu halo de inibição em quatro dos nove actinomicetos testados, resultados que se correspondem com os obtidos neste trabalho. Entretanto, a bactéria *Burkholderia silvatlantica* (UENF 101), compatível com todos os fungos, apresentou incompatibilidade com todos os actinomicetos. É possível que além de se tratar

de interações entre microrganismos diferentes, este comportamento seja devido ao meio utilizado.

#### **4.5. Análise *in vitro* da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos e sua interação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em meio sólido**

Os resultados da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos isolados e sua interação com bactérias em meio sólido Pikovskaya suplementado com fosfato tricálcico mostraram que o isolado fúngico F2 apresentou maior habilidade de solubilizar quando inoculado sozinho em comparação à co-inoculação desse fungo com as bactérias (Figura 11). Já os fungos F3, F4 e F8 e F9 sozinhos e co-inoculados com as bactérias benéficas não apresentaram diferenças significativas sobre a capacidade de solubilização de P ( $p < 0,05$ ). A co-inoculação dos fungos F7 e F10 com determinadas bactérias benéficas (F7XB2, F10XB1 e F10XB8) exibiu um incremento nos índices de solubilização (IS) em relação à inoculação dos fungos sozinhos (Figura 11).



**Figura 11.** Avaliação do índice de solubilização (IS) em meio sólido Pikovskaya ágar suplementado com fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) por isolados fúngicos combinados ou não com bactérias promotoras do crescimento de plantas. Em que F1 (*Penicillium kloeckeri*), F2 (*Curvularia geniculata*), F3 (*Curvularia lunata*), F4 (*Curvularia lunata*), F5 (*Curvularia lunata*), F6 (*Fusarium incarnatum*), F7 (*Curvularia lunata*), F8 (*Curvularia geniculata*), F9 (*Curvularia lunata*), F10 (*Curvularia geniculata*), F11 (*Trichoderma harzianum*), F12 (*Aspergillus caesiellus*); e B1 (HRC54-*Herbaspirillum seropedicae*), B2 (RAM10-*Herbaspirillum seropedicae*), B3 (101- *Burkholderia silvatlantica*), B4 (HCC103-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), B5 (PAL5- *Gluconacetobacter diazotrophicus*), B6 (98- *Azospirillum* sp.), B7 (21GI- *Stenotrophomonas* sp.), B8 (22GI- *Serratia marcescens*). Resultados expressos em índice de Solubilização (IS) (cm) com três repetições. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com base nos dados observados neste ensaio, apenas três interações fungo-bactéria apresentaram IS superiores à inoculação do fungo sozinho. Estes resultados podem ser explicados devido à habilidade das bactérias em secretar diferentes substâncias capazes de inibir a atividade solubilizadora dos fungos, como por exemplo, metabólitos voláteis, sideróforos, antibióticos, bacteriocinas, em um mecanismo denominado antibiose (Souza et al., 2015).

Gomes et al. (2001) observaram que os metabólitos voláteis produzidos por duas das cepas de *Bacillus subtilis* inibiram significativamente o crescimento micelial e a germinação dos conídios do fungo *Cylindrocladium spathulatum*. Resultados similares foram obtidos por Furlani et al. (2007), que verificaram que todos os isolados de *Bacillus* spp. foram capazes de inibir o crescimento micelial do *Colletotrichum acutatum* por meio da produção de metabólitos termolábeis. Toledo et al. (2002) observaram que metabólitos secundários não identificados produzidos pela bactéria *Burkholderia cepacia* inibiram o crescimento de cepas de *Fusarium* sp.

Outra possível explicação para tal resultado pode ser atribuída ao fato das bactérias estarem competindo por nutrientes presentes no meio de cultura, impedindo o crescimento do fungo. Sala et al. (2007) avaliaram a eficiência da co-inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na colonização dos fungos em plantas de trigo e observaram que a colonização micorrízica foi maior quando os fungos foram inoculados isoladamente. Os autores sugeriram que pode ter acontecido competição entre os microrganismos por compostos fotossintetizados.

Lima et al. (2011) avaliaram o potencial da inoculação e co-inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e bactérias diazotróficas no crescimento de mudas de mamoeiro na ausência e presença de P e verificaram que não houve efeito significativo da inoculação isolada das bactérias diazotróficas ou em conjunto com os FMAs. Segundo os autores, a inoculação conjunta dos microrganismos pode ter gerado competição entre eles, prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Dois dos isolados fúngicos (F6 e F12) não solubilizaram P (Figura 11). Porém, quando co-inoculados com as bactérias, apresentaram capacidade de solubilização. No caso do fungo F6, na presença das bactérias B1, B2, B3 e B5 (Figura 11), e para o fungo F12, ao qual não foi possível avaliar sua

compatibilidade *in vitro* (Tabela 6), foi detectada atividade solubilizadora de P quando co-inoculado com cada um dos isolados bacterianos (Figura 11).

Os resultados sugerem que há uma interação benéfica entre esses microrganismos que favorece a disponibilidade de P, já que as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (RAM 10), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103) e *Azospirillum* sp (98) não apresentam capacidade para solubilizar fósforo inorgânico (Videira, 2012; Rodrigues, 2016).

Possivelmente as bactérias associadas aos fungos podem estar atuando como auxiliares, exercendo efeitos benéficos sobre os mesmos.

Neste tipo de interação, Artursson, (2006) afirma que as hifas fúngicas liberam carbono (C), que podem ser absorvidas pelas bactérias e, em contrapartida, as bactérias podem melhorar o crescimento dos fungos por meio da disponibilidade de nutrientes.

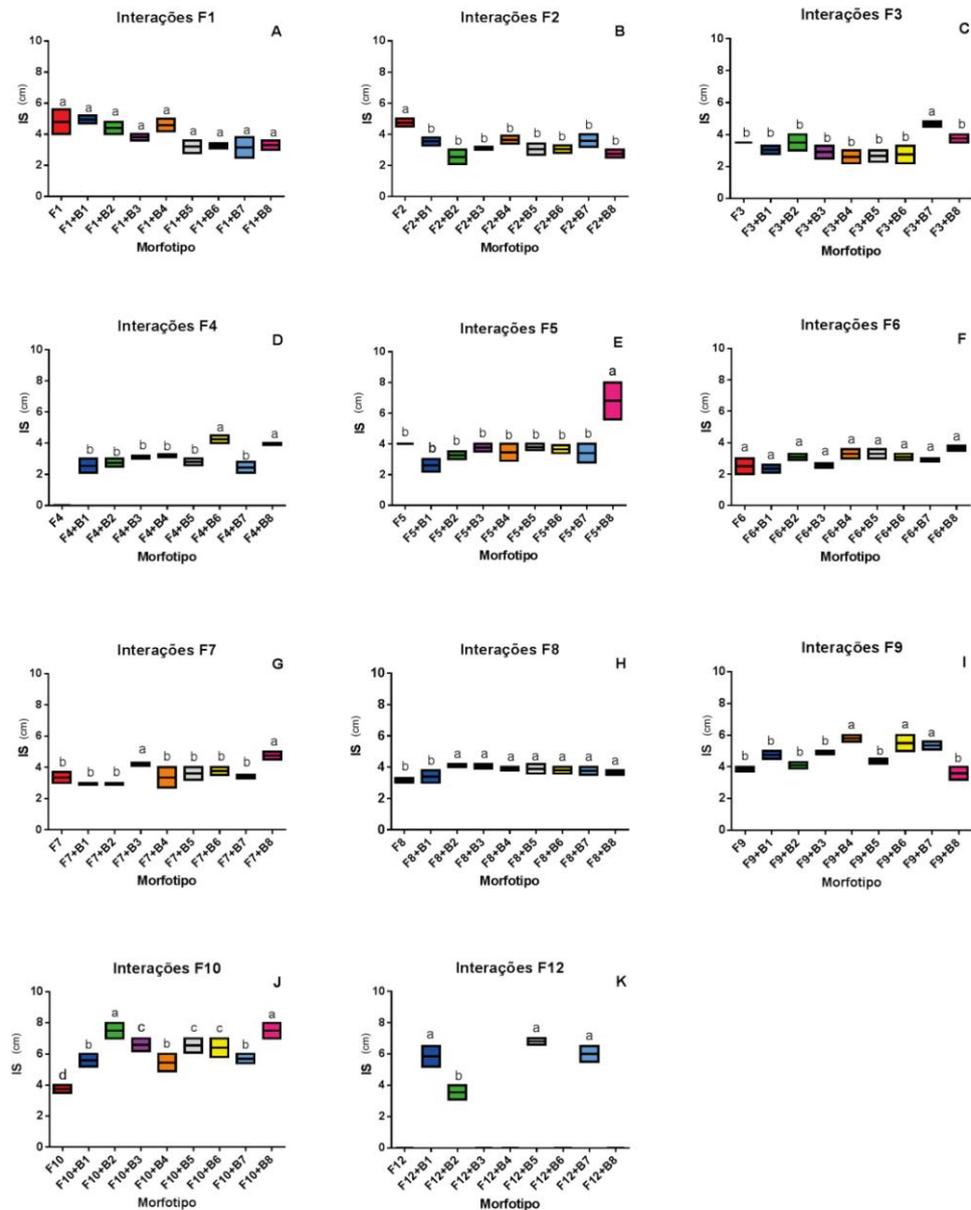
Sala et al. (2007) avaliaram o efeito da inoculação de dois novos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (*Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*) e da interação destas bactérias com dois fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (*Glomus* sp. e *Acaulospora* sp.) na cultura de trigo e observaram que houve efeito sinérgico da co-inoculação na colonização das raízes por ambas as bactérias diazotróficas, com a aplicação do FMA do gênero *Acaulospora*, sugerindo que as bactérias diazotróficas podem contribuir para a nutrição dos FMAs, ao tornar disponível o nitrogênio atmosférico.

Isopi et al. (1995) testaram o efeito da co-inoculação entre fungos micorrízicos arbusculares e *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas de sorgo e verificaram que essa interação aumentou significativamente o teor de N nas plantas, interferindo no tamanho das raízes, tornando-as mais compridas e ramificadas.

A compatibilidade entre fungos e bactérias não necessariamente se relaciona com a capacidade de desenvolver uma atividade positiva no mecanismo de promoção de crescimento de plantas como é o caso da solubilização de P.

Os resultados da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos isolados e sua interação com bactérias em meio sólido Pikovskaya suplementado com fosfato de rocha de Araxá mostraram que o isolado fúngico F2 apresentou maior habilidade em solubilizar o fosfato de rocha de Araxá quando inoculado sozinho em comparação com as co-inoculações nas bactérias testadas (Figura

12). Já os fungos F1 e F6 sozinhos e co-inoculados com as bactérias benéficas não apresentaram diferenças significativas sobre a capacidade de solubilização de P de acordo com o Teste Tukey em 5% de probabilidade. A co-inoculação dos fungos F3, F5, F7, F8, F9 e F10 com determinadas bactérias benéficas (F3XB7, F5XB8, F7XB3, F7XB8, F8XB2, F8XB3, F8XB4, F8XB5, F8XB6, F8XB7, F8XB8, F9XB4, F9XB6, F9XB7, F10XB1 F10XB2, F10XB3, F10XB4, F10XB5, F10XB6, F10XB7 e F10XB8) exibiu um incremento nos IS em relação à inoculação desses fungos sozinhos (Figura 12).



**Figura 12.** Avaliação do índice de solubilização (IS) em meio sólido Pikovskaya ágar suplementado com fosfato de rocha de Araxá por isolados fúngicos combinados ou não com bactérias promotoras do crescimento de plantas. Em que F1 (*Penicillium kloeckeri*), F2 (*Curvularia geniculata*), F3 (*Curvularia lunata*), F4 (*Curvularia lunata*), F5 (*Curvularia lunata*), F6 (*Fusarium incarnatum*), F7 (*Curvularia lunata*), F8 (*Curvularia geniculata*), F9 (*Curvularia lunata*), F10 (*Curvularia geniculata*), F11 (*Trichoderma harzianum*), F12 (*Aspergillus caesiellus*); e B1 (HRC54-*Herbaspirillum seropedicae*), B2 (RAM10-*Herbaspirillum seropedicae*), B3 (101- *Burkholderia silvatlantica*), B4 (HCC103-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), B5 (PAL5- *Gluconacetobacter diazotrophicus*), B6 (98- *Azospirillum* sp.), B7 (21GI- *Stenotrophomonas* sp.), B8 (22GI- *Serratia marcescens*). Resultados expressos em índice de Solubilização (IS) (cm) com três repetições. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os fungos F4 e F12 não mostraram habilidade para solubilização de P no meio fosfato de rocha de Araxá. Porém, quando co-inoculados com as bactérias apresentaram efeito solubilizador positivo (Figura 12). No caso do fungo F4, na presença de todas as bactérias (Figura 12D), e para o fungo F12 foi detectada a capacidade quando co-inoculado com as bactérias B1, B2, B5 e B7 (Figura 12K), comportamento que difere dos resultados no meio de fosfato tricálcico (Figura 11).

Neste caso, além das fontes fosfatadas, as interações entre fungos e bactérias podem estar influenciando na solubilização de P. Os resultados aqui apresentados mostram que os efeitos positivos dessas interações podem ter beneficiado de forma significativa a solubilização *in vitro*.

Braz, 2011 avaliou a co-inoculação do fungo *Aspergillus niger* com a bactéria *Burkholderia cepacia* sobre o mecanismo de solubilização de fósforo e observaram quantidades maiores de fosfato nos tratamentos que apresentavam o co-inóculo. A autora sugeriu que poderia existir um notável sinergismo da co-cultura em comparação com as culturas individuais.

Alguns autores têm relatado que o potencial para a solubilização de P de microrganismos solubilizadores depende de fatores ambientais como tipo de fosfato, fonte de C e N (Silva Filho & Vidor, 2001), assim como dos gêneros e/ou espécies de isolados microbianos (Silva Filho & Vidor, 2000; Silva Filho et al., 2002; Mendes et al., 2014). No presente trabalho foi usado como fonte de N o amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a glicose como fonte de C.

De acordo com Silva Filho & Vidor (2001), esses fatores podem ter participação decisiva no processo de solubilização. O efeito da fonte de N tem sido relacionado ao balanço de íons absorvidos (Fernandes & Souza, 1990). De maneira geral, a solubilização aumenta com a absorção de fontes amoniacais e diminui com as nítricas (Silva Filho & Vidor et al., 2001), já que com a absorção de amônio a célula tem que promover a extrusão de prótons H<sup>+</sup> para manter a sua eletroneutralidade e o transporte ativo secundário em funcionamento (Fernandes & Souza, 1990), acidificando o meio e conseqüentemente solubilizando o fósforo.

Segundo Ahuja et al. (2007), a produção de ácidos orgânicos é diretamente proporcional ao crescimento dos fungos solubilizadores de P que, por sua vez, está associado à disponibilidade de C no meio (Papagianni et al., 2005). No entanto, Illmer et al. (1995) verificaram que deficiências nutricionais

acarretando limitação no crescimento do microrganismo podem beneficiar a liberação de ácidos no meio.

No meio contendo fosfato de rocha de Araxá (Figura 12), as melhores interações observadas foram: F3xB7, F5xB8, F7xB8, F8xB2, F8xB3, F8XB4, F8xB5, F8XB6, F8XB7, F8XB8, F9xB4, F9xB6, F9XB7, F10xB2, F10XB3 e F10xB8. Já as interações de menor capacidade solubilizadora foram: F2xB2, F2xB8, F3xB4, F3xB5, F5xB1. Tanto para fosfato de tricálcico (Figura 11) quanto para fosfato de rocha de Araxá (Figura 12) as combinações fungo-bactéria mais promissoras para solubilização de P em meio sólido foram: F10xB8 e F12xB7.

Muitos trabalhos têm avaliado o efeito dos microrganismos solubilizadores de P *in vitro* em culturas puras (Mittal et al., 2008; Silva Filho & Vidor 2000; Souchie et al., 2005). No entanto, poucos têm se dedicado nas observações das formas co-inoculadas (Braz & Nahas 2012). Considerando que em um ambiente natural esses microrganismos encontram-se em constante interação, torna-se importante estudar essas associações para entender seus mecanismos (Braz, 2011).

Pasqualini et al. (2013) observaram efeitos benéficos em duas espécies florestais *A. sellowiana* e *C. myrianthum* quando inoculadas com microrganismos mistos. Jayasinghearachchi & Seneviratne (2005) avaliaram a formação de biofilmes entre bactérias do gênero *Bradhirizobium* nos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e verificaram que essas interações são altamente sinérgicas e apresentam potencial para solubilização de P.

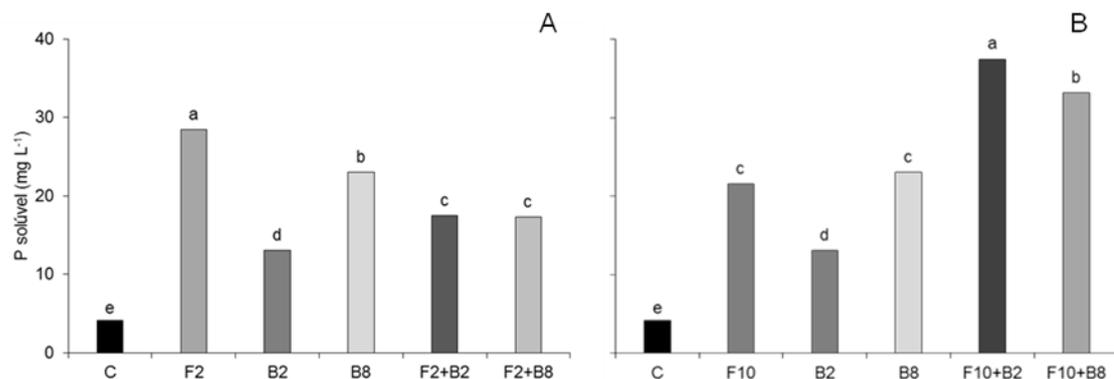
#### **4.6. Análise *in vitro* da capacidade de solubilização de fosfato dos fungos e sua interação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em meio líquido**

Segundo Souchie et al., (2007), a indicação de solubilização biológica de fosfato, avaliada visualmente pela formação de halo transparente em meio de cultura sólido, não necessariamente implica na capacidade de solubilizar P de fosfato em meio líquido. A partir dos resultados obtidos na avaliação das interações fungo-bactéria em meio sólido de solubilização (Figuras 11 e 12), foram selecionados dois tratamentos que apresentaram interações positivas (F10xB2 e F10xB8) e dois que exibiram interações desarmônicas (F2xB2, F2XB8)

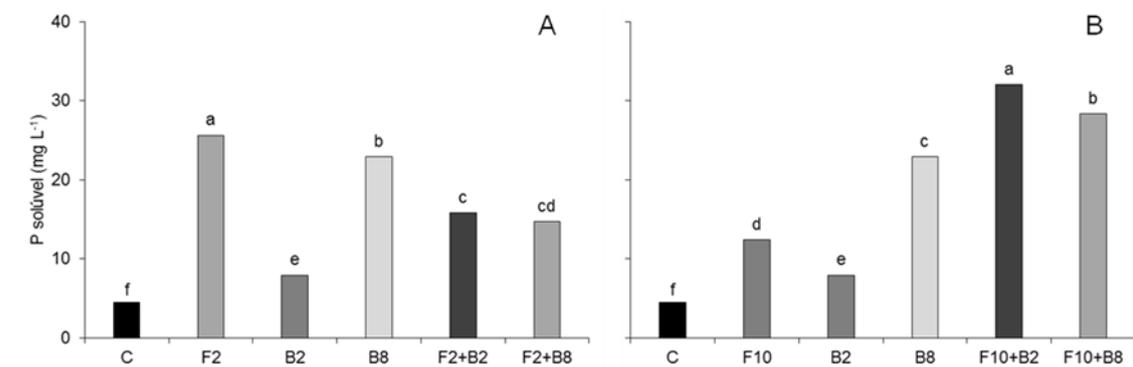
para avaliação em meio líquido suplementado com fosfato tricálcico (Figura 13) e fosfato de rocha de Araxá (Figura 14).

Os resultados obtidos para o fungo F2 em meio líquido (Figuras 13A e 14A) se relacionam com aqueles obtidos em meio de cultura sólido para ambas as fontes de P (Figura 11B e 12B). A co-inoculação do fungo F2, tanto com a bactéria B2 como com B8, tanto em fosfato tricálcico (Figura 13 A) quanto em fosfato de rocha de Araxá (Figura 14 A), diminui significativamente a quantidade de P solúvel no meio em relação ao F2 inoculado sozinho. Portanto, essas interações não apresentaram um efeito sinérgico no que se refere à solubilização de P.

Também foi observada uma relação nos resultados obtidos para o fungo F10 em meio líquido (Figura 13B e 14B) com os obtidos em meio de cultura sólido para ambas as fontes de P. A co-inoculação do fungo 10, tanto com a bactéria B2 quanto com B8, tanto em fosfato tricálcico (Figura 13B), quanto em fosfato de rocha de Araxá (Figura 14B), aumentou significativamente a quantidade de P solúvel no meio em relação ao F10 inoculado sozinho. Assim, neste caso, observou-se efeito sinérgico nessas interações em relação à quantidade de P solubilizado.



**Figura 13.** Teor de P solúvel ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em meio líquido suplementado com fosfato tricálcico, 7 dias após a incubação do isolado fúngico (F2), das bactérias (B2) e (B8) e suas interações (F2XB2) e (F2XB8) (A) e do isolado fúngico (F10), das bactérias (B2) e (B8) e suas interações (F10XB2) e (F10XB8) (B). Em que C (controle), F2 (*Curvularia geniculata*), F10 (*Curvularia geniculata*), B2 (*RAM10-Herbaspirillum seropedicae*) e B8 (22GI- *Serratia marcescens*). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 14.** Teor de P solúvel ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em meio líquido suplementado com fosfato de rocha de Araxá, 7 dias após a incubação do isolado fúngico (F2), das bactérias B2 e B8 e suas interações F2XB2 e F2XB8 (A) e do isolado fúngico (F10), das bactérias B2 e B8 e suas interações F10XB2 e F10XB8 (B). Em que C (controle), F2 (*Curvularia geniculata*), F10 (*Curvularia geniculata*), B2 (RAM10-*Herbaspirillum seropedicae*) e B8 (22GI-*Serratia marcescens*). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O comportamento diferenciado dos fungos F2 e F10, que de acordo com os resultados de caracterização molecular, pertencem à mesma espécie, (*Curvularia geniculata*), resulta do fato de que esses microrganismos pertencem a estirpes diferentes.

De acordo com Artursson et al. (2006), as interações entre fungos e bactérias parecem estar diretamente relacionadas aos microrganismos envolvidos, sugerindo um elevado grau de especificidade. Uma possível explicação para esse evento é que algumas estirpes de fungos podem contribuir para o crescimento e a sobrevivência das bactérias, proporcionando melhores interações na natureza (Deveau et al., 2010).

Efeitos sinérgicos provenientes das associações entre fungos e bactérias têm sido reportados por alguns grupos de pesquisa (Braz & Nahas, 2012; Isopi et al., 1995; Minaxi et al., 2013). Balota et al. (1997) verificaram o efeito da dupla inoculação dos FMA e das bactérias diazotróficas em plântulas micropropagadas de mandioca e observaram que a inoculação conjunta apresentou acúmulo significativo de P nas raízes, com incremento de até 158% em relação ao fungo sozinho. De acordo com Colozzi-Filho & Siqueira (1986), estes efeitos podem resultar da ação direta dos microrganismos sobre os mecanismos de absorção ou da interação ou diluição dos nutrientes, em decorrência do desenvolvimento

diferenciado das plantas. Minaxi et al. (2013) relataram efeito sinérgico resultante da co-inoculação de bactérias solubilizadoras de P e o FMA em plantas de trigo cultivadas em solo estéril suplementado com fosfato tricálcico. De acordo com os autores, este efeito pode ser atribuído à interação positiva entre os microrganismos. Saxena et al. (2014) avaliaram o efeito sinérgico entre o fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* e a bactéria *Burkholderia cepacia* em plantas de trigo cultivadas em solo estéril suplementado com fontes de P insolúvel e constataram que a dupla inoculação aumentou todos os parâmetros de crescimento estudados em comparação com as inoculações individuais. Segundo os mesmos autores a inoculação dos microrganismos aumentou a eficiência do transporte de P para as plantas.

Com base nos seus respectivos IS, os fungos testados (F2 e F10) apresentaram maior capacidade de solubilização *in vitro* do que as bactérias, com exceção da B8, que apresentou uma solubilização de fosfato significativamente superior ao fungo 10 em ambos os meios de cultura (Figuras 13B e 14B).

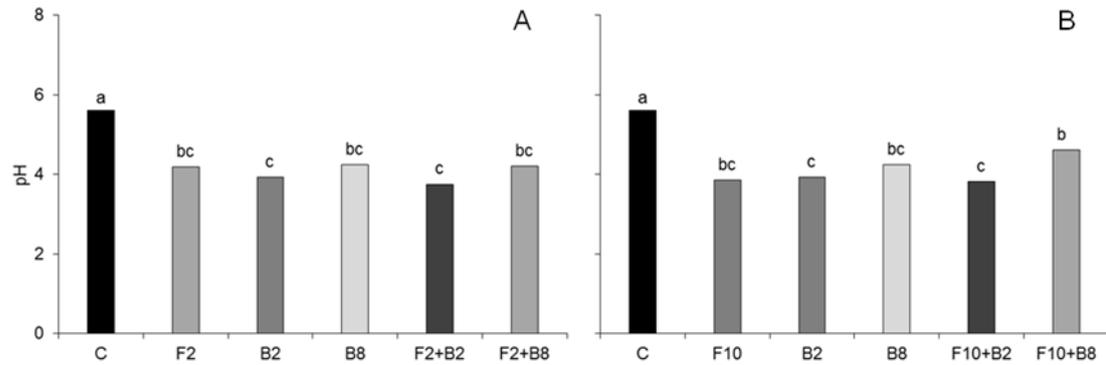
A maior solubilização de fosfato por isolados fúngicos quando comparados com isolados bacterianos tem sido reportada na literatura (Silva Filho & Vidor, 2000; Souchie et al., 2005b).

Já no caso da bactéria B8, trata-se de um isolado de vermicomposto maturado identificado como *Serratia marcescens*. Alguns trabalhos têm demonstrado efeitos promissores na solubilização de P por esta espécie de bactéria. Aguiar (2012) comprovou que esta bactéria exibe altas taxas de solubilização de P em meio sólido suplementado com fosfato tricálcico. Farhat et al. (2009) avaliaram 52 bactérias quanto à habilidade de solubilizar diferentes fontes fosfatadas e constataram que a bactéria *Serratia marcescens* apresentou alta taxa de solubilização nos meios testados.

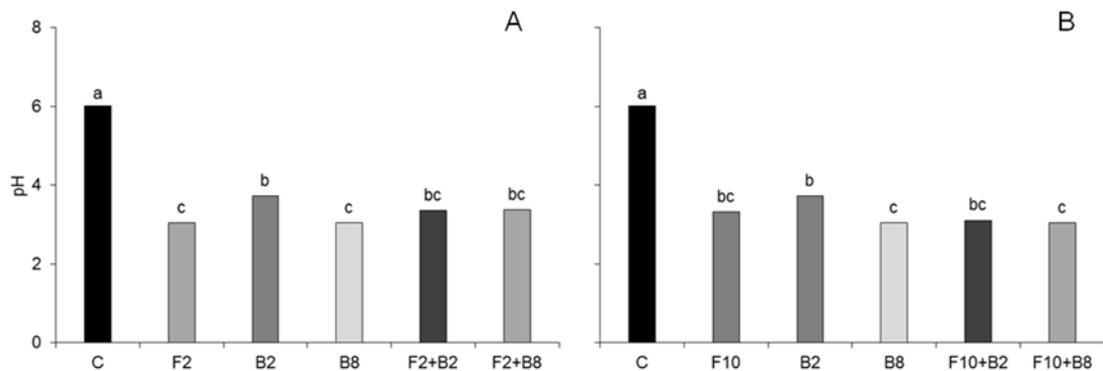
#### **4.7. Valores de pH em meio líquido suplementado com fosfato tricálcico e fosfato de rocha de Araxá**

O principal mecanismo de solubilização de P utilizado por microrganismos compreende a liberação de ácidos orgânicos, que resulta na acidificação do meio de cultura. Possivelmente, os fungos e as bactérias (sozinhos e/ou co-inoculados)

utilizados nesses ensaios secretaram um ou mais ácidos orgânicos (Figuras 15 e 16).



**Figura 15.** Valores de pH em meio líquido suplementado com fosfato tri-cálcico e inoculado com o isolado fúngico (F2), as bactérias B2 e B8 e suas interações F2XB2, F2XB8 (A) e com o isolado fúngico (F10), as bactérias B2 e B8 e suas interações F10XB2, F10XB8 (B). Em que F2 (*Curvularia geniculata*), F10 (*Curvularia geniculata*), B2 (RAM10- *Herbaspirillum seropedicae*) e B8 (22GI- *Serratia marcescens*). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 16.** Valores de pH em meio líquido suplementado com fosfato de rocha de Araxá e inoculado com o isolado fúngico (F2), as bactérias B2 e B8 e suas interações F2XB2, F2XB8 (A) e com o isolado fúngico (F10), as bactérias B2 e B8 e suas interações F10XB2, F10XB8 (B). Em que F2 (*Curvularia geniculata*), F10 (*Curvularia geniculata*), B2 (RAM10- *Herbaspirillum seropedicae*) e B8 (22GI- *Serratia marcescens*). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Richardson (2001), os ácidos orgânicos mais produzidos pelos microrganismos são os ácidos glucônico, cítrico e oxálico.

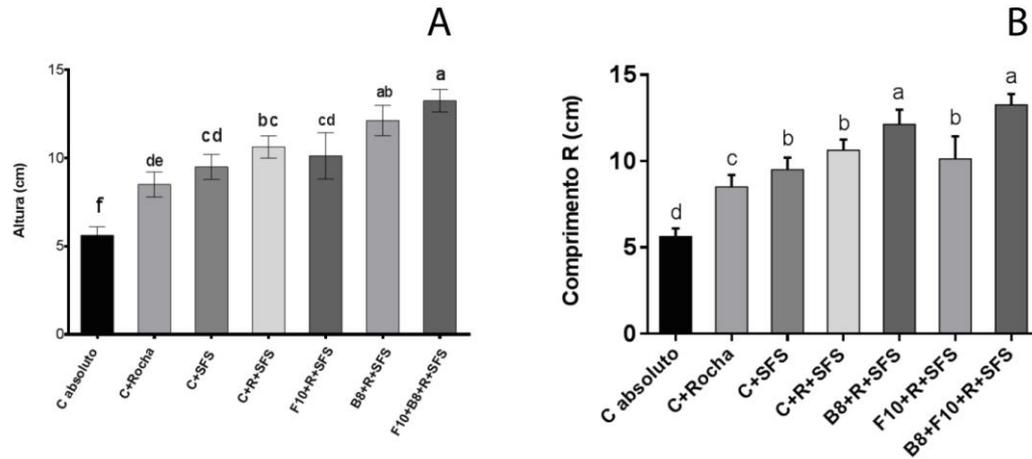
Alguns grupos de pesquisa têm observado que a co-inoculação entre fungos e bactérias em meio líquido de solubilização, além de aumentar as quantidades de P solúvel, diminui de forma significativa o pH do meio (Villegas & Fortin, 2001; Villegas & Fortin, 2002). Neste trabalho, foi observado que os valores de pH no meio suplementado com fosfato de rocha tricálcico foram maiores em relação aos valores de pH encontrados no meio fosfato de rocha de araxá.

Mendes et al. (2014) avaliando o efeito do pH na solubilização de fontes de P ( $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), mostraram que o fosfato tricálcico pode ser solubilizado completamente em valores de pH entre 7 até 4, já as fontes naturais apresentam valores de pH mais baixos. De acordo com os autores, o fosfato tricálcico está ligado a uma estrutura mais simples, já o P do fosfato rocha de Araxá está ligado a uma estrutura mais complexa, por isso, são necessárias maiores quantidades de ácidos orgânicos para sua solubilização.

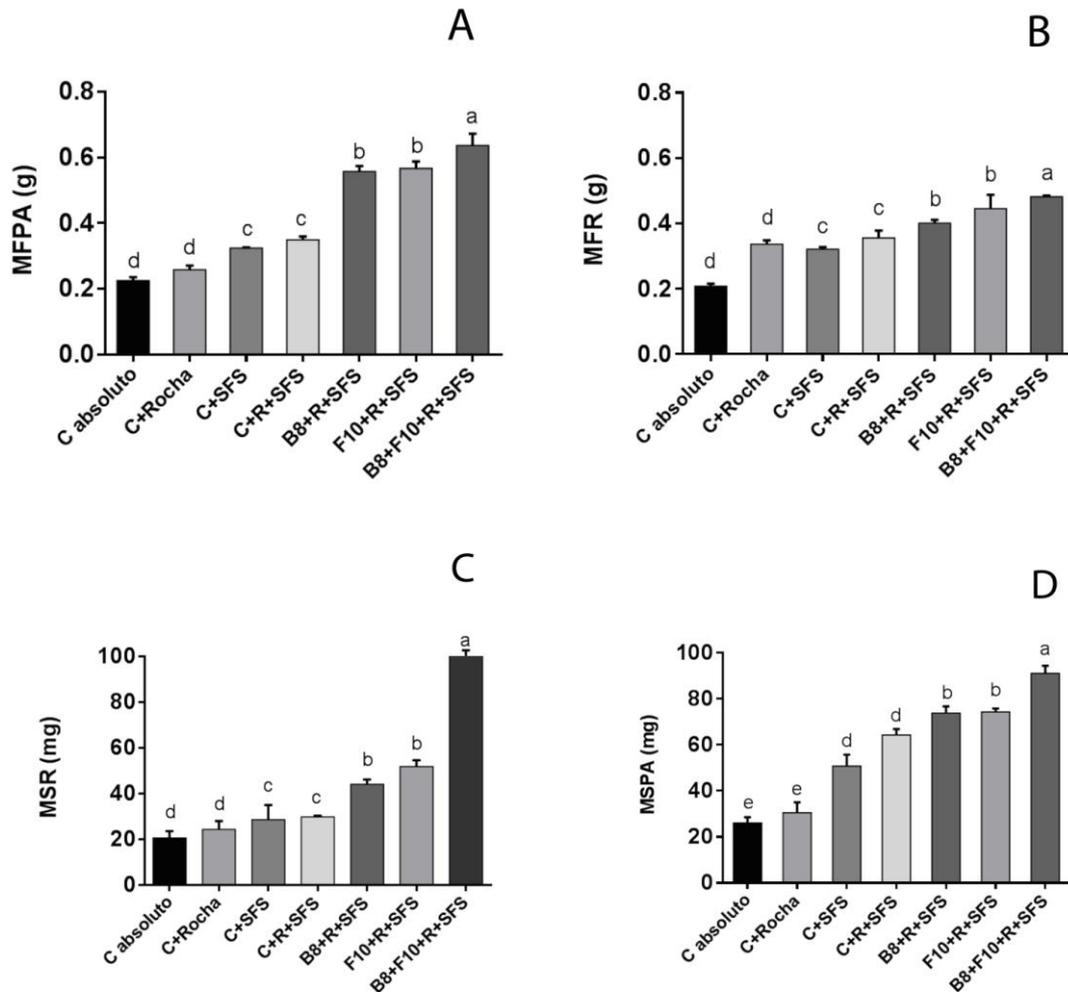
Oliveira et al. (2012), estudando a capacidade de solubilização de fosfato em meio líquido (NBRIP) suplementado com fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) por seis isolados de *Trichoderma* spp, observaram que todos os fungos testados foram capazes de solubilizar fosfato e apresentaram redução significativa de pH em valores que variavam entre 4,6; 4,7; 4,9 e 5,0.

#### **4.8. Efeito da co-inoculação do fungo (F10) e da bactéria (B8) no crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.)**

Os dados obtidos nas figuras 17 (A, B) e 18 (A, B, C e D) demonstram o efeito da inoculação de F10 (*Curvularia geniculata*) e de B8 (*Serratia marcescens*), sozinhos e em co-cultivo, sobre o crescimento de milho var. UENF/506-11, na presença de duas fontes de P. Estes isolados foram selecionados de acordo com os resultados mostrados em experimentos anteriores, no qual apresentaram efeito sinérgico tanto em meio sólido (Figuras 11 e 12) quanto em meio líquido de solubilização de P (Figuras 13A e B; 14A e B).



**Figura 17.** Efeito das duas fontes de P, da inoculação do fungo 10 (F10), da bactéria 8 (B8) e sua interação (F10+B8) sobre a altura da parte aérea (cm) (A) e o comprimento da raiz (cm) (B) de milho. Em que C absoluto (controle absoluto), C+Rocha (controle+fosfato de rocha de Araxá), C+ SFS (controle+superfosfato simples), C+R+SFS (controle+fosfato de rocha de Araxá+superfosfato simples), B8+R+SFS (*Serratia marcescens*+fosfato de rocha de Araxá+superfosfato simples) F10+R+SFS (*Curvularia geniculata*+fosfato de rocha de Araxá+superfosfato simples) e B8+F10+R+SFS (*Serratia marcescens*+*Curvularia geniculata* fosfato de rocha de Araxá+superfosfato simples). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão dos tratamentos.



**Figura 18.** Efeito das duas fontes de P, da inoculação do fungo 10 (F10), da bactéria 8 (B8) e sua interação (F10+B8) sobre a massa fresca da parte aérea (MFPA) (A) e massa fresca da raiz (MFR) (B), a massa seca da raiz (MSR) (mg) (C) e massa seca da parte aérea (MSPA) (mg) (D) de milho. Em que C absoluto (controle absoluto), C+Rocha (controle+fósforo de rocha de Araxá), C+SFS (controle+superfósforo simples), C+R+SFS (controle+fósforo de rocha de Araxá+superfósforo simples), B8+R+SFS (*Serratia marcescens*+fósforo de rocha de Araxá+superfósforo simples), F10+R+SFS (*Curvularia geniculata*+fósforo de rocha de Araxá+superfósforo simples) e B8+F10+R+SFS (*Serratia marcescens*+*Curvularia geniculata*+fósforo de rocha de Araxá+superfósforo simples). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dados indicam que a inoculação do fungo 10 (F10) associado à bactéria promotora de crescimento de planta (B8) na presença das duas fontes fosfatadas aumentou todos os parâmetros avaliados. Para a variável altura da parte aérea (cm) (Figura 17A), este tratamento resultou em incremento de 124%

em relação ao C absoluto e 18% em relação ao controle contendo as fontes de fósforo combinadas (R+SFS). A inoculação da bactéria B8 apresentou efeito estatisticamente semelhante à co-cultura no meio suplementado com SPS e R.

Quanto ao comprimento (cm) da raiz (Figura 17B), a inoculação das culturas mistas (F10+B8) associadas às fontes de fosfato proporcionou aumento de 133% em relação ao C absoluto e 27% em relação ao controle com as fontes fosfatadas (R+SFS). Assim como na variável altura, a inoculação da bactéria isolada (B8) apresentou atividade estatisticamente igual à co-cultura (F10+B8).

A co-inoculação dos microrganismos (F10+B8) em conjunto com as fontes de P aumentou a MFPA e MFR (Figuras 18 A e B). Para MFPA, foi obtida uma eficiência de 186% em relação ao C absoluto e de 85% em relação ao controle contendo as fontes fosfatadas. Já para MFR, foi observado aumento de 127% em relação ao C absoluto e de 56% em relação ao controle com as diferentes fontes.

Ao avaliar a eficiência das co-culturas (F10+B8) associadas às fontes fosfatadas em relação MSR e MSPA (Figuras 18C e D), observou-se um incremento de 291% em relação ao C absoluto e 45% em relação aos controles fosfatados e 210% em relação ao C absoluto e 93% em relação aos controles fosfatados, respectivamente.

Alguns grupos de pesquisa têm demonstrado efeitos sinérgicos no uso combinado de microrganismos mistos em diferentes culturas (Sarto et al., 2010; Minaxi et al., 2013; Saxena et al., 2013; Schossler et al., 2016). Minaxi et al (2013) relataram que a co-inoculação do FMA com rizobactérias solubilizadoras de P mostrou um aumento significativo no peso seco em plantas de trigo em relação ao controle contendo fosfato tricálcico. Tal resultado está em conformidade com os relatados por Saxena et al. (2013), em que a dupla inoculação entre microrganismos mistos (fungo e bactéria) aumentou todos os parâmetros de crescimento estudados. Paula et al. (1992) também relataram aumento significativo no peso seco da raiz em batata-doce após a dupla inoculação com o fungo *G. clarum* e as bactérias *A. diazotrophicus* e *Klebsiella* sp.

Segundo Oliveira et al. (2013), uma alternativa eficiente para a agricultura consiste na utilização de rochas naturais, com baixas taxas de solubilização, mas que em associação com microrganismos solubilizadores, são capazes de suprir, mesmo que parcialmente, a demanda de P pelas plantas.

Sarto et al. (2010) avaliaram o efeito da co-inoculação de dois fungos

solubilizadores de fosfato associados a duas fontes de fosfato natural em plantas de sorgo e observaram que os tratamentos com inoculantes mistos proporcionaram os maiores incrementos na altura e na matéria seca da parte aérea em comparação aos controles de adubos.

Ferreira et al. (2016) verificaram o efeito do uso combinado de *Azospirillum* sp, *Bacillus* sp e FMA no cultivo de milho, adubado com fosfato de rocha de Araxá e observaram ganhos expressivos de massa seca da parte aérea da planta de milho de até 59,6% em relação ao tratamento controle não inoculado.

Oliveira et al. (2013) testaram a inoculação de cinco bactérias do gênero *Bacillus* (solubilizadoras de P) em conjunto com duas rochas fosfatadas (fosfato de Itafós e fosfato de Araxá) em plantas de milho e verificaram que os tratamentos com o inoculante permitiram ganhos significativos de matéria seca de milho em relação aos tratamentos não inoculados. Dados similares foram obtidos por Ribeiro et al. (2015), em que a inoculação de bactérias solubilizadoras de P em associação com duas rochas fosfatadas promoveu um acréscimo de até 50% na fitomassa da raiz de milho, aumentando a massa seca da raiz (MSR).

## 5. CONCLUSÕES

Foram isolados doze fungos oriundos da filosfera, do limbo foliar e da rizosfera de plantas de milho (*Zea mays* L.). Sua caracterização morfológica indica que eles pertencem aos seguintes gêneros: *Penicillium* (F1), *Curvularia* (F2, F5, F7, F8, F9 e F10), *Helminthosporium* (F3), *Gliocladium* (F4), *Fusarium* (F6), *Trichoderma* (F11) e *Aspergillus* (F12). Já a caracterização molecular indica que eles pertencem às seguintes espécies: *Penicillium kloeckeri* (F1), *Curvularia geniculata* (F2, F8, F10), *Curvularia lunata* (F3, F4, F5, F7, F9), *Fusarium incarnatum* (F6), *Trichoderma harzianum* (F11) e *Aspergillus caesiellus* (F12).

A maioria dos fungos apresentou habilidade de solubilizar Pi em meio sólido suplementado com fosfato de cálcio e fosfato de Araxá e solubilizar ZnO, exceto os fungos F11 e F12. Quanto à capacidade de degradar celulose, apenas os fungos F4, F9 e F12 não apresentaram essa habilidade.

Com base nos testes de compatibilidade entre fungos e bactérias promotoras do crescimento vegetal da coleção do LBCT-UENF, nenhum dos isolados fúngicos foi incompatível com as bactérias. No entanto, algumas bactérias foram mais compatíveis que as outras.

Das 88 interações fungo-bactéria testadas em ambos os meios fosfatados, 16 apresentaram halo solubilizador maior que a cultura individual em meio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  enquanto 37 apresentaram este potencial em meio fosfato de rocha Araxá.

Os fungos F6 e F12 não mostraram habilidade para solubilização de P no meio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , porém quando co-inoculados com as bactérias apresentaram efeito solubilizador positivo. O mesmo aconteceu com os fungos F4 e F12 em meio fosfato de rocha Araxá.

Não foi possível estabelecer uma relação entre a compatibilidade entre fungos e bactérias e a capacidade desses microrganismos desenvolverem um sinergismo no mecanismo de promoção de crescimento de plantas como é o caso da solubilização de P.

Os isolados capazes de solubilizar fosfato em meio sólido mantiveram esta habilidade em meio líquido.

A co-inoculação do fungo 10 (F10) e da bactéria (B8) associada às duas fontes fosfatadas influenciou significativamente a maioria das características biométricas avaliadas em plantas de milho, sugerindo que a aplicação de microrganismos mistos pode representar uma alternativa promissora para a produção agrícola sustentável.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd Alla, M. H (1994) Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 18:(3)216-218.

Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., Kloepper, W (2009) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microb Ecol* 58:921–929.

Aguiar, K. P (2012) Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. (Dissertação) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Ahuja, A., Ghosh, S. B., D'Souza, S. F. (2007) Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. *Bioresource Technology* 98:3408-3411.

Akhtar, N., Iqbal, A., Qureshi, M. A., Khan, K. H (2010) Effect of phosphate solubilizing bacteria on the phosphorus availability and yield cotton. *Journal of Scientific Research*, 40:(1)15-24.

Alves, L., Mendoza, E. A., Silva Filho, G. N (2002) Microrganismos solubilizadores de fosfatos e o crescimento de Pínus e Eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26:939-947.

Amado, T. J. C., Mielniczuk, J. & Aita, C. (2002) Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:241-248.

Andrews, J. H & Harris, R. F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Reviews of Phytopathology*, 38:145-180.

Altschul, S. F., Madden T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.

Artursson, V., Finlay, R. D., Jansson, J. K. (2005) Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environ Microbiol* 7: 1952–1966.

Artursson, V., Finlay, R. D., Jansson, J. K (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8:1-10.

Asghar, H. N., Zahir, Z, A., Arshad, M., Khaliq, A. (2002) Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 35(4):231-237.

Avio, L., Cristiani, C., Strani, P., Giovannetti, M (2010) Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 242-253.

Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., Twissell, R. J. (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil and Biochemistry*, 40:1733-1740.

Baker, R. (1987) Microparasitism: ecology and physiology. *Can. J. Plant Path*, 2:370-379.

Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D. Olivares, F. L., Hoste, B. Kersters, K., Hartmann, A. G., Döbereiner, J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 802-810.

Baldani, V. L. D. (1986) Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 238f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., Döbereiner, J (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int J Syst Bacteriol 46:(3) 802–810.

Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biology Fertility of Soils, 30:485-491.

Baldotto, L. E. B., Baldotto, M. A., Olivares, F. L., Souza, A. N. (2014) Performance of pineapple slips inoculated with diazotrophic phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. Rev. Ceres, Viçosa, 61(3):414-423.

Baldotto, L. E. B., Silva, L. G. J. S., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Baldotto, M. A (2012) Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. Revista Ceres, Viçosa, 59:2.

Baldotto, L. E. B., Baldotto, M. A., Canellas, L. P., Bressan-Smith, R., Fábio Lopes Olivares, F. L (2010) Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *burkholderia* spp. during acclimatization. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 34:5.

Baldotto, L. E. B., Olivares, F. L., Bressan-Smith, R (2009) Caracterização estrutural da interação entre a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 e plântulas de abacaxizeiro da cultivar Vitória.

Baldotto, L. E. B & Olivares, F. L. (2008) Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 54:918-931.

Balota, E. L., Lopes, E. S., Hungria, M., Döbereiner, J (1997) Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 32:(6)627-639.

Bansal, R. K., Dahiya, R. S., Narula, N., Jain, R. K. (2005) Management of *Meloidogyne incognita* in cotton using strains of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Nematol Medit, 33:101–105.

Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 56(417):1761-1778.

Barka, E. A., Nowak, J., Clément, C. (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. Applied and Environmental Microbiology, 72:7246-7252.

Barroso, C.B. & Nahas, E (2008) Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43:529-535.

Bashan, Y & Bashan, L. E (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. Advances in agronomy, 108:77-136.

Bastian, F., Cohern, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A (1) e B (3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation, The Hague, 24:7-11.

Bazzicalupo, M. & Okon, Y. (2000) Associative and endophytic symbiosis. In: Pedrosa, F., Hungria, M., Yates, M.G. & Newton, W.E., eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Academic Publishers, 409-410.

Belimova, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V., Piluzzac, G., Bullittac, S., Glick, B. R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry* 37:241–250.

Berraquero, F. R., Baya, A. M., Cormenzana, A. R. (1976) Establecimiento de índices para el estudio de La solubilización de fosfatos por bacterias Del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17:399-406.

Bolan, N. S., Elliot, J., Gregg, P. E. H. (1997) Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 24(2): 169-174.

Braz, R. R. (2011) Estímulo da solubilização de fosfato resultante da co-inoculação de *Aspergillus niger* e *Burkholderia cepacia*. Dissertação apresentada em Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.

Braz R. R & Nahas E (2012) Synergistic action of both *Aspergillus niger* and *Burkholderia cepacea* in co-culture increases phosphate solubilisation in growth medium. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 332: 84-90.

Brito, N. M & Nascimento, L. C. (2015) Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 17:(2)230-238.

Busato, J. G., Zandonadi, D. B., Mól, A. R., Souza, R. S., Aguiar, K. P., Júnior, F. B. R., Olivares, F. L. (2016) Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *Society of Chemical Industry*. DOI 10.1002/jsfa.7819.

Camacho, M., Santamaría, C., Temprano, F., Rodriguez-Navarro, D. N., Daza, A (2001) Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. Can J Microbiol. 47: 1058-1062.

Cancellier, L. L., Afférri, S. F., Adorian, G. C., Rodrigues, H. V. M (2010) Influencia da adubação orgânica na linha de semeadura na emergência e produção forrageira de milho. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) 5:(5)25-32.

Canellas, L. P., Balmori, D. M., Médici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C. C., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). Plant Soil 366(1-2): 119-132.

Cattelan, A. J. & Hartel, P. G. (2000) Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Sociedade Brasileira de Ciência Solo. Tópicos em Ciência do Solo, 1:213-234.

Cavalcante, V. A & Döberener, J. A. (1988) new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. Plant and Soil, Dordrecht, 108:23-31.

Cavalheiro, M. G., Farias, D. F., Fernandes, G. S., Nunes, E. P., Cavalcanti, F. S., Vasconcelos, I. M., Melo, V. M. M., Carvalho, A. F. U (2009) Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. Revista Brasileira Farmacogn. 19:2.

Chawla, N., Phour, M., Suneja, S., Seema Sangwaan, S., Goyal, S.(2014) *Gluconacetobacter diazotrophicus*: An overview. Research in Environment and Life Sciences, 7:(1) 1-10.

Colozzi-filho, A & Siqueira, J. O (1986) Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. 1. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 10:199-205.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2017) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Monitoramento Agrícola-Safra 2016/2017. Quinto levantamento, Brasília, 4:1-166.

Cordell, D., Drangert, J. O., White, S (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292–305.

Coughlan, M. P. (1985) The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: RUSSEL, G. E. (Ed.). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Newcastle upon Tyne: Intercept, 309-409.

Coutinho, F. P., Silva, J. F., Santana, I. P., Felix, W. P., Yano-Melo, A. M (2014) Solubilização de fosfatos *in vitro* por *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson na presença de fontes de carbono. *Hoehnea*, 41:(2).

Coutinho, F. P., Felix, W. P., Yano-Melo, A. M (2012) Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. And *Penicillium* spp. *Ecological Engineering*, 42:85-89.

Cunha, J. R. B., Santos, F. C. P., Assis, F. G. V., Leal, P. L (2016) Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Revista Ceres*, 63:5.

Datnoff, L. E & Pernezny, k. I. (2001) *Paenibacillus macerans* e *Trichoderma harzianum* enhance transplant growth and suppress fusarium crown and root rot in Florida tomato production. In: Caribbean Division Meeting Abstracts, La Habana, Cuba, 2002-2025.

Deveau, A., Brulé, C., Palin, B., Champmartin, D., Rubini, P., Garbaye, J., Sarniquet, A., Frey-Klett, P. (2010). Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus

*Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. Environ. Microbiol. Rep. 2:560–568.

Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., Chauhan, S. M. (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. Microbiological Research, 159:371-394.

Divakara, S. T., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M. V., Hariprasad, P., Nayakaa, S. C., Siddapura Ramachandrappa Niranjanaa, S. R (1013) Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds Society of Chemical Industry, DOI 10.1002/jsfa.6380.

Döbereiner, J; Baldani, V. L. D. (1995) Endophytic diazotrophs other than rizobia. In 7th. International Symposium on Microbial Ecology. Abstracts. Santos, São Paulo.

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. (1995b) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 66.

Edgar, R. C (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.

Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). (1997) Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, (Embrapa – CNPS. Documentos, 1), 212.

Farhat, M. B., Farhat, A., Bejar, W., Kammoun, R., Bouchaala, K., Fourati, A., Antoun, H., Bejar, S., Chouayekh, H (2009) Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. Archives of Microbiology, 191:(11) 815-824.

Felipe, S. H. S., Benchimol, R. L., Leão, N. V. M., Silva, C. M. (2010) Levantamento de Fitopatógenos potenciais em sementes de três espécies

florestais selecionadas para reflorestamento na Amazônia Oriental. 14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. Belém, 1-4.

Fernandes, M. S & Souza, S. R. A (1990) Aquisição de N por plantas. In: Simpósio Brasileiro sobre Nitrogênio em Plantas (1990), Itaguaí. Anais Itaguaí: Unicamp, 172-192.

Ferreira, F. N., Ribeiro, V. P., Melo, I. G., Marriel, I. E., Souza, F. A., Christiane Abreu de Oliveira, C. A (2016) Avaliação do crescimento de milho co-inoculado com microrganismos solubilizadores de fósforo, fungos micorrízicos e *Azospirillum*. XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Bento Gonçalves.

Ferreira, L. S (2010) Caracterização de isolados de *Curvularia* spp. endofíticos de milho (*zea mays* L.) por parâmetros morfológicos e moleculares. Dissertação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

Florencio, C (2011) Microrganismos produtores de celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. Dissertação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Furlani, A. C. F. A., Camargo, M., Panizzi, R. C., Pereira, C. F (2007) Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. Nota Científica, Jaboticabal, 35:(2)196-200.

Gamalero, E., Trotta A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M. G., Berta, G (2004) Impact of two *Pseudomonas fluorescent* and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. Mycorrhiza, 14:185–192.

Geiser, D. M., Gasco, M. M. J., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A., O'Donnell, K. (2004) Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110: 473–479.

- Glass, N. L. & Donaldson, G. C (1994) Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *American Society for Microbiology*, 61:(4)1323-1330.
- Gondim, A. R. O., Prado, R. M, Alves, A. U., Fonseca, I. M (2010) Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de macronutrientes em solução nutritiva. *Revista Ceres*, 57:539-544.
- Gomes, N. S. B., Junior, A. G., Auer, C. G (2001) Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo*, 43:123-138.
- Gomezjurado, M. E. G (2012). Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua inoculação em caupi e milho. Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do solo. Universidade Federal de Lavras.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B. (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 27:1231-1240.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., Reddy, G (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna, *Microbiological Research*, 163:(2)234-242.
- Hu, F. P & Young, J. M (1998) Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 84:263– 271.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Surveswaran, S., Hyde, K. D., Corke, H., Sun M (2009) Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36: 69-88.
- Hungria, M., Rubens, J. C., Souza, E. M., Pedrosa, F. O (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425.

Illmer, P., Barbato, A., Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganism. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 265–270.

Illmer, P & Schinner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, London, 24:389- 395.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org>.

Isopi, R., Fabri, P., Delgallo, M., Puppi, G (1995) Dual inoculation of sorghum bicolor (L.) Moebch ssp. Bicolor with VAM and *A. diazotrophicus*. *Symbiosis*, 18:43-55.

Jayasinghearachchi, H. S & Seneviratne, G (2005) Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal–rhizobial biofilms. *Soil Biology & Biochemistry*, 1–4.

Jesus, J. A (2013) Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. Dissertação em Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes.

Kanagawa, A. I & Neves, M. A. (2011). *Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas*. João Pessoa: Ed. Universitária, ISBN: 978-85-7745-902-5, 257-318.

Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M.N.A.C.I., Shin, D. H., Kim, H, Y., Hong, J. K., Lee, I. J. (2009) Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, 31:277-281.

Kharwar, R. N., Mishara, A., Gond, S. K., Stierle, D (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports* 7:1208-28.

Kirner, S., Hammer, P. E., Hill, D. S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L. J., Lanahan, M., Van Pee, K. H., Ligon, J. M (1998) Functions encoded by pyrrolnitrin

biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. Journal Bacteriology. Baltimore, 180:1939-1943.

Kothari, S. K., Marschner, H., Romheld, V. (1991) Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. Plant Soil, Hague, 31:177-185.

Lanfranco, L., Perotto, S., Longato, S., Mello, A., Cometti, V., Bonfante, P (1998) Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. Mycorrhiza manual. Berlin: Springer, 353-372.

Leitão, V. O., Lima, R. C. M., Vainstein, M. H., Ulhoa, C. J (2010) Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. Biotechnology Letters, 32: 1083-1088.

Legislação Brasileira de Fertilizantes e Corretivos (1980) Brasil. Lei nº 6.894 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura, e dá outras providências. Diário Oficial da República, Brasília, 16 de novembro de 1980. Disponível em < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/L6894.html](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L6894.html) > Acesso em: 11 de abril 2017.

Li, C.Y & Strzelczyk, E (2000) Belowground microbial process underpin forest productivity. Phytion, Buenos Aires, 40:129-134.

Lin, T. F., Huang, H. I., Shen, F. T., Chiu-Chung Young, C. C (2005) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-AI74, Bioresource Technology 97:957-960.

Lima, K. B., Martins, M. A., Freitas; M. S. M., Olivares, F. L (2011) Fungos micorrízicos arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação fosfatada em mudas de mamoeiro. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 33:3.

Logeshwaran, P., Thangaraju, M., Rajasundari, K (2011). Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in

sweet potato (*Ipomea batatus*). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44: 216–223.

Luz, W. C. (2001b). Evaluation of Plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 26(3):597-600.

Luz, J. S., Silva, R. L. O., Silveira, E. B., Cavalcante, U. M. T (2006) Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. Caatinga (Mossoró, Brasil), 19:(2)128-134.

Marques Júnior R. B., Canellas, L. P., Silva, L. G., Olivares, F. L (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. Revista Brasileira de Ciência do Solo 32:3.

Mehnaz, S & Lazarovits, G (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. Microbial Ecology, 51:326–335.

Mendes, G. O., Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., Silva, I. R., Vassilev, N. B., Costa, M. D (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Ann Microbiol. 64:239-49.

Mendes, R (2008). Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar. Tese em Genética e Melhoramento de plantas. Piracicaba.

Mergulhão, A. C. E. S., Silva, M. V., Lyra, M. C. C. P., Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil Adália Cavalcanti do Espírito Santo. Figueiredo, M. V. B., Silva, M. L. R. B., Leonor Costa Maia, L. C (2014) Hoehnea 41(3): 393-400.

Minaxi, J., Saxena, S., Chandra., L. Nain, L (2013) Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13:(2), 511-525.

Mittal, M., Singh, O., Nayyar, H., Kaura, J., Tewari, R (2008) Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology e Biochemistry* 40:718–727.

Moreira, F. M. S & Siqueira, J. O. (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo*, 2ª ed., UFLA: Lavras.

Nahas, E (1996) Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12:567-572.

Nahas, E (2002) Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, 61:(3)267-275.

Nahas, E & Assis, L. C (1992) Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 23:37-42.

Nahas, E., Benzatto, D., Assis, L. C (1990) Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. *Soil Biol. Biochem.* 22:1097-1101.

Narloch, C., Oliveira, V. L., Anjos, J. T., Silva Filho, G. N (2002) Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 37:(6)841-845.

Nogueira, R. E., Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Lanna, M. C. S., Mendonça, M. P (2005) Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. *Sociedade Botânica do Brasil* 19(3): 417-424.

Novais, C. B., Souza, F. A., Siqueira, J. O (2010) Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 886-896.

Novakowski, J. H., Sandini, I. E., Falbo, M. K., Moraes, A., Novakowski, J. H., Cheng, N. C. (2011) Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação

de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. Ciências Agrárias, Londrina, 32:1687-1698.

Okon, Y & Labandera Gonzalez, C. A. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, 26(12):1591-1601.

Okon, Y & Vanderleyden, J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. Applied and Environmental Microbiology, New York, 63(7):366-370.

Oliveira, A. G., Chagas-Junior, A. F., Santos, G. R., Miller, L. O., Chagas, L. F. B (2012) Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, 7(3): 149-155.

Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Baldani, J. I. (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: CNPAB, (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 40.

Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis, V. M., Baldani, J. I., Döbereiner, J (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. Biol Fertil Soils 21, 197–200.

Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R. S. M.; Carneiro, N. M., Guimarães, C. T., Schaffert, R. E., Sá, N. M. A. (2009) Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian cerrado biome. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 25:1-6.

Oliveira, C. A., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Mattos, B. B., Santos, F. C. dos; Oliveira, M. C., Alves, V. M. C. (2013) Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo em sementes visando melhor aproveitamento deste nutriente pelas plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 1-30.

Oliveira, R. J. V. O (2014) Diversidade e identificação de fungos endofíticos em folhas de *Cocos nucifera* L. em Goiana Pernambuco, com base em morfologia e sequências de rDNA. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Papagianni, M., Frank, W., Matthey, M (2005) Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7178-7186.

Pasqualini, D (2013) Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato como alternativas para agricultura familiar e recomposição florística. Tese em Manejo do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Paula, M. A., Reis, V. M., Döbereiner, J (1991) Interactions of *Glomus clarum* with *A. diazotrophicus* in infection of sweet potato, sugar cane, sweet sorghum. *Biology and Fertility of Soils*, 11:111-115.

Paula, M. A., Urquaiá, S., Siqueiras, J. O., Döbereiner, J (1992) Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato. *Biology and fertility of soils*, 14:61- 66.

Peix, A., Lang, E., Verburg, S., Sproer, C., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., Velázquez, E. (2009) *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolate able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32:334-341.

Pereg, L & McMillan, M (2015) Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry* 80:349-358.

Peres, A. P., Silva-Mann, R., Vieira, M. G. G. C., Machado, J. C (2010) Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados a podridão peduncular do mamão. *Ciência e Agrotecnologia* 27:(5).

Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-De Los Santos, P., Reis, V. M., Caballero-Mellado, J. (2006) *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1931-1937.

Pikovskaya, R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya, 17: 362-373.

Pinho, D. B., Firmino, A. L., Ferreira-Junior, W. G., Pereira, O. L. (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. Mycotaxon, Portland, 122:333-345.

Piñón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M. T.; Legaz, M. E (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. Research Microbiology , 153:345-351.

Posada, D., Buckley, T. R (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst Biol 53:793–808.

Raij, B. (1991). Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba. Revista Ceres, São Paulo. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 343.

Rambaut, A (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.

Rambaut, A., Drummond, A. J (2013) Tracer v1.6. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.

Rannala, B., Yang, Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. J Mol Evol 43:304–311. doi: 10.1007/BF02338839.

Read, D. J (1991) Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376–391.

Resende, M. L., Oliveira, J. A., Guimarães, R. M., Von Pinho, R. G., Vieira, A. R. (2004) Inoculação de sementes de milho utilizando *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 28:793-798.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., Antoun, H. (1999) Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, Aberdeen, 28:281- 290.

Ribas, P. P., Rech, R., Aida Terezinha dos Santos Matsumura, A. T. S., Sueli Van Der Sand, S. T. (2016) Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. *Revista Brasileira de Biociências* 14:(2) 70-75.

Ribeiro, V. P., Almeida, C. N. S., Gomes, E. A., Lana, U. G., Marriel, I. E., Oliveira, C. A (2015) Efeito da inoculação de bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milheto (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rocha. XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Natal.

Richardson, A. E (2001) Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, 28:897-906.

Riddell, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42:265-270.

Rodríguez, H & Fraga, R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319–339.

Rodrigues, P. S. L (2016) Caracterização molecular e de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas associadas a frutíferas tropicais. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Roesch, L. F. W., Passaglia, L. M. P., Bento, F. M., Triplett, E. W., Camargo, F. A. O. (2007) Diversidade de bactérias diazotróficas endofítica

associadas a plantas de milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36:1367-1380.

Rojas, A., Holguin, G., Glick, B. R., Bashan, Y (2001) Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub> – fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 181–187.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.

Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, C. R., Azevedo, J. L (2005) Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches’Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences, Australia*, 1:(1)24-33.

Ruegger, M. J. S & Tauk-Torsinielo, S. M (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 27: (2)205-211.

Sagoe, C. I., T. Ando, K. Kouno and T. Nagaoka (1998) Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44:617-625.

Sala, V. M. R., Freitas, S. S., Silveira, A. P. D (2007) Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. *Pesquisa Agropecuária brasileira, Brasília*, 42:(11)1593-1600.

Santos, M. E. R., Cordeiro, A. R., Bittencourt, J. V. M. (2010) Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante Agrícola. II Ciclo de Atualização Agropecuária – 14 a 19 de setembro.

Santos, T. T & Varavallo, M. A (2011) Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, 32:(2)199-212.

Sarto, M. V. M., Steiner, F. S., Pivetta, L. A., Castoldi, G., Lázaro, R. L. (2010) Crescimento e Absorção de Fósforo de Plantas de Sorgo Inoculadas com Fungos Solubilizadores de Fosfato Associado à Aplicação de Fosfato Natural. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 1462-1469.

Saxena, J., Minaxi, J., Anamika, J (2013) Impact of a Phosphate Solubilizing Bacterium and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus etunicatum*) on Growth, Yield and P Concentration in Wheat Plants. Clean – Soil, Air, Water 42:(9)1248–1252.

Schmidt, G & Laskowski, M (1961) Phosphate Ester cleavage (survey). In: Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K., (Ed.). The enzymes 2ed. New York: Academic Press, 3-35.

Schossler, J. H., Meert, L., Rizzardi, D. A., Michalovicz, L (2016) Componentes de rendimento e produtividade do feijoeiro comum submetido à inoculação e coinoculação com estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*. Revista Scientia Agraria, 17:(1)10-15.

Seshadri, S., Ignacimuthu, S., Lakshminarasimhan, C (2010) Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. Chemical Engineering Communications, 191:(8)1043-1052.

Sette, L. D., Passarini, E. M. R. Z., Delarmelina, E. C., Salati, E. F., Duarte E. M. C. T (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World J Microbiol Biotechnol, 22:1185–1195.

Shankaraiah, C., Hunsigi, G., Nagaraju, M. S (2000) Effect of levels and sources of phosphorus and phosphate solubilizing microorganisms on growth, yield and quality of sugarcane. Sugar Tech, 2:(2)23-28.

Silva Filho, G. N., Narloch, C., Scharf, R (2002) Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. Pesquisa Agropecuária brasileira, Brasília, 37:(6)847-854.

Silva Filho, G. N & Vidor, C (2001) Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36:(12)1495-1508.

Silva-Filho, D. F. S., Pizetta, P. U. C., Almeida, J. B. S. A., Pizetta, K. F. L., Ferraudo, A. S (2002) Banco de dados relacional para cadastro, avaliação e manejo da arborização em vias públicas. *Revista. Árvore*, Viçosa-MG, 26:(5) 629-642.

Silva Filho, G. N & Vidor, C (2000) Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24:311-319.

Silva, M. S. B. S., Rodrigues, A. A. C., Oliveira, L. J. M. G., Silva, E. K. C., Pereira, T. S (2014) Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia luneta* em semente-plântula de arroz. *Rev. Ceres*, Viçosa, 61:(4)511-517.

Silva, R. L. O., Luz, J. S., Silveira, E. B., Cavalcante, U. M. T (2006) Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Sociedade de Botânica Brasileira* 20:(3)649-655.

Silva, M. F., Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., Reis, V. M. (2009) Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 44:(11).1437-1443.

Silveira, E. L. (2008) Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) –Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Singh, S & Kappor, K. K. (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry

matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fert. Soils*, 28(2):139-144.

Singh, A & Reddy, M. S (2011) Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of soil Biology* 47:(1)30-34.

Siqueira, J. O & Moreira, F. M. S. (1996) Microbiologia do solo e sustentabilidade agrícola: Enfoque em fertilidade do solo e nutrição vegetal. In: Reunião Brasileira em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, Manaus: SBCS, 22:1-42.

Siqueira, J. O., Sousa, C. R. F., Santos, J. G. D., Schneider, J., Carneiro, M. A. C (2007) Micorrizas e degradação do solo: Caracterização, efeitos e ação recuperadora. In: Ceretta, C. A., Silva, L. S., Reichert, J. M., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 5:219-305.

Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., Heo, M. S (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97:204-210.

Souchie, E. L & Abboud, A. C. S (2007) Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. *Ciências Agrárias, Londrina*, 28:(1)11-18.

Souchie, E. L., Abboud, A. C. S., Caproni, A. L (2007) Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. *Bioscience. Journal.*, Uberlândia, 23:(2) 53-60.

Souchie, E. L., Azcón, R., Barea, J. M., Saggin-Júnior, O. J., Da Silva, E. M. R (2005b) Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária. Brasileira*, Brasília, 40:(11) 1149-1152.

Souza, M. L. (2001) Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotecnologia*, Piracicaba, 21:28-31.

Souza, V. C. D., Silva, I. C. L., Berbara, R. L. L, Barreto, A. F. (2006) Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental (S.I)*. 10:612-618.

Souza, R. D., Mendonça, E. A. F., Soares, M. A (2015) Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathol*, Botucatu, 41:(3)229-232.

Sturz, A. V., Christie, B. R., Nowak, J. (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19:1-30.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S (2007) Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.

Tarrand, J. J., Krieg, N. R., Döbereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal Microbiology* 24: 976- 980.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.

Tilak, K. V. B. R., Li, C. Y., Ho, I (1989) Occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, Dordrecht, 116:286-288.

Toledo, Y., Hernández, A., Alvarez, M., Martín, G. M., Márquez, R (2002) Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium* sp en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus* sp). *Cultivos Tropicales*, 23:(4)11-15.

Tracy, M (1907) A Study of the toxins of *Bacillus prodigiosus*. 307-327.

Toro, M., Azcon, R., Barea J. (1997) Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4408–4412.

Videira, S. S (2012) Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de Capim-Elefante. Tese apresentada ao curso de pós graduação em agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Villegas, J & Fortin, J. A (2001) Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing  $\text{NH}_4^+$  as nitrogen source. *Canadian Journal Botany*, 79: 865–870.

Villegas, J & Fortin, J. A (2002) Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing  $\text{NO}_3^-$  as nitrogen source. *Canadian Journal Botany* 80: 571–576.

White, T. J., Brunst, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Innis M.A. & Gelfand, D.H (Eds). *PCR Protocols*. San Diego. Academic Press, 315-322.

Whitelaw, M. A. (2000) Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, San Diego, 69:99-151.

Wilson, D (1995) Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Dept of Zoology, Arizona State Univ., 73:274-276.

Zauza, E. A. V., Alfenas, A. C., Mafia, R. G. (2007) Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas, A.C., Mafia, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 23-52.