

Isolamento de fungos mineralizadores de P ligado a fitato da rizosfera de milho adubado de maneira convencional ou orgânica

Emanuele S. Souza¹, Flávia G. Deus¹, Valdenia L. da Silva¹, Patrícia G. Silva², Newton P. Carneiro³, Eliane A. Gomes³, Flávia A. S. Oliveira¹, Ivanildo E. Marriel³ e Andréa A. Carneiro³.

¹Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG. manutsouza@yahoo.com.br; flavinhagd@yahoo.com.br; valdenialopes@yahoo.com.br

²Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte – MG patriciabio1@yahoo.com.br

³ Pesquisadores Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG, 35701-970 newtonc@cnpmc.embrapa.br; eliane@cnpmc.embrapa.br; imarriel@cnpmc.embrapa.br; andreac@cnpmc.embrapa.br.

Palavras-chave: *Zea mays*, fungos, fitato, fósforo, rDNA.

Introdução

A aquisição de fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, desempenhando importantes papéis em funções fisiológicas básicas (RAGHOTHAMA, 1999). Do conteúdo de P no solo, apenas uma pequena quantidade, entre 0,1 e 10 μM (RAGHOTHAMA, 1999), está disponível na fase líquida. Para manter um crescimento saudável, plantas necessitam, no mínimo, entre 5 e 60 μM de P, dependendo da espécie (FÖHSE et al., 1988). Para resolver o problema da deficiência de P e manter um ótimo rendimento agrícola, mais de 30 milhões de toneladas/ano de fertilizantes fosfatados são adicionadas aos solos no mundo inteiro (INTERNATIONAL FERTILIZERS INDUSTRY ASSOCIATION, 2006). Baseado no atual consumo de fertilizantes fosfatados, estima-se que as fontes de P estejam esgotadas dentro de aproximadamente 90 anos (RAGHOTHAMA, 1999; GÜSEWELL, 2004).

O P orgânico (Po) representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato. Esta forma de P orgânico parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (RICHARDSON et al., 2000). Para ser utilizado, o Po precisa ser hidrolisado através da atividade de enzimas fosfatases de origem microbiana ou vegetal. Uma grande variedade de fosfatases com diferentes especificidades tem sido caracterizada em raízes de plantas (BOSSE; KOCK, 1998) e microrganismos do solo (RICHARDSON, 1994). Estas incluem as fitases, que são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações fosfomonoéster do fitato, criando formas menos complexas de *myo*-inositol fosfato e fosfato inorgânico.

A contribuição de fosfatases, em especial as fitases, provenientes de raízes ou de microrganismos do solo, para a nutrição de plantas, tem sido pouco estudada em solos tropicais. Um aumento da atividade de fosfatases em resposta à deficiência de Pi e a ocorrência de atividade elevada na rizosfera, comparado com o solo livre de raízes, são considerados como evidências do envolvimento destas enzimas na nutrição de plantas (LI et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi a prospecção de fungos, presentes na rizosfera de milho adubado de maneira convencional ou utilizando resíduos orgânicos, capazes de utilizar fitato como fonte de P, visando a identificação de espécies com atividade de



fitase, potencialmente úteis como inoculantes, fontes de genes ou de enzimas para o bioprocessamento de fontes orgânicas de P.

Material e Métodos

Para o isolamento de microrganismos presentes na rizosfera de milho, foram coletadas amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas sob dois regimes de adubação: (i) milho proveniente de solo de cerrado, áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, adubado de maneira convencional (adubo inorgânico) e (ii) milho proveniente de solo de cerrado, Sete Lagoas, adubado com resíduo orgânico constituído de dejetos suínos. Amostras de 1 g de solo foram suspensas em 9 ml de solução salina (NaCl, 0,85% p/v), agitadas em *shaker* durante 40 minutos e deixadas em repouso por 10 min em temperatura ambiente.

Para o isolamento dos microrganismos capazes de utilizar o fitato de sódio (Na-IHP) foram plaqueadas 0,1 ml de diluições seriadas decimais, em solução salina de 10^{-1} a 10^{-4} , com três réplicas cada uma, no meio de cultivo sólido contendo fitato, com a seguinte composição por litro: 10 g Na-IHP, 10 g glicose, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g MnSO_4 , 0,001 g FeSO_4 , 15 g ágar bacteriológico livre de resíduos de P (Sigma – MO – USA), suplementado com 20mM CaCl_2 . Neste meio, um halo é formado devido a utilização de Na-IHP pelos fungos. Todos os fungos capazes de crescer no meio Pikoviskaya sólido foram transferidos para o mesmo meio líquido (sem CaCl_2). Discos de micélio de 3 mm da cultura sólida foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio e incubados por 10 dias sob agitação constante em temperatura ambiente. Aqueles capazes de crescer em meio líquido foram caracterizados molecularmente através do sequenciamento de regiões do rDNA.

A amplificação da região ITS dos fungos selecionados foi feita, a partir do DNA total, utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). As amplificações foram realizadas empregando-se 25 ng de DNA genômico, 2,5 M de MgCl_2 , 0,2 μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 μl de dNTP, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl e 0,2 mM de cada oligonucleotídeo. A reação foi realizada em termociclador modelo (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C , seguido o ciclo de desnaturação 95°C por 30 segundos, 46°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, durante 25 ciclos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 Volts por 2 horas, em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). As bandas amplificadas para os diversos microrganismos foram eluídas do gel utilizando o kit Gene Clean (Q-Bio Gene - USA). Em seguida, os fragmentos de 500 a 600 pb foram diretamente sequenciados usando o kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems -USA), de acordo com recomendações do fabricante. As sequências de nucleotídeos geradas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando os programas BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

Com base na caracterização fenotípica das colônias em meio Pikoviskaya suplementado com CaCl_2 foram isoladas 68 colônias diferentes de fungos, 37 provenientes de solo com adubação convencional e 31 de solos com adubação orgânica.



Todos os fungos isolados em meio sólido foram capazes de crescer em meio líquido utilizando fitato como fonte de P. Richardson e Hadobas (1997) sugeriram que o número de microrganismos determinados usando crescimento microbiano apenas em meio sólido é super-estimado com relação à proporção de microrganismos que realmente utilizam IHP. Segundo estes autores, é possível que esta discrepância seja, em parte, devido a presença no ágar de pequenas quantidades de Pi. Segundo instruções do fabricante, o ágar utilizado no presente trabalho não contém traços de P.

Dentre os fungos isolados da rizosfera de milho adubado convencionalmente foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Eurotiomyces*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Paecilomyces* e *Penicillium*. Da rizosfera de milho adubado com resíduos orgânicos foram isolados os gêneros *Aspergillus*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Pleioblastus*, *Neosartorya*, *Metacordyceps*, *Rhizopus* e *Talaromyces* (Tabela I). Apenas os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram comuns na rizosfera de milho adubado de maneira convencional ou orgânica. Sendo que uma maior variedade de gêneros de fungos capazes de crescer utilizando fitato como fonte de P foi encontrada na rizosfera de milho adubado com resíduos orgânicos. Nem todos os fungos isolados foram capazes de formar halo quando crescendo em meio sólido Pikoviskaya suplementado com CaCl₂, provavelmente o mecanismo de obtenção de P a partir de fitato por estes organismos não seja o mesmo. Apesar das análises de formação de halo ainda estarem em andamento, dos 13 fungos analisados, isolados de solo com adubação convencional, 10 foram capazes de formar halo, enquanto 3 cresceram sem formação de halo. Já dos 19 isolados analisados provenientes de adubação orgânica, 11 cresceram sem formação de halo, enquanto 8 formaram halo (Tabela I).

Estudos de isolamento e caracterização de diferentes grupos de microrganismos que possuem atividade de fitase têm sido publicados. Gargova et al. (1997) avaliaram 203 fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* e selecionaram uma espécie de *Aspergillus* com alta eficiência de produção de fitase extracelular.

Poucos dados relacionados à colonização das raízes do milho por microrganismos mineralizadores de fosfato orgânico foram publicados. Hussin et al. (2007) fizeram um estudo de 249 bactérias isoladas de diferentes regiões da raiz do milho (rizosfera, halosfera e endofíticas) e as principais espécies identificadas foram *Staphylococcus lentus*, *S. xylosus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *Brevibacillus laterosporus*, *Kocuria varians*.

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que a rizosfera do milho adubado de maneira convencional ou orgânica é colonizada por fungos capazes de utilizar fitato como única fonte de P. Futuros trabalhos, visando à quantificação da atividade de fitase e sua localização, intra ou extracelular, são necessários para a utilização eficiente destes microrganismos ou de seus genes para a geração de novas tecnologias, que reduzirão o custo da produção e o impacto ambiental da atividade agrícola.

Financiamento

Projeto financiado pelo CNPq, Fapemig e Embrapa

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of



protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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

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

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

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

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

HUSSIN, A. S. M.; FAROUK, A.-E.; GREINER, R.; SALLEH, H. M.; ISMAIL, A. F. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 1653-1660, 2007.

INTERNATIONAL FERTILIZES INDUSTRY ASSOCIATION. **Fertilizes**. 2006. Disponível em: <<http://www.fertilizes.org>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

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

NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H.. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

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

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

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



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

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

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

TABELA 1. Similaridade de fungos, capazes de mineralizar o fitato, isolados da rizosfera de raízes de milho adubados de maneira convencional ou orgânico com sequências depositadas no banco de dados BLAST.

Isolado	# Acesso BLAST	Espécie BLAST	% Identidade	Crescimento em Fitato	Formação de Halo em Fitato
Adubação Convencional					
CNPMS 29	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	97	+	+++
CNPMS 39	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	97	+	+++
CNPMS 38	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	97	+	ND
CNPMS 45	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	96	+	+++
CNPMS 42	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	96	+	ND
CNPMS 36	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	96	+	+++
CNPMS 22	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	96	+	+++
CNPMS 20	EF661550.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	98	+	-
CNPMS 44	GU566242.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	94	+	ND
CNPMS 04	GU205082.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	94	+	ND
CNPMS 31	GQ153050.1	<i>Aspergillus niger</i>	94	+	ND
CNPMS 34	EU3016601.1	<i>Aspergillus niger</i>	96	+	ND



CNPMS 26	EF661568.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	97	+	+++
CNPMS 48	AF033420.1	<i>Eupenicillium shearii</i>	96	+	ND
CNPMS 08	EU427292.1	<i>Eupenicillium tropicum</i>	99	+	-
CNPMS 35	GQ153050.1	<i>Eurotiomyces</i> sp	98	+	ND
CNPMS 28	GQ153050.1	<i>Eurotiomyces</i> sp	97	+	-
CNPMS 19	GQ153050.1	<i>Eurotiomyces</i> sp	89	+	ND
CNPMS 40	X94177.1	<i>Fusarium dlamini</i>	96	+	+++
CNPMS 24	GU055307.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	96	+	ND
CNPMS 27	GU982311.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	95	+	+++
CNPMS 23	GU480956.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	96	+	ND
CNPMS 21	EU306174.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	95	+	ND
CNPMS 43	FN598940.1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	94	+	ND
CNPMS 46	FN394534.1	<i>Penicillium</i> sp	90	+	ND
CNPMS 02	GU017516.1	<i>Penicillium</i> sp	97	+	ND
CNPMS 03	GU017516.1	<i>Penicillium</i> sp	99	+	ND
CNPMS 06	FJ795356.1	<i>Penicillium</i> sp	98	+	ND
CNPMS 10	GQ184733.1	<i>Penicillium</i> sp	98	+	ND
CNPMS 33	GU566273.1	<i>Penicillium citrinum</i>	96	+	+++
CNPMS 25	GU566273.1	<i>Penicillium citrinum</i>	97	+	ND
CNPMS 11	AJ509865.1	<i>Penicillium ochrochloron</i>	97	+	ND
CNPMS 37	AF176660.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	97	+	+++
CNPMS 14	GU566216.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	98	+	ND
CNPMS 16	GU566216.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	98	+	ND
CNPMS 17	GU566216.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	91	+	ND
		Adubação Orgânica			
CNPMS 373	GQ229082.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	99	+	-
CNPMS 376	GU566253.1	<i>Bionectria ochroleuca</i>	98	+	-
CNPMS 423	GU566253.1	<i>Bionectria ochroleuca</i>	89	+	ND
CNPMS 412	FJ025204.1	<i>Bionectria ochroleuca</i>	92	+	ND
CNPMS 380	GU214631.1	<i>Cladosporium</i> sp	98	+	-
CNPMS 369	EF405864.1	<i>C. cladosporioides</i>	98	+	-
CNPMS 392	GQ184733.1	<i>Curvularia</i> sp	95	+	-
CNPMS 366	GQ229075.1	<i>Fusarium solanii</i>	99	+	ND
CNPMS 379	GU183113.1	<i>Humicola fuscoatra</i>	95	+	ND
CNPMS 386	EF029814.1	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp	97	+	-
CNPMS 396	FJ795356.1	<i>Penicillium</i> sp	98	+	+++
CNPMS 409	FJ827621.1	<i>Penicillium</i> sp	92	+	ND
CNPMS 372	GU566273.1	<i>Penicillium citrinum</i>	98	+	+
CNPMS 407	GQ337426.1	<i>Penicillium funiculosum</i>	96	+	+++
CNPMS 388	GQ924903.1	<i>Penicillium pimiteoutense</i>	97	+	-
CNPMS 398	GU566216.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	98	+	ND
CNPMS 395	GU566216.1	<i>Penicillium pinophilum</i>	97	+	+++
CNPMS 382	EU833225.1	<i>Penicillium purpureum</i>	96	+	-
CNPMS 375	EU833225.1	<i>P. roseopurpureum</i>	97	+	-
CNPMS 394	EU579531.1	<i>P. cf. verruculosum</i>	96	+	+++
CNPMS 374	GU721652.1	<i>Pleioblastus chino</i>	98	+	+
CNPMS 389	EF669952.1	<i>Neosartorya aureola</i>	95	+	-
CNPMS 403	EF669952.1	<i>Neosartorya aureola</i>	96	+	-
CNPMS 390	EF669952.1	<i>Neosartorya aureola</i>	97	+	ND
CNPMS 422	GU827482.1	<i>Metacordyceps</i> sp.	91	+	ND
CNPMS 397	AF543520.1	<i>Rhizopus arrhizus</i>	84	+	ND
CNPMS 402	EU273527.1	<i>Talaromyces flavus</i>	96	+	ND
CNPMS 415	EU273527.1	<i>Talaromyces flavus</i>	95	+	ND
CNPMS 404	AF455513.1	<i>Talaromyces flavus</i>	97	+	+++
CNPMS 378	EU273527.1	<i>Talaromyces flavus</i>	96	+	+++
CNPMS 423	EU273527.1	<i>Talaromyces flavus</i>	90	+	ND

ND: não determinado



