

PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS RADICULARES E RIZOSFÉRICOS DE *Hymenaea courbaril* SOLUBILIZADORES DE CaHPO₄

Lidiane Maria dos Santos Moreira¹; Ana Flavia de Souza Rocha²; Felipe Oliveira da Silva²; Bárbara Gonçalves Cruvinel²; Layara Alexandre Bessa³; Luciana Cristina Vitorino³.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde – GO, lidiane23santos@gmail.com.

²Mestranda em Biodiversidade e Conservação - IFGoiano campus Rio Verde - GO.

²Aluno do curso de Agronomia do IFGoiano campus Rio Verde – GO.

²Aluna do curso de Engenharia Ambiental do IFGoiano campus Rio Verde – GO.

³Professora e pesquisadora do IFGoiano campus Rio Verde - GO.

Introdução

Micro-organismos endofíticos e rizosféricos possuem uma estreita relação com as plantas e são de extrema importância para a agricultura atual, visto que aumentam a aquisição de nutrientes pelas plantas e estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a transformação de nutrientes insolúveis do solo (ALORI et al., 2017).

Dentre os muitos efeitos da associação planta-micro-organismo, destaca-se a habilidade para promoção do crescimento vegetal e aumento da produtividade (CHANG et al., 1986). Esta habilidade está relacionada à ação de alguns micro-organismos que atuam solubilizando nutrientes indisponíveis, como os fosfatos (e.g. VITORINO et al., 2012; ANZUAY et al., 2013).

Esses microrganismos melhoram o crescimento e o rendimento de uma ampla variedade de culturas. Assim, a inoculação de sementes / culturas / solo com Micro-organismos constituem uma estratégia promissora para melhorar a produção mundial de alimentos sem causar qualquer risco ambiental (ALORI et al., 2017). Microrganismos solubilizadores de fosfato têm um efeito sinérgico considerável no crescimento e desenvolvimento das culturas (TALLAPRAGADA E GUDIMI, 2011), pois eles podem também gerenciar patógenos, produzindo compostos antifúngicos, sideróforos, antibióticos, cianeto de hidrogênio e enzimas líticas, contribuindo para a proteção da planta (PARMAR et al., 2015).

Este trabalho teve por finalidade, prospectar micro-organismos solubilizadores de CaHPO_4 a partir da comunidade rizosférica e endofítica radicular de *Hymenaea courbaril*, amostradas no Cerrado e Pantanal.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal: Foram amostradas mudas jovens da espécie *H. courbaril*, desenvolvidas naturalmente em fitofisionomias com formação florestal no Cerrado e no Pantanal, sendo os locais: Parque da Serra de Caldas (Rio Quente-GO) e Parque Natural Municipal de Piraputangas (MS). As mudas foram retiradas em blocos de solo, cortados a 30 cm de distância do caule e acondicionadas em saco plástico esterilizado, imersas em gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Agrícola do IFGoiano campus Rio Verde. Também foi realizada a coleta e armazenamento asséptico de 10g de solo que estava em contato direto com as raízes de cada uma das plantas coletadas.

Isolamento dos micro-organismos endofíticos radiculares: Fragmentos de raízes de aproximadamente 10 cm de comprimento foram submetidos a tratamento prévio de desinfestação, segundo método descrito por Petrini & Muller (1986), com modificações. As amostras foram lavadas em água corrente, imersas em água de torneira com detergente neutro e agitadas em mesa agitadora a 150 rpm, por 5 minutos. Em seguida o material foi levado ao fluxo laminar para assepsia com álcool 70% (v/v) um min; hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo (v/v) três min, e novamente álcool 70% (v/v) 30 segs. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 μL da água utilizada no enxágue final das amostras, para inoculação em tubos contendo 5 mL de caldo nutriente. Fragmentos de aproximadamente um cm de raiz, foram obtidos com auxílio de pinça e tesoura e distribuídos superficialmente em placas de Petri contendo meio BDA em seguida incubadas em estufa bacteriológica a 30°C.

Isolamento dos micro-organismos rizosféricos: As alíquotas de 10g de solo foram diluídas em 250 mL de solução salina (0,85% NaCl) (v/v), esterilizada para realização de uma diluição seriada, fator 10. Cerca de 100 μl de cada diluição foi pipetado para placas de Petri contendo ágar nutriente e espalhado com alça de Drygalski. As placas foram incubadas a $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 24 a 48 horas. Utilizando as diluições de 10^{-4} e 10^{-5} .

Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio: A avaliação da fonte de fósforo, foi realizada utilizando o meio GEL como testemunha e suplementado com a fonte

(CaHPO₄), na proporção de 0,89 g L⁻¹ de P. O fosfato de cálcio foi obtido pela adição de 1 mL de uma solução de K₂HPO₄ a 5% e 1 mL de uma solução de CaCl₂ a 10% por 10 mL de meio. Após o crescimento foi realizada a medição do pH e a determinação da quantidade de P inorgânico, pelo método colorimétrico da vitamina C, conforme Gadagi e Sa (2002).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 59 isolados bacterianos e 21 isolados fúngicos. Em geral o teste de quantificação da solubilização de CaHPO₄ pelas bactérias, apresentou resultados positivos em relação ao controle (Tabela 1) para Serra de Caldas e Pantanal. Os valores observados para bactérias foram sempre superiores aos observados para fungos. Todos os isolados de bactérias do Cerrado e Pantanal reduziram o pH do meio, em relação ao controle sem inoculação. Este resultado demonstra que as bactérias em questão são capazes de solubilizar eficientemente CaHPO₄ (Tabela 1). A acidificação do meio de cultura pelos isolados pode ser atribuída à produção de ácidos orgânicos pelas bactérias (SILVA et al., 2018).

Tabela 1. Solubilização de CaHPO₄ e pH por bactérias endofíticas radiculares e rizosféricas de *Hymenaea courbaril* do Pantanal - MS e Serra de Caldas - GO.

Isolados	Pantanal - MS			Isolados	Serra de Caldas - GO		
	Endofíticos/ Rizosféricos	P solúvel (mg L ⁻¹) ⁻¹	pH		Endofíticos/ Rizosféricos	P solúvel (mg L ⁻¹) ⁻¹	pH
HPAB1	Endofíticos	6,155 a	4,240 c	HSCB1	Endofíticos	6,710 a	4,993 b
HPAB2	Endofíticos	6,415 a	4,673 c	HSCB2	Endofíticos	6,060 a	4,887 c
HPAB3	Endofíticos	6,047 a	6,963 a	HSCB3	Endofíticos	6,225 a	5,047 b
HPAB4	Endofíticos	6,399 a	5,880 b	HSCB4	Endofíticos	6,160 a	5,207 b
HPAB5	Endofíticos	6,254 a	5,840 b	HSCB5	Endofíticos	6,165 a	4,963 b
HPAB6	Endofíticos	6,328 a	4,990 c	HSCB6	Endofíticos	6,291 a	4,747 c
HPAB7	Endofíticos	6,082 a	4,973 c	HSCB7	Endofíticos	6,561 a	4,990 b
HPAB8	Endofíticos	5,995 a	4,990 c	HSCB8	Endofíticos	6,351 a	5,250 b
HPAB9	Endofíticos	5,867 a	4,717 c	HSCB9	Endofíticos	-----	-----
HPAB10	Endofíticos	5,727 a	4,830 c	HSCB10	Rizosféricos	6,359 a	4,827 c
HPAB11	Endofíticos	5,865 a	4,893 c	HSCB11	Rizosféricos	6,826 a	4,570 c
HPAB12	Rizosféricos	6,174 a	5,250 c	HSCB12	Rizosféricos	6,738 a	4,530 c
HPAB13	Rizosféricos	-----	-----	HSCB13	Rizosféricos	6,613 a	4,563 c
HPAB14	Rizosféricos	-----	-----	HSCB14	Rizosféricos	6,671 a	4,683 c
HPAB15	Rizosféricos	6,909 a	6,077 b	HSCB15	Rizosféricos	6,525 a	5,053 b
HPAB16	Rizosféricos	6,804 a	6,267 b	HSCB16	Rizosféricos	6,740 a	4,610 c
HPAB17	Rizosféricos	6,639 a	5,247 c	HSCB17	Rizosféricos	6,807 a	4,715 c
HPAB18	Rizosféricos	6,552 a	5,117 c	HSCB18	Rizosféricos	6,673 a	4,747 c
HPAB19	Rizosféricos	6,168 a	5,593 b	HSCB19	Rizosféricos	6,544 a	4,773 c
HPAB20	Rizosféricos	-----	-----	HSCB20	Rizosféricos	6,616 a	5,530 b

HPAB21	Rizosféricos	5,458 a	5,463 b	HSCB21	Rizosféricos	6,968 a	4,607 c
HPAB22	Rizosféricos	6,261 a	5,503 b	-----	-----	-----	-----
HPAB23	Rizosféricos	6,275 a	5,090 c	-----	-----	-----	-----
HPAB24	Rizosféricos	5,893 a	5,707 b	-----	-----	-----	-----
HPAB25	Rizosféricos	5,681 a	5,040 c	-----	-----	-----	-----
HPAB26	Rizosféricos	5,458 a	5,063 c	-----	-----	-----	-----
HPAB27	Rizosféricos	6,010 a	4,835 c	-----	-----	-----	-----
HPAB28	Rizosféricos	6,177 a	5,340 c	-----	-----	-----	-----
HPAB29	Rizosféricos	6,130 a	4,920 c	-----	-----	-----	-----
HPAB30	Rizosféricos	5,923 a	4,950 c	-----	-----	-----	-----
HPAB31	Rizosféricos	5,899 a	5,330 c	-----	-----	-----	-----
HPAB32	Rizosféricos	6,758 a	4,653 c	-----	-----	-----	-----
HPAB33	Rizosféricos	6,044 a	5,620 c	-----	-----	-----	-----
HPAB34	Rizosféricos	5,884 a	4,730 a	-----	-----	-----	-----
HPAB35	Rizosféricos	5,837 a	6,087 b	-----	-----	-----	-----
HPAB36	Rizosféricos	4,957 a	6,253 b	-----	-----	-----	-----
HPAB37	Rizosféricos	6,158 a	4,460 c	-----	-----	-----	-----
HPAB38	Rizosféricos	6,047 a	5,463 c	-----	-----	-----	-----
Controle		0,790 b	6,833 a	Controle		0,718 b	6,833 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Nos isolados da Serra de Caldas, a maior eficiência de solubilização foi observada para os fungos HSCF13 (1,798 mg L⁻¹) e HSCF14 (1,959 mg L⁻¹) quando comparados ao controle (0,356 mg L⁻¹) (Tabela 2). Para o Pantanal, todos os fungos foram capazes de solubilizar CaHPO₄, destacando-se HPAF2, com maior índice de solubilização (1,057 mg L⁻¹, respectivamente). Independentemente do local de amostragem, os isolados fúngicos, reduziram o pH do meio líquido com CaHPO₄ em relação ao controle (Tabela 2). Jacobs e colaboradores (2002), explicaram que a redução do pH durante a solubilização de fosfatos é provavelmente causada pela liberação de ácidos orgânicos pelas hifas fúngicas.

Tabela 2. Solubilização de CaHPO₄ e pH por fungos endofíticos radiculares e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* do Pantanal - MS e Serra de Caldas - GO.

Isolados	Serra de Caldas - GO			Isolados	Pantanal - MS		
	Endofíticos/ Rizosféricos	P solúvel (mg L ⁻¹) ¹	p H		Endofíticos/ Rizosféricos	P solúvel (mg L ⁻¹) ¹	pH
HSCF1	Endofíticos	1,439 b	5,493 c	HPAF1	Endofíticos	0,771 b	5,187 d
HSCF2	Endofíticos	1,248 b	6,440 b	HPAF2	Endofíticos	1,057 a	5,193 d
HSCF3	Endofíticos	1,313 b	6,353 b	HPAF3	Endofíticos	0,812 c	4,923 d
HSCF4	Rizosféricos	1,190 b	5,213 d	HPAF4	Endofíticos	0,727 d	5,480 c
HSCF5	Rizosféricos	1,233 b	5,667 c	HPAF5	Endofíticos	0,881 d	6,063 b
HSCF6	Rizosféricos	1,224 b	5,753 c	HPAF6	Endofíticos	0,557 d	5,193 c
HSCF7	Rizosféricos	1,224 b	4,427 e	-----	-----	-----	-----
HSCF8	Rizosféricos	0,430 c	4,403 e	-----	-----	-----	-----
HSCF9	Rizosféricos	0,532 c	5,823 b	-----	-----	-----	-----
HSCF10	Rizosféricos	1,182 b	5,400 d	-----	-----	-----	-----
HSCF11	Rizosféricos	1,111 b	4,763 e	-----	-----	-----	-----
HSCF12	Rizosféricos	1,083 b	5,977 b	-----	-----	-----	-----

HSCF13	Rizosféricos	1,798 a	4,843 e	-----	-----	-----	-----
HSCF14	Rizosféricos	1,959 a	5,817 e	-----	-----	-----	-----
HSCF15	Rizosféricos	0,655 c	5,833 c	-----	-----	-----	-----
Controle		0,356 c	6,833 a	Controle		0,356 e	6,833 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Conclusão

Conclui-se que os microrganismos endofíticos radiculares e rizosféricos, oriundos de *Hymenaea courbaril* do bioma Cerrado e Pantanal, possuem grande potencial para solubilização de CaHPO₄ in vitro, levantando perspectivas para testes em campo, com as linhagens avaliadas, visando a promoção do crescimento vegetal.

Referências Bibliográficas

- ALORI, E.T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**. 8: 1664-302. 2017.
- ANZUAY, M.S., O. FROLA, J.G. ANGELINI, L.M. LUDUENA, A. FABRA, AND T. TAURIAN. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. **Symbiosis** 60: 143-154. 2013.
- BALDANI, J.I., AND V.L.D. BALDANI. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77: 549-579. 2005.
- CHANG, Y.-C., Y.-C. CHANG, R. BAKER, O. KLEIFELD, AND I. CHET. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease** 70: 145-148. 1986.
- GADAGI, R. S.; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p.615-618, 2002.
- JACOBS H, BOSWELL GP, RITZ K, FORDYCE AD, GADD GM. Solubilization of calcium phosphate as a consequence of carbon translocation by *Rhizoctonia solani*. **FEMS MicrobiolEco**, 140:65–71, 2002.
- PARMAR, H.J., N.P. BODAR, H.N. LAKHANI, S.V. PATEL, V.V. UMRANIA, AND M.M. Hassan. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut. **African Journal of Microbiology Research** 9(6): 365-372. 2015.
- PETRINI, O., AND E. MULLER. 1986. Haupt und nebenfruchtformen europaischer pilze. **Mycologia Helvetica** 1: 501-627.
- SILVA, CF; VITORINO, LC; SOARES, MA ; SOUCHIE, EL . Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butia purpurascens* roots for promoting plant growth. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology**, v. 1, p. 1-18, 2018.

TALLAPRAGADA, P. E GUDIMI, M. Solubilidade em fosfato e atividade de biocontrole de *Trichoderma harzianum* . **Turco. J. Biol.** 35, 593-600. 2011.

VITORINO, L.C., F.G. SILVA, M.A. SOARES, E.L. SOUCHIE, A.C. COSTA, AND W.C LIMA. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnology** 3: 47-54. 2012.