

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO SOB ROTAÇÃO
E SEQUÊNCIAS DE CULTURAS EM SEMEADURA DIRETA**

Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO SOB ROTAÇÃO
E SEQUÊNCIAS DE CULTURAS EM SEMEADURA DIRETA**

Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro

Orientador: Prof. Dr. Ely Nahas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Ciência do Solo).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro – 2011

C749a Cordeiro, Meire Aparecida Silvestrini
Atributos microbiológicos do solo sob rotação e sequências de
culturas em semeadura direta / Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro.
-- Jaboticabal, 2011
xiii, 119 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Ely Nahas
Banca examinadora: Fernando Dini Andreote, Marco Aurélio
Carbone Carneiro, Ana Maria Rodrigues Cassiolato, Renato de Mello
Prado.

Bibliografia

1. Solo-efeito rizosférico. 2. Atividade enzimática. 3. Plantas-
fungos-crescimento. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MEIRE APARECIDA SILVESTRINI CORDEIRO – nascida em 30 de julho de 1981, na cidade de Campo Mourão, PR. Em 2000, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Goiás/ Câmpus de Jataí, concluindo em dezembro de 2004. Foi estagiária do Laboratório de Solos de 2001 a 2004, sendo bolsista da ONG “The Nature Conservancy” de 2003 a 2004. Em agosto de 2005, iniciou o curso de mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Lavras, concluindo em julho de 2007, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento e Pesquisa (CAPES) nesse período. Em fevereiro de 2008, iniciou curso de Doutorado em Agronomia (Ciência do Solo) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista da CAPES de março de 2008 a fevereiro de 2009 e do CNPq de março de 2009 a junho de 2010. Em 2010 foi aprovada em concurso público junto à Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA), onde atua desde julho desse mesmo ano como Engenheiro Agrônomo/ Fiscal Estadual Agropecuário. Em 20 de dezembro de 2011, concluiu seu curso de Doutorado em Agronomia (Ciência do Solo) na UNESP/Jaboticabal.

A Deus acima de tudo, obrigada por todas as bênçãos que recebi para chegar até aqui.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Svirino, pela minha vida, pela minha educação, por todo amor e por serem meus maiores incentivadores. Obrigada é pouco por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus irmãos, Marley e Matheus por serem presentes, companheiros e pela torcida incondicional.

Aos meus sobrinhos, Bárbara e Joaquim (também afillhado) por me proporcionarem momentos felizes e me trazerem sempre um olhar inocente à vida.

DEDICO

Ao meu amado noivo, Dhayner, pelo amor a mim dedicado, pela paciência, por me incentivar e estar ao meu lado em todos os momentos (mesmo à distância).

Pelos inúmeros sacrifícios que fez em nome do nosso amor.

Muito obrigada!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, ao Programa em Agronomia (Ciência do Solo) e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado, a todos os professores e funcionários.

A CAPES e ao CNPq, pela concessão das bolsas de estudo.

Ao Professor Ely Nahas pela orientação, confiança, compreensão e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Manoel Evaristo Ferreira, Prof. Dr. João Antônio Galbiati, Prof. Dr. Jairo Osvaldo Gazetta e Profa. Dra. Martha Regina Lucizano Garcia.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, Profa. Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, Prof. Dr. Renato de Mello Prado e Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro pelas sugestões e correções da tese.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio por fazer parte da minha vida acadêmica, por me acompanhar desde a iniciação científica, pela amizade e a confiança a mim sempre dispensadas, ao senhor meu sincero respeito.

Ao nosso querido laboratorista, Luiz Carlos Assis pela sua preciosa ajuda, força e ensinamentos na rotina do laboratório.

A Édna, pela sua disponibilidade, pelos conselhos, amizade e principalmente pela vontade de ajudar e simplificar nosso caminho sempre.

A Rosângela por manter nosso ambiente arrumado, pela atenção e cafezinho de cada dia.

As amigas de república Rafaela e Greicy pelo bom convívio, amizade e aprendizagem.

A minha amiga Ludmilla Cavallari por todos os momentos compartilhados, pela amizade e pelo acolhimento nas minhas voltas à Jaboticabal.

A amiga e parceira Rose Tavares, obrigada pela sua amizade, companhia e carinho. Assim como os demais amigos de laboratório: Beatriz, Breno, Rosângela,

Bruno e Elaine, obrigada pela ajuda no dia-a-dia, pela amizade e por tornar meus dias melhores em Jaboticabal.

A AGRODEFESA e colegas de trabalho pela compreensão e ajuda nas minhas ausências.

A toda minha família e amigos por torcerem sempre por mim.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Sistemas conservacionistas de semeadura.....	3
2.2. Efeito rizosférico.....	4
2.3. Enzimas do solo.....	5
2.4. Quantificação de microrganismos do solo.....	6
2.5. Habilidade metabólica de fungos/ Fungos promotores de crescimento de plantas (FPCP).....	8
2.5.1. Produção de ácido indolacético.....	9
2.5.2. Produção de substâncias antagônicas (biocontrole).....	10
2.5.3. Solubilização de fosfatos.....	11
2.5.4. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Caracterização da área experimental e manejo cultural.....	14
3.2. Delineamento experimental e análise estatística.....	18
3.3. Amostragem e tratamento das amostras de solo.....	19
3.4. Experimento 1 - Análises bioquímicas e químicas do solo.....	19
3.4.1. Atividade da amilase.....	19
3.4.2. Atividade da urease.....	20
3.4.3. Atividade da CMC-celulase.....	21
3.4.4. Atividade da protease.....	21
3.4.5. Carbono orgânico total.....	22
3.4.6. Carboidratos totais.....	22
3.4.7. Proteínas totais.....	23
3.5. Experimento 2- Habilidade metabólica dos fungos rizosféricos	24

	x
3.5.1. Contagem de bactérias e fungos.....	24
3.5.2. Isolamento de fungos.....	25
3.5.3. Manutenção dos isolados de fungos.....	25
3.5.4. Atividade amilolítica.....	25
3.5.5. Atividade ureolítica.....	26
3.5.6. Atividade celulolítica.....	26
3.5.7. Atividade proteolítica.....	27
3.5.8. Atividade quitinolítica.....	28
3.5.9. Solubilização de fosfato.....	29
3.5.10. Produção de ácido indolacético (AIA).....	30
3.5.11. Produção de ácido cianídrico (HCN).....	30
3.5.12. Produção de sideróforos.....	31
3.5.13. Colonização micorrízica.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Experimento 1 - Análises bioquímicas e químicas do solo.....	34
4.2. Experimento 2 - Habilidade metabólica dos fungos rizosféricos.....	45
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1. Experimento 1 - Análises bioquímicas e químicas do solo.....	62
5.2. Experimento 2 - Habilidade metabólica dos fungos rizosféricos.....	65
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. APÊNDICE.....	94

ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO SOB ROTAÇÃO E SEQUÊNCIAS DE CULTURAS EM SEMEADURA DIRETA

RESUMO – Sistemas conservacionistas favorecem as populações microbianas em função da conservação e do aumento da matéria orgânica no solo. As plantas desses sistemas favorecem o crescimento dos microrganismos principalmente pela influência das raízes, através do efeito rizosférico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da rotação de culturas inverno (milho, girassol e guandu) e sequências de verão (soja/milho, milho/milho e soja/soja), em um sistema de semeadura direta, na atividade enzimática e atributos químicos em solo rizosférico e não rizosférico; na contagem dos fungos e bactérias do solo rizosférico e não rizosférico; e na habilidade metabólica dos fungos isolados do solo rizosférico atribuída à promoção de crescimento de plantas. O estudo foi realizado na safra de inverno de 2008 de uma área experimental com sistema de semeadura direta e rotação de culturas, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/FCAV/UNESP de Jaboticabal. O delineamento experimental foi em blocos casualizados no esquema de faixas e três repetições. As culturas de inverno: milho (*Zea mays* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.) e guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), foram rotacionadas com sobre as sequências de verão: soja/soja (*Glycine Max* L.), milho/milho e soja/milho. Foram conduzidos dois experimentos, no Experimento 1, foram coletadas amostras de solo rizosférico (SR- solo aderido às raízes das plantas) e solo não rizosférico (SNR- solo da entrelinha de plantio) das culturas de inverno, totalizando assim 18 tratamentos (3 culturas de inverno x 3 sequências de verão x 2 posições de coleta no solo). Para o Experimento 2, foi utilizado o SR das culturas de inverno e as sequências de verão (3 x 3), totalizando 9 tratamentos. Experimento 1: as atividades da amilase, CMC-celulase, protease e urease do SR foram 16, 85, 62 e 100% maiores do que o do SNR e os conteúdos de carbono orgânico total e de proteínas totais ambos foram 21% maiores. Dentre as culturas de inverno, o milho estimulou mais as atividades das enzimas amilase, CMC-celulase, urease e protease do SR do que as outras culturas. De modo geral, os teores de proteínas totais não foram influenciados pelas culturas de inverno e nem pelas sequências de verão; os

conteúdos de carboidratos totais foram maiores no SR da culturas de inverno milho e girassol e o carbono orgânico total foi influenciado apenas pela sequência de verão milho/milho. Experimento 2: as médias das contagens dos fungos foram de $11,22 \times 10^5$ ufc g^{-1} de solo seco e das bactérias de $19,29 \times 10^6$ ufc g^{-1} solo seco. As sequências de verão não influenciaram essas contagens. O SR da cultura de inverno milho promoveu as maiores contagens tanto de fungos como nas de bactérias em relação às demais culturas. Dos 501 isolados avaliados, mais de 90% apresentaram habilidade metabólica em no mínimo uma das atividades avaliadas. Observou-se maior frequência de fungos celulolíticos do que os demais grupos, decrescendo na seguinte ordem: celulolíticos (61%), produtores de sideróforos (48%), amilolíticos (47%), ureolíticos (45%), proteolíticos (42%), solubilizadores de fosfato (39%), produtores de AIA (19%), produtores de HCN (11%) e quitinolíticos (2,8%). A colonização micorrízica das raízes de milho, girassol e guandu não diferiram entre si, com média de 51%. Pôde-se concluir que a atividade enzimática e atributos químicos do solo avaliados foram aumentados no solo rizosférico em relação ao não rizosférico e grande diversidade nas funções metabólicas dos fungos isolados do solo rizosférico, relacionadas à promoção de crescimento de plantas, foram observadas.

Palavras-chave: efeito rizosférico, atividade enzimática, fungos promotores de crescimento de plantas, contagem de fungos e bactérias

ATTRIBUTES OF SOIL MICROBIOLOGY WITH ROTATION AND SEQUENCES OF CULTURES IN A NO-TILLAGE SYSTEM

ABSTRACT- Self-sustaining systems support microbial populations by conserving and increasing organic matter in the soil. Furthermore, plants help increase the microbial population, due to the influence of roots through the rhizosphere effect. This study evaluated the effect of winter crop rotation and summer sequences in no-tillage system on biochemical and chemical attributes; the count of total bacteria and total fungi in rhizospheric (RS) and non-rhizospheric soil (NRS); and metabolic ability of fungi isolated from the rhizospheric soil that were promoted by plant growth. This study was conducted in the winter crop of 2008 in an experimental area with no-tillage and crop rotation at the Collage of Agriculture and Veterinary Sciences / FCAV / UNESP Jaboticabal. The experimental design was randomized block scheme of plots and three repetitions. Winter crops: corn (*Zea mays* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), and pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) were rotated with summer sequences: soybean/soybean (*Glycine max* L.), corn/corn, and soybean/corn. Two experiments were conducted. In Experiment 1, samples were collected from rhizosphere soil (RS-soil adhering to plant roots) and non-rhizosphere soil (NRS- soil between rows of planting) of winter crops, totaling 18 treatments (3 winter crops x 3 summer sequences x 2 collect position of soil). For Experiment 2, the RS of winter crops were used and summer sequences (3 x 3), totaling nine treatments. Experiment 1: The activities of amylase, cellulase, protease, and urease in RS were 16, 85, 62, and 100% higher than in the NRS, respectively, while total organic carbon and protein were 21% higher in RS. Among the winter crops, corn stimulated higher activities of amylase, cellulase, protease, and urease in RS than other cultures. A similar effect was also observed with the activity of amylase, protease, and urease in NRS. In general, the levels of total protein were not affected by winter crops or the summer sequences. The total carbohydrates were influenced by winter crops of corn and sunflower, and the total organic carbon was only influenced after the corn/corn summer sequence. Experiment 2: the mean of total fungal counts of was 11.22×10^5 CFU g⁻¹ in dry soil and total bacteria were 19.29×10^6 CFU g⁻¹ in dry soil. The summer

sequences did not influence these numbers. The RS of the winter corn crop produced the highest scores of both total fungi and bacteria in relation to other cultures. Of the 501 isolates, 90% had metabolic ability in at least one of the activities evaluated. A higher frequency of cellulolytic fungi than the other groups was observed, decreasing in the following order: cellulolytic (61%), siderophore producer (48%), amylolytic (47%), ureolytic (45%), proteolytic (42%), solubilizing phosphate (39%), IAA producer (19%), HCN producer (11%), and chitinolytic (2.8%). The mycorrhizal colonization roots of corn, sunflower, and pigeonpea did not differ, averaging 51%. In conclusion, the biochemical and chemical attributes evaluated were increased in RS compared to NRS, and large diverse metabolic functions of fungi isolated from RS, related to the promotion of plant growth, were observed.

Key-words: rhizosphere effect, enzyme activity, plant growth promoting fungi, fungi and bacteria counts.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas do setor agrícola têm buscado estratégias de manejo para o máximo aproveitamento dos recursos de produção e, ao mesmo tempo, a sustentabilidade baseando-se na proteção ambiental. Efeitos desfavoráveis como erosão, degradação de agregados de solo, perda de matéria orgânica e redução nas comunidades de organismos do solo podem ser evitadas pelo emprego de sistemas conservacionistas como o sistema de semeadura direta e a rotação de culturas. A rotação de culturas se baseia na alternância de diferentes espécies de plantas em um mesmo terreno visando à melhoria das condições físicas, químicas e microbiológicas do solo, não apenas de modo imediato, mas principalmente ao longo do tempo. Sistemas de cultivo que envolvem a rotação de culturas e o manejo mínimo do solo são requisitos necessários para uma agricultura sustentável.

Os microrganismos do solo aumentam e se diversificam nos sistemas conservacionistas, sendo muito importantes para a qualidade do solo, participando das transformações da matéria orgânica e dos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes. As plantas exercem influência decisiva nesse aumento e diversidade das populações microbianas, devido aos restos de cultura ou à zona de influência das raízes.

O solo rizosférico, contíguo à raiz, diferencia-se do solo não rizosférico devido à influência direta física, química e biológica. O efeito rizosférico é medido pela relação entre os atributos do solo rizosférico e o solo não rizosférico, e está relacionado com a espécie de planta e as características ambientais. O efeito rizosférico pode favorecer o aumento da atividade microbiana e modificação da comunidade microbiana na rizosfera devido à produção de secreções e exsudados orgânicos solúveis prontamente utilizáveis pelos microrganismos.

O solo rizosférico e o solo não rizosférico estão sujeitos à influência das diferentes plantas e das condições de manejo do solo. Esse efeito pode ser medido pela quantificação dos grupos funcionais de microrganismos no ambiente rizosférico, bem como pela atividade microbiana utilizando-se as enzimas que participam do ciclo do carbono e nitrogênio. Em adição, o carbono orgânico total, o teor de carboidratos e o teor de proteínas totais do solo rizosférico e do solo não rizosférico podem fornecer

informações sobre as alterações nos processos metabólicos contribuindo para uma melhor compreensão sobre os efeitos das práticas de manejo e uso empregadas no solo.

A habilidade metabólica dos fungos saprofitos da rizosfera atribuída à promoção do crescimento de plantas é outro aspecto importante a ser investigado, visto ser um assunto ainda pouco explorado na literatura, onde há muitas pesquisas em relação às rizobactérias e aos fungos micorrízicos arbusculares.

A atuação dos fungos na promoção de crescimento de plantas pode ocorrer de forma direta através da produção de substâncias como o hormônio ácido indolacético que é uma auxina que atua no crescimento vegetal; ou de forma indireta, através da solubilização de nutrientes no solo, como a solubilização de fosfatos inorgânicos, e ainda pela ação antagonista através da produção de substâncias pelos fungos. Entre essas substâncias, destacam-se as enzimas decompositoras como protease, celulase e quitinase, e os compostos que impedem o desenvolvimento dos microrganismos patogênicos, controlando-os no solo, como o ácido cianídrico e os sideróforos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da rotação de culturas inverno (milho, girassol e guandu) e sequências de verão (soja/milho, milho/milho e soja/soja) em um sistema de semeadura direta na:

- 1) atividade enzimática e atributos químicos em solo rizosférico e não rizosférico;
- 2) contagem dos fungos e bactérias totais do solo rizosférico e não rizosférico; e
- 3) habilidade metabólica dos fungos isolados do solo rizosférico atribuída à promoção de crescimento de plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SISTEMAS CONSERVACIONISTAS DE SEMEADURA

Visando à melhoria das características e propriedades naturais do solo e objetivando menor manipulação do mesmo, inúmeras técnicas alternativas têm sido adotadas que contribuem para o aumento da matéria orgânica do solo e melhoria da fertilidade, incluindo rotação de culturas, manutenção dos resíduos de plantas e utilização de fertilizantes orgânicos (BORIE et al., 2006).

As técnicas de manejo agrícola podem ter impacto na quantidade e diversidade microbiana e podem se refletir na sustentabilidade e produtividade das plantas. Portanto, práticas que envolvem o mínimo de distúrbios no solo têm sido conduzidas de modo a reduzir os efeitos sobre as propriedades físicas como o conteúdo de água, temperatura e aeração do solo (KLEIN et al., 2008). Desta forma, efeitos desfavoráveis, como erosão, degradação de agregados de solo, perda de matéria orgânica e redução nas comunidades de organismos do solo podem ser evitadas pelo emprego de sistemas de semeadura direta (BORIE et al., 2006). A rotação de culturas, fazendo parte do sistema de semeadura direta, promove mudanças na qualidade e quantidade de resíduos comparada aos monocultivos, altera a biomassa microbiana e a dinâmica da comunidade microbiana afetando a ciclagem de carbono e nitrogênio por meio de mudanças na decomposição dos resíduos vegetais (WRIGHT et al., 2008).

Os microrganismos têm um papel importante na ciclagem de nutrientes e na nutrição das plantas. Desta forma, sistemas que favoreçam a conservação e aumento da matéria orgânica como do plantio direto tendem a aumentar as populações microbianas e como efeito o desenvolvimento das plantas (DORAN et al., 1998). A matéria orgânica tem uma função importante no aumento, diversidade e atividade microbiana sendo esse efeito reduzido em condições limitantes de carbono (GARCIA & NAHAS, 2007). O número e a atividade dos microrganismos são favorecidos por fatores do ambiente como tipo de solo, fertilidade, pH e umidade, e fatores da planta, como espécie e idade (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007).

2.2. EFEITO RIZOSFÉRICO

Como estímulo ao crescimento da comunidade de microrganismos, a produtividade é aumentada devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes de fontes orgânicas ou inorgânicas antes indisponíveis. Como consequência, as plantas exercem influência decisiva no aumento e diversidade microbiana, devido aos restos de cultura ou à zona de influência das raízes. O termo rizosfera tem sido atribuído a HILTNER (1904) e caracteriza a região do solo contígua à raiz e, devido à influência direta física, química e biológica da raiz, diferencia-se da região não rizosférica.

O ambiente da rizosfera é bastante complexo resultante da liberação de células, mucilagens, exsudados e lisados que contém aminoácidos, proteínas, açúcares, carboidratos complexos, álcoois, vitaminas e hormônios (NANNIPIERE et al., 2007). Dependendo da idade e estado fisiológico da planta e das condições do ambiente, mais de 20% do peso seco da planta é liberado pelas raízes (KLUEPFEL, 1993). Na rizosfera, os microrganismos desempenham importante papel nos sistemas naturais e agrícolas, já que participam das transformações da matéria orgânica e dos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes (ANDRADE, 1999). O número de microrganismos nos solos rizosféricos é normalmente de 5 a 20 vezes maior que naqueles não rizosféricos, mas pode chegar a mais de 100 (ANDERSON et al., 1993). NAHAS et. al (1997) verificaram que o número de microrganismos na rizosfera foi de 5 a 251 % superior ao do não rizosfera.

O efeito rizosférico é medido pela relação entre os parâmetros destas duas regiões: solo rizosférico e não rizosférico. O efeito rizosférico é o aumento da atividade microbiana e modificação da comunidade microbiana na rizosfera, devido à produção de secreções e exsudados orgânicos solúveis prontamente utilizáveis pelos organismos (DAANE et al., 2001), o qual é também causado pela ação direta de enzimas derivadas das raízes e por diversas ações indiretas, como a maior aeração do solo em função da distribuição das raízes (HERMAN et al., 2006). Na rizosfera são produzidas também polissacarídeos de alta viscosidade que auxiliam na agregação e estabilidade dos agregados, influenciando diretamente a microbiota (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), cuja composição da comunidade rizosférica é formada por grupos com diferentes tipos

de metabolismo e respostas adaptativas a variações das condições ambientais (DAANE et al., 2001).

Os exsudados radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato. Por sua vez, os microrganismos influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudados radiculares, por meio de seus efeitos no metabolismo das células da raiz, bem como no estado nutricional das plantas (YANG & CROWLEY, 2000).

Os microrganismos da rizosfera, por sua vez, podem aumentar a produção de exsudados em mais que 100% através da produção de reguladores de plantas, vitaminas, toxinas, enzimas celulolíticas ou outros compostos ou pela alteração da disponibilidade de nutrientes (KLUEPFEL, 1993).

2.3. ENZIMAS DO SOLO

A comunidade rizosférica é formada por microrganismos com diferentes tipos de metabolismo e respostas adaptativas a variações em função do tipo de solo, espécie de plantas, estado nutricional, idade, estresse, doenças, dentre outros fatores (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007). O ensaio de uma variedade de enzimas do solo dá uma indicação da diversidade de funções que pode ser assumida pela comunidade microbiana (CLAASENS et al., 2008).

As enzimas do solo são utilizadas como parâmetro para medir a qualidade do solo por serem sensíveis ao seu manejo e por estarem diretamente relacionadas com as transformações dos nutrientes (YANG et al., 2008) e da comunidade microbiana (ARAÚJO et al., 2007). A quantificação da atividade enzimática do solo pode fornecer informações sobre as alterações nos processos metabólicos contribuindo para uma melhor compreensão sobre os efeitos das práticas de manejo e uso empregadas no solo (CARNEIRO et al., 2008). Sistemas considerados conservacionistas, como o

plântio direto, apresentam maiores valores de atividade enzimática quando se compara a sistemas convencionais (CARNEIRO, et al. 2008).

As enzimas de interesse na ciclagem de nutrientes são aquelas que hidrolisam os constituintes da matéria orgânica do solo, servindo de fonte de energia como a celulase e a amilase (ciclo do C), a protease e a uréase (ciclo no N). A celulase promove a hidrólise da celulose que é a mais abundante estrutura polissacarídica da parede celular da planta sendo importante na degradação de resíduos vegetais e indicadora da ciclagem de carbono (SHAN et al., 2008). A amilase é uma enzima amplamente produzida pelos microrganismos que catalisa a hidrólise do amido, sendo muito importante na ciclagem de carbono no solo.

As enzimas urease e protease participam do ciclo do nitrogênio, sendo a primeira envolvida no fornecimento de nitrogênio às plantas, pois participa de forma direta na hidrólise da ureia que é um fertilizante amplamente utilizado na agricultura (MAKOI & NDAKIDEMI, 2008). Já a protease promove a mineralização do nitrogênio orgânico dos compostos orgânicos (MONDINI et al., 2008).

2.4. QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO

O cultivo de microrganismos em meios nutritivos não representa o número real de microrganismos no solo, pois estima-se que apenas 1% dos organismos do solo seja cultivável, ou seja, apresentam crescimento em meio de cultura. Porém, as contagens de grupos de microrganismos em meio de cultura são ferramentas úteis em estudos comparativos ou para microrganismos específicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo sendo sua quantificação importante, pois dá a indicação de como estes processos estão ocorrendo (MELLONI et al., 2001). A quantificação de grupos microbianos do solo, como solubilizadores de fosfato, microrganismos celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos, ureolíticos, entre outros, pode fornecer informações importantes sobre processos de mineralização, degradação e solubilização de elementos e componentes do solo.

A diversidade de espécies (genética) de uma comunidade microbiana também ocasiona diversidade funcional, ou seja, a mesma função é executada por diferentes espécies, o que é denominado redundância funcional. Além disso, uma mesma espécie pode ter várias funções (cada espécie participa de diferentes processos). A redundância contribui para a estabilidade dos ecossistemas do solo. Assim, solos com comunidade diversa de organismos são mais resilientes, ou seja, recuperam-se melhor dos estresses porque, quando condições ambientais tornarem adversas para uma ou mais populações com a mesma função outras populações adaptadas àquela nova condição ambiental poderão substituí-las na realização do mesmo processo, que assim terá continuidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os efeitos das mudanças do uso do solo, como a remoção da vegetação nativa para a introdução de cultivos ou a formação de pastagens, sobre a diversidade microbiana têm sido demonstrados sistematicamente para alguns grupos de microrganismos (TÓTOLA & CHAER, 2002). Essas práticas provocam alterações na composição de espécies vegetais, nos níveis de matéria orgânica e de nutrientes, conseqüentemente na estrutura da comunidade microbiana, podendo causar danos à biodiversidade do solo (TÓTOLA & CHAER, 2002).

A camada superficial do solo é considerada o principal reservatório de microrganismos e qualquer fator que exerça impacto sobre esta, poderá exercer influência significativa na ecologia e nas funções dos microrganismos (HABTE et al., 1988). Desse modo, diferentes sistemas de manejo do solo podem exercer grande influência nos microrganismos e seus processos (MELLONI et al., 2001).

A semeadura direta proporciona um ambiente mais favorável à ocorrência de fungos na camada superficial. A maior influência da semeadura direta ocorre próximo à superfície do solo onde a palhada permanece após o ciclo das plantas de cobertura principal. Esse ambiente é propício aos fungos decompositores primários de resíduos vegetais na superfície do solo, especialmente em condições de baixa umidade (CARNEIRO et al., 2004).

2.5. HABILIDADE METABÓLICA DE FUNGOS/ FUNGOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (FPCP)

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) têm sido bastante estudadas (van LOON, 2007) destacando-se as fixadoras biológicas de nitrogênio atmosférico (FBN) que representam uma grande economia para agricultura pelo suprimento do nitrogênio nas leguminosas, além de não promover impacto ambiental devido seus mecanismos naturais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Quanto aos fungos promotores de crescimento de plantas (FPCP) destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que também são amplamente estudados e importantes na agricultura pelo aproveitamento dos fertilizantes fosfatados, entre outros benefícios (MIRANDA & MIRANDA, 2007). Porém, alguns fungos sapróbios não patogênicos do solo têm sido relatados por seus benefícios no crescimento e também pela proteção às doenças em plantas sendo considerados como FPCP (CHANDANIE et al., 2006).

Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Phoma* têm sido considerados como FPCP por diversos autores em diferentes trabalhos (MEERA et al., 1994; HYAKUMACHI, 1994; CHANDANIE et al., 2006; HORINOUCI et al., 2008; VINALE et al., 2008).

O mecanismo pelo qual os FPCP promovem o crescimento das plantas é algo ainda não entendido completamente, mas incluem efeitos diretos como a habilidade de produzir ou alterar a concentração de hormônios na planta como ácido indolacético (AIA), giberelina, citocinina e etileno que causam efeitos benéficos no seu crescimento como o desenvolvimento da parte aérea, aumento do crescimento de raízes e número de pêlos radiculares absorventes (CATTELAN, 1999; VINALE et al., 2008). Também incluem efeitos indiretos como: a) a solubilização de fosfatos e de outros elementos, aumentando a disponibilidade de nutrientes no solo e b) o efeito antagônico a microrganismos fitopatogênicos por meio da produção de metabólitos como sideróforos, ácido cianídrico e antibióticos (VINALE et al., 2008) e enzimas que atuam na lise de células fúngicas como as quitinases, β -1,3 glucanases, proteases e lipases (OLIVEIRA et al., 2003).

2.5.1. Produção de ácido indolacético (AIA)

A promoção de crescimento de plantas por bactérias e por fungos pode envolver entre outros a produção de hormônios vegetais ou promover a alteração destes hormônios nas plantas (MELO, 1996).

Os hormônios vegetais são substâncias orgânicas biologicamente ativas produzidas nas células vegetais com funções morfológicas e fisiológicas nas plantas como: divisão, crescimento e diferenciação celular, regulação de crescimento, floração e ciclo celular, proteção a estresses e injúrias, desenvolvimento, dormência e senescência de sementes, indução floral, epinastia de folhas, amadurecimento de frutos entre outras (KERBAUY, 2004). Dentre os hormônios estão às auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno, além dos jasmonatos e do ácido salicílico e muitas desses estão relacionadas com fungos.

O ácido indolacético (AIA) é a principal auxina encontrada nas plantas e relatos da produção desse hormônio por fungos datam da década de 30, onde THIMANN (1935) relata que em estudos do crescimento de *Avena*, Nielsen em 1930 e Dolk & Thimann em 1932, verificaram a produção de AIA pelo fungo *Rhizopus suinus*.

HASAN (2002) em estudo com fungos isolados da rizosfera de diferentes plantas na produção de giberelina e AIA, verificou que o fungo *Fusarium oxysporum* se destacou na produção desses hormônios. FURUKAWA & SYONO (1998) verificaram a produção de AIA por *Rhizoctonia solani* em estudo onde foram inoculados esses fungos em células de arroz em suspensão.

Através da produção de fitohormônios, os microrganismos podem promover um estímulo ao crescimento vegetal, além de aumentar a produção de metabólitos pelas plantas que podem ser utilizados para o seu próprio crescimento (HASAN, 2002). A capacidade dos microrganismos produzirem auxinas está relacionada a fatores de patogenicidade e de estímulos ao crescimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2003).

2.5.2. Produção de substâncias antagônicas (biocontrole)

O antagonismo entre microrganismos é uma forma indireta de promoção de crescimento, onde fitopatógenos são eliminados através de metabólitos antifúngicos produzidos por microrganismos que sobrevivem no solo principalmente fungos e bactérias (VINALE et al., 2008; MELO, 1996). Dentre essas substâncias produzidas por fungos antagonistas destacam-se as enzimas degradadoras de parede celular como as quitinases, glucanases, celulases, proteases; e compostos como o ácido cianídrico (HCN) e sideróforos atuam no controle de microrganismos patogênicos.

Pesquisas têm demonstrado que alguns fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Phoma* isolados da rizosfera de plantas como pimenta, batata, trigo, milho e grama têm promovido o crescimento dessas plantas e suprimido várias doenças de solo através dos diferentes mecanismos de biocontrole (MEERA et al., 1994; HYAKUMACHI, 1994; HORINOUCI et al., 2008).

A enzima quitinase hidrolisa a quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, inferior apenas à celulose. A parede celular de fungos é constituída principalmente de quitina, proteínas e β 1,3-glucana, sendo assim a degradação do micélio têm sido associadas à quitinases, proteases e glucanases produzidas pelos microrganismos que atuam como agentes de biocontrole (OLIVEIRA et al., 2003). Alguns fungos, como os do gênero *Trichoderma*, desempenham atividade micoparasítica em patógenos através da habilidade de produzir enzimas que degradam esta barreira primária que é a parede celular (ALVARENGA et al., 2007).

Os sideróforos, definidos como ligantes específicos de Fe^{3+} , são amplamente produzidos por espécies aeróbicas onde desempenham a função de sequestrar e transportar Fe^{3+} . São quelantes de baixo peso molecular, excretados sob condições de deficiência de ferro por microrganismos dentre eles diversos fungos de solo (BENITE & MACHADO, 2002). A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos em solos em que o ferro disponível encontra-se em baixas concentrações (OBEREGGER et al., 2001). Os sideróforos produzidos por agentes de biocontrole sequestram o ferro do

ambiente, tornando-o indisponível aos fitopatógenos e/ou microrganismos deletérios, ocasionando, dessa forma, uma inibição no seu crescimento (CATTELAN, 1999).

O ácido cianídrico (HCN) é um potente inibidor de heme-proteínas, tais como as citocromo-oxidases e as cloreto-dismutase, que são enzimas envolvidas nos principais processos metabólicos, incluindo respiração e o transporte de elétrons, possibilitando o controle de microrganismos patogênicos (DEVI et al., 2007; SONG & LOGAN, 2004). KNOWLES (1976) relata que uma ampla gama de fungos produz HCN e que atua no controle de bactérias e outros fungos de solo, porém há poucos estudos explorando esse potencial nos fungos. Na literatura atual há uma variedade de estudos sobre a produção de HCN por rizobactérias do solo.

O biocontrole de patógenos de plantas tem sido bastante estudado, pois é uma alternativa atrativa para a forte dependência da agricultura moderna a pesticidas o que podem causar poluição ambiental, toxicação de homem e animais e o desenvolvimento de resistência dos patógenos a esses produtos (GRIGOLETTI Jr et al., 2000).

Apesar de muitos estudos destacarem uma grande variedade de agentes de biocontrole, no que se referem a fungos os relatos de espécies de *Trichoderma* são dominantes na literatura, talvez refletindo às facilidades de isolamento e quantificação de propágulos em meios de cultura, ao desenvolvimento de novas técnicas de sobrevivência e proliferação no solo e na rizosfera, à existência de novos biótipos resistentes a fungicidas e a sua gama de hospedeiros (WHIPPS, 2001; RESENDE et al., 2005).

2.5.3. Solubilização de fosfato

Outra forma de atuação indireta no crescimento de plantas promovido por fungos é a solubilização de nutrientes no solo, como a solubilização de fosfatos. Diversos microrganismos do solo têm a capacidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos inorgânicos, podendo contribuir para o aproveitamento de fontes menos solúveis (SILVA FILHO et al., 2001; NAHAS et al., 1994).

A utilização de microrganismos solubilizadores tem sido sugerida como alternativa para a solubilização dos fosfatos naturais, propiciando fosfato solúvel, além da necessidade dos mesmos, que é aproveitado pelas plantas (SILVA FILHO et al., 2002).

Com relação aos microrganismos solubilizadores, o número de bactérias é maior que o de fungos, porém os últimos são potencialmente mais promissores no processo de solubilização de fosfato (BARROTI & NAHAS, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Muitos fungos apresentam ação solubilizadora, como dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Humicola*, *Pythium*, *Acrothecium*, *Mortierella*, *Rhizoctonia* e *Cladosporium* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A grande maioria dos estudos, porém, destaca a maior eficiência de algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SILVA FILHO et al., 2002, NARLOCH et al., 2002; SOUCHIE & ABOUD, 2007).

Fungos envolvidos nos processos de solubilização do fósforo inorgânico excretam ácidos orgânicos que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato, a produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos é um dos mecanismos da solubilização (SILVA FILHO et al., 2002).

A população de microrganismos solubilizadores de fosfato e sua capacidade de solubilização estão intimamente relacionadas ao tipo e ao manejo do solo. SOUCHIE & ABOUD (2007) verificaram que determinadas combinações de solo e planta, possibilitam maiores números de solubilizadores. Nesse mesmo estudo, foi verificado que os fungos tiveram maior potencial na solubilização do fosfato natural de Araxá que as bactérias, e que dentre estes isolados, o gênero *Aspergillus* foram predominantes.

Em estudo da solubilização de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo, BARROTI & NAHAS (2000) verificaram que os fungos solubilizadores de fosfatos foram favorecidos principalmente na ausência de plantio ou da adubação fosfatada, também foram favorecidos na interação guandu e fosfato de rocha. CARNEIRO et al. (2004) estudando esses fungos sob plantio convencional e plantio direto no cerrado, verificaram que a ocorrência de fungos solubilizadores na camada

superficial das áreas de plantio direto foram superiores aos das áreas de plantio convencional, atribuindo tal resultado a palhada que permanece na superfície e propicia os fungos.

2.5.4. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Como já relatado anteriormente, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são habitantes da rizosfera das plantas, amplamente estudados e de grande importância na promoção do crescimento de plantas. Os FMA são simbiotróficos obrigatórios pertencentes ao filo Glomeromycota (SCHÜBLER et al., 2001) e ordem Glomerales que colonizam as raízes da maioria das plantas terrestres formando uma associação simbiótica mutualística denominada micorriza. Por meio dessa associação, o fungo recebe da planta fotoassimilados e transferem nutrientes e água da planta hospedeira, promovendo modificações fisiológicas, metabólicas e nutricionais na planta (SIQUEIRA, 1994). Os FMA, através de suas hifas, permitem a absorção de nutrientes fora do alcance das raízes, promovendo, portanto maior área de exploração do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Além disso, os FMA aumentam a atividade biológica em torno das raízes das plantas, como por exemplo, o favorecimento da nodulação e fixação biológica de nitrogênio nas leguminosas (JESUS et al., 2005), promovem maior tolerância às plantas a estresses ambientais como o estresse hídrico (PAULA & SIQUEIRA, 1987) e toxicidade de metais pesados (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

A maioria das plantas apresenta simbiose com os FMA e contribuições substanciais vêm sendo observadas, incluindo as plantas cultivadas de interesse econômico como soja, milho, feijão, sorgo, trigo, arroz, café, citros, mandioca, espécies arbóreas entre outras (SIQUEIRA et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da área experimental e manejo cultural

O estudo foi conduzido em 2008 na safra de inverno, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAV-UNESP), localizada ao norte do Estado de São Paulo, geograficamente definida pelas coordenadas 21° 15'S e 48° 18'W, sob solo classificado como Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 2006), cujas características químicas e granulométricas da camada de 0-0,15 m estão descritas na Tabela 1. O clima, segundo a classificação de Köppen, é Cwa, denominado clima mesotérmico com inverno seco, e chuvoso no verão.

Tabela 1. Análises químicas e físicas do solo da área experimental na camada de 0-0,15 m.

pH (CaCl ₂)	MO (g dm ⁻³)	P resina (mg dm ⁻³)	K	Ca	Mg	H+Al (mmol _c dm ⁻³)	CTC	V (%)	Areia	Silte	Argila
5,4	25	36	4,0	35	18	30	87	65	370	65	565

MO: matéria orgânica; H+Al: acidez potencial; CTC: capacidade de troca catiônica; V%: saturação por bases do solo.

A área experimental foi cultivada com milho e soja em sistema convencional utilizando-se de revolvimento do solo com grades de disco e arado por mais de 20 anos. Antes da instalação do experimento, realizaram-se operações de subsolagem a 40 cm de profundidade e de calagem para elevação da saturação por bases do solo para 70%. A incorporação do calcário com PRNT de 100%, aplicado na dose de 1,5 Mg ha⁻¹, foi realizada por operações de aração e de gradagem. Em 2002 foi implantado o sistema de semeadura direta utilizando-se de blocos casualizados no esquema com faixas e três repetições (Figura 1). As parcelas experimentais ocupam uma área de 600 m² (40 m de comprimento por 15 m de largura cada), nas avaliações foi respeitado o efeito bordadura, tornando assim a área útil da parcela de 20 m de comprimento por 10 m de largura que corresponde a 200 m².



Figura 1. Croqui de um bloco da área experimental com as sequências de verão e culturas de inverno.

Nas faixas foram semeadas as culturas de verão soja, milho e em uma delas foram alternados a cada safra, soja e milho, denominadas, respectivamente, sequências de verão: soja/soja, milho/milho e soja/milho. No ano seguinte a implantação desse sistema, fez-se a rotação com as culturas de inverno (milho, girassol, nabo forrageiro, milheto, guandu, sorgo e crotalária). Essa sequência de cultivos está persistindo até a presente data. Dessa forma, no mês de novembro de 2007, foram semeadas as sequências de verão que foram colhidas no mês de março de 2008, em seguida foi realizada a semeadura das culturas de inverno (ainda no mês de março) das quais foram coletadas amostras de solo para este estudo. Na sequência de verão SM, cultivou-se milho no ano agrícola 2007/2008.

Em julho de 2005, efetuou-se aplicação de $1,0 \text{ Mg ha}^{-1}$ de calcário com PRNT de 70%, na superfície do solo e sem a incorporação do corretivo. As recomendações das adubações de semeadura das culturas de verão basearam-se nos resultados das análises químicas do solo, provenientes das avaliações do ano agrícola anterior, seguindo recomendações de CANTARELLA et al. (1997) para milho, e de AMBROSANO et al. (1997) para soja. Na tabela 2 está apresentado o histórico de adubação da safra de verão desde a implantação até a safra 2007/2008.

Tabela 2. Histórico com as quantidades de fertilizantes aplicados nas culturas de verão.

Sequência de verão	Modo de Aplicação	Safrá		
		2002/2003	2003/2004	2004/2005
Milho/milho	Linha	(milho)	(milho)	(milho)
		350 kg ha ⁻¹	350 kg ha ⁻¹	350 kg ha ⁻¹
	Cobertura	8-28-16 (NPK)+Zn 0,5%	8-28-16 (NPK)+Zn 0,5%	8-28-16 (NPK)+Zn 0,5%
		300 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹
Soja/soja	Linha	(soja)	(soja)	(soja)
		300 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹
	Cobertura	00-20-20 (NPK)	00-20-20 (NPK)	00-20-20 (NPK)
		-	-	-
Soja/milho	Linha	(soja)	(milho)	(soja)
		300 kg ha ⁻¹	350 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹
	Cobertura	00-20-20 (NPK)	8-28-16 (NPK)+Zn 0,5%	00-20-20 (NPK)
		-	300 kg ha ⁻¹	-
30-00-10 (NPK)				
Continuação...				
Sequência de verão	Local de Aplicação	Safrá		
		2005/2006	2006/2007	2007/2008
Milho/milho	Linha	(milho)	(milho)	(milho)
		350 kg ha ⁻¹	100 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹
	Cobertura	8-20-20 (NPK)+Zn 0,5%	8-28-16 (NPK)+Zn 0,5%	8-20-20 (NPK)+Zn 0,3%
		480 kg ha ⁻¹	200 kg ha ⁻¹	450 kg ha ⁻¹
Soja/soja	Linha	(soja)	(soja)	(soja)
		330 kg ha ⁻¹	200 kg ha ⁻¹	250 kg ha ⁻¹
	Cobertura	00-20-20 (NPK)	00-20-20 (NPK)	00-20-20 (NPK)
		-	-	-
Soja/milho	Linha	(milho)	(soja)	(milho)
		350 kg ha ⁻¹	200 kg ha ⁻¹	300 kg ha ⁻¹
	Cobertura	8-20-20(NPK) +Zn 0,5%	00-20-20 (NPK)	8-20-20 (NPK)+Zn0,3%
		480 kg ha ⁻¹	-	450 kg ha ⁻¹
		Sulfato de amônio		

Nas sequências de verão, da safra 2007/2008, foram semeados os híbridos de milho DKB 330 com 90 cm de espaçamento entrelinhas, visando a uma população de aproximadamente 66 mil plantas ha⁻¹. Para as sequências com soja foi semeada a cultivar de soja Butiá BMX-TITAN RR básica S2, com 45 cm de espaçamento entrelinhas, visando a uma população final de aproximadamente 480 mil plantas ha⁻¹. As sementes de soja foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* (inoculante turfoso Masterfix Soja, na dosagem 200 mL/ 50 kg sem).

O milho (híbrido Impacto NK- precoce) e o girassol (híbrido Hélio 251-*Helianthus*) cultivados na safra de inverno foram semeados mecanicamente com 90 cm de espaçamento entrelinhas, visando a atingir populações finais de 55 mil e 88 mil plantas ha⁻¹, respectivamente. A cultura do guandu (cultivar anão- Bonamigo) foi semeada mecanicamente com 45 cm de espaçamento entrelinhas visando a atingir população de 665 mil plantas ha⁻¹. As culturas de inverno não receberam adubações de semeadura e cobertura. Foram registrados dados diários de temperatura e de precipitação pluviométrica da área experimental, e na Figura 2, estão apresentadas as médias mensais de temperatura (°C) e a precipitação mensal (mm), de novembro de 2007 (quando foi realizada a semeadura das sequências de verão) a novembro de 2008.

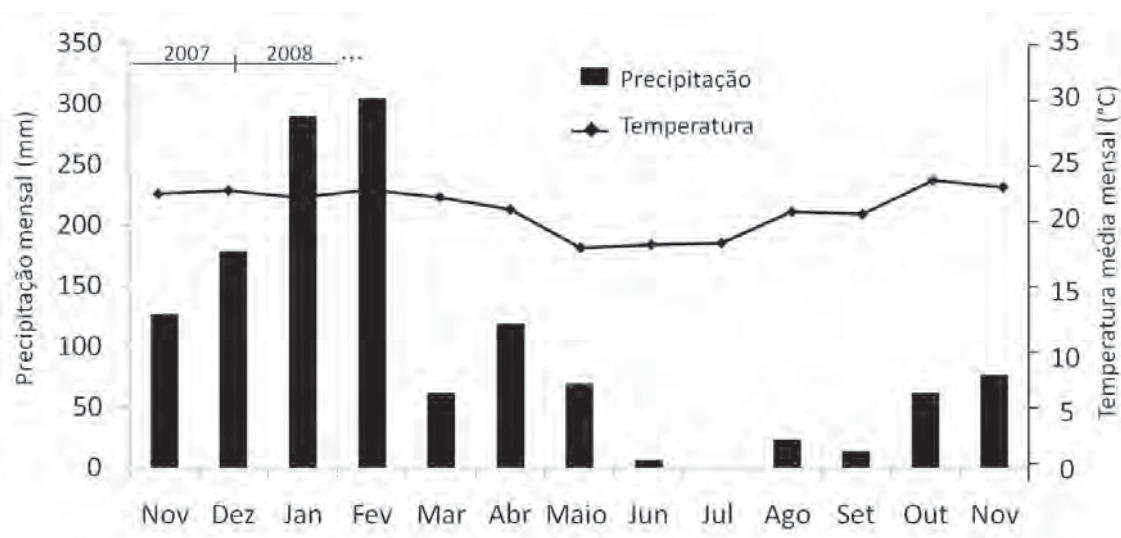


Figura 2. Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) de novembro de 2007 a novembro de 2008 na área experimental.

Durante a condução das culturas de verão e de inverno, o controle de pragas, doenças e plantas daninhas foi realizado quando necessário, utilizando-se de produtos e doses recomendados pelos fabricantes.

3.2. Delineamento experimental e análise estatística

Para este estudo foram selecionadas três culturas: gramínea (milho), oleaginosa (girassol) e leguminosa (guandu). O delineamento da área experimental foi em blocos casualizados no esquema com faixas e três repetições, como descrito anteriormente.

No Experimento 1 foi estudado os atributos químicos e bioquímicos do solo rizosférico (SR) e do solo não rizosférico (SNR). Dessa forma, foi constituído de 18 tratamentos, ou seja, a combinação 2 x 3 x 3 - duas posições de coleta do solo (SR e SNR), três culturas de inverno (milho, girassol e guandu,) e três sequências de verão (soja/milho, milho/milho e soja/soja).

No Experimento 2 foi estudada a habilidade metabólica dos fungos apenas do solo rizosférico, de onde os mesmos foram isolados, e a porcentagem de colonização micorrízica. Assim, esse experimento foi constituído de 9 tratamentos, ou seja, a combinação 3 x 3 - três culturas de inverno (milho, girassol e guandu) e três as sequências de verão (soja/milho, milho/milho e soja/soja).

As contagens do número de bactérias e fungos, seguiram a mesma constituição do Experimento 1, visto terem sido avaliadas em SR e SNR, porém esses dados estão descritos no Experimento 2 (Resultados - Item 4.2).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR, versão 5.1 Build (FERREIRA, 2008).

3.3. Amostragem e tratamento das amostras de solo

No início do florescimento das culturas de inverno, em junho de 2008, foram retiradas 20 amostras simples de cada parcela experimental para compor uma amostra composta. Para a amostragem do solo rizosférico (SR), 20 plantas inteiras de milho, girassol e guandu foram retiradas e realizadas a separação cuidadosa das raízes em laboratório, sendo o solo aderido às mesmas, considerado como solo rizosférico. As raízes com solo aderido foram colocadas em sacos plásticos e agitadas manualmente para o máximo aproveitamento do solo rizosférico.

As amostras do solo não rizosférico (SNR) foram coletadas nas entrelinhas da parcela útil na profundidade de 0-0,15 m com auxílio de um trado holandês. Todas as amostras foram peneiradas (2 mm), retirando-se material estranho (folhas, insetos, galhos etc.). Parte foi mantida em geladeira até o momento de uso e parte foi seca ao ar (TFSA) e conservada em temperatura ambiente para as análises.

3.4. EXPERIMENTO 1 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS E QUÍMICAS DO SOLO

3.4.1. Atividade da amilase

Determinou-se a atividade da amilase no solo pelo método descrito por COLE (1977). Pesaram-se 2,0 g de solo (Terra fina seca ao ar - TFSA) em tubo de 18 x 180 mm ao qual foi acrescido 0,3 mL de tolueno e 5,0 mL de solução contendo 50 mg de amido solúvel em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 nos testes. Nos tubos controles, apenas o tolueno foi adicionado no solo. Em seguida incubou-se a 37°C por 24 h. Após incubação, acrescentou-se o tampão acetato com amido nos controles e procedeu-se à centrifugação (8900 G - força centrífuga por 10 minutos). O sobrenadante foi filtrado em papel filtro comum para em seguida fazer a determinação da quantidade de açúcar pelo método de Somogyi - Nelson (SOMOGYI, 1952). Utilizou-se 0,1 mL do sobrenadante ao qual foi adicionado 0,9 mL de água destilada e 1,0 mL de reagente cúprico alcalino (28,0 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 40,0 g de tartarato de K e Na; 100,0 mL de NaOH 1,0 M; 80,0 mL de solução de CuSO_4 ; 180,0 g de sulfato de Na anidro e H_2O 1000 mL).

Agitou-se vigorosamente e incubou-se em banho-maria em ebulição por 20 minutos. Em seguida adicionou-se 1,0 mL de reagente arsenomolibdato (25,0 g de molibdato de amônio; 450 mL de H₂O; 21,0 mL de H₂SO₄ concentrado; 3,0 g de Na₂HAsO₄.7H₂O), 5,0 mL de H₂O destilada e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm. Para calcular a quantidade de açúcar produzido com a hidrólise do amido, concentrações crescentes de glicose de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µg mL⁻¹ foram tratadas como descrito para as amostras. A curva padrão resultante permitiu determinar as concentrações de glicose produzidas. Considerou-se uma unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µg glicose por 24h a 37°C. A atividade específica foi dada em micrograma de glicose por grama de solo por 24 horas.

3.4.2. Atividade da urease

A atividade da urease foi determinada segundo a metodologia descrita por MCGARITY & MYERS (1967). Pesaram-se 2,0 g de solo (TFSA) em tubo de 18 x 180 mm e acrescentou-se 0,2 mL de tolueno, 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M; pH 6,7; 1,0 mL de solução de ureia 10% (p/v) e incubou-se a 37°C em banho-maria por 3 horas. Após incubação, acrescentaram-se 3,0 mL de água destilada e procedeu-se à centrifugação (8900 G/ 10 minutos). Para a determinação da urease adicionou-se 0,1 mL do centrifugado, 2,1 mL de água destilada, 0,5 mL de fenolato (fenol: 62,5 g fenol, volume mínimo de álcool etílico para dissolver o fenol, 18,6 mL de acetona, álcool etílico q.s.p. 100 mL; NaOH 27% (p/v) e H₂O na proporção 1:1:3) e 0,3 mL de hipoclorito 0,9% (v/v). Incubou-se por 60 minutos a temperatura ambiente e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm. Para calcular a atividade da urease, concentrações crescentes de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg N-NH₄ mL⁻¹ a partir de uma solução padrão de (NH₄)₂SO₄ foram tratadas conforme o procedimento descrito para as amostras de solo e a partir dessa curva padrão os resultados foram calculados. Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à quantidade de

enzima que hidrolisa 1 μg ureia por 3 h a 37°C. A atividade específica foi expressa em micrograma NH_4^+ por grama de solo por 3 horas.

3.4.3. Atividade da CMC - celulase

O método descrito por KANAZAWA & MIYASHITA (1986) foi utilizado para a determinação da atividade da carboximetil celulose (CMC) - celulase no solo. Pesou-se 1,0 g do solo úmido equilibrado a 60% da capacidade de campo em tubo de ensaio (18 x 180 mm), adicionou-se 0,2 mL de tolueno e 10,0 mL de substrato contendo 10,0 mg de carboximetil celulose (CMC) mL^{-1} em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. Agitou-se e incubou-se a 50°C por 24 horas. Após incubação, procedeu-se a centrifugação. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e determinou-se a quantidade de açúcar pelo método de Somogyi - Nelson (SOMOGYI, 1952) conforme descrito anteriormente (atividade da amilase, item 3.4.1). Para calcular a quantidade de açúcar produzido com a hidrólise da celulose foi utilizado o mesmo procedimento citado anteriormente (atividade da amilase, item 3.4.1). A curva padrão resultante permitiu determinar as concentrações de glicose produzidas com a hidrólise da CMC. Considerou-se uma unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μg CMC por 24 a 50°C. A atividade específica foi dada em micrograma de glicose por grama de solo por 24 horas.

3.4.3. Atividade da protease

A atividade da protease no solo foi determinada pelo método de NANNIPIERI et al. (1979). Pesou-se 1,0 g do solo úmido equilibrado a 60% da capacidade de campo em tubo de ensaio (18 x 180 mm), acrescentou-se 2,5 mL de substrato contendo 1% de caseína (p/v) em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,1. Incubou-se por 1 hora em banho-maria a 52°C. Acrescentou-se 1 mL de ácido tricloroacético 17,5% (v/v) e procedeu-se à centrifugação a 8900 G / 10 minutos. Após a centrifugação, pipetou-se 1,0 mL do sobrenadante, acrescentou-se 7,0 mL de solução de Na_2CO_3 3,7% (p/v) e 1,0 mL de

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,06% (p/v). Agitou-se o tubo e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. Após incubação, acrescentou-se 1,0 mL de reagente de Folin na proporção de 1:4. Incubou-se novamente por mais 5 minutos a 37°C em banho-maria. Em seguida, a hidrólise da protease foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 578 nm. Para calcular da atividade da protease concentrações crescentes de tirosina de 0, 5, 10, 15, 30, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tirosina foram tratadas como descrito para as amostras de solo. A partir da curva padrão resultante pode-se determinar as concentrações de tirosina da reação enzimática. Considerou-se uma unidade de atividade enzimática como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μg caseína por hora a 52°C. Expressou-se a atividade específica em micrograma de tirosina por grama de solo por hora.

3.4.5. Carbono orgânico total

Determinou-se a quantidade de carbono orgânico total de acordo com o método descrito por SIMS & HABY (1971). Pesou-se 1,0 g de solo (TFSA) em erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, acrescentaram-se 10,0 mL da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,15M, 20,0 mL de H_2SO_4 concentrado e incubou-se por 20 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, o volume foi ajustado para 100 mL com água destilada, filtrado e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. O teor de carbono orgânico total foi calculado com base em uma curva padrão realizada com solução de sacarose 7% (p/v).

3.4.6. Carboidratos totais

Para a determinação das quantidades de carboidratos totais utilizou-se o método da antrona (ANGERS & MEHUYS, 1989). Pesou-se 1,0 g de solo (TFSA) em tubo 18 x 180 mm ao qual foram acrescentados 10 mL de solução de H_2SO_4 1,5M. Os tubos foram tampados com papel alumínio e incubados a 80°C por 24 horas. Em seguida, filtrou-se ainda quente o conteúdo do tubo em papel de filtro comum que foi previamente lavado com 5 mL de água destilada quente por três vezes. O volume do

filtrado foi ajustado para 100 mL em uma proveta. Após filtração colocaram-se 2 mL do extrato em tubo de ensaio 18 x 180 mm ao qual foi acrescentado, com uma bureta, 5 mL de solução de antrona (0,1 g de antrona para cada 50 mL de H₂SO₄ concentrado). Em seguida, o conteúdo foi agitado e deixado em repouso por 15 minutos quando foi então feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 607 nm antes de completar 30 minutos. Os cálculos foram efetuados com base em uma curva padrão com solução de glicose 0,11 g L⁻¹ (glicose monohidratada).

3.4.7. Proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais foi determinado conforme metodologia descrita por WRIGHT & UPADHYAYA (1996). Pesou-se 0,25 g de TFSA em tubo de ensaio 16 x 150 mm ao qual foram acrescentados 2 mL da solução de citrato 30 mM pH 8,0 e aquecido em autoclave a 121 °C por 90 minutos. Em seguida, procedeu-se à centrifugação (8900 G por 10 minutos). Após a centrifugação, colocou-se 0,1 mL do extrato em tubo 18 x 180 mm e 1 mL de água deionizada ao qual foi adicionado 0,9 mL de uma solução constituída por: 2,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado; 100 g de Na₂CO₃; 20,0 g de NaOH e o volume final ajustado com H₂O destilada para 1000 mL. Em seguida, incubou-se o tubo em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Após incubação adicionou-se 0,1 mL da seguinte solução: 2,0 g tartarato de sódio e potássio tetrahidratado; 1,0 g CuSO₄·5H₂O; 10,0 mL de solução de NaOH 1M e o volume final para 100 mL ajustado com H₂O destilada. Incubou-se o tubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, acrescentaram-se 3,0 mL de solução de reagente de Folin 1:15 e incubou-se novamente em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Deixou-se esfriar e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. A partir de uma curva padrão com soro albumina bovina (10 mg mL⁻¹) obteve-se a curva padrão que foi utilizada para calcular o teor de proteínas totais no solo.

3.5. EXPERIMENTO 2 - HABILIDADE METABÓLICA DOS FUNGOS RIZOSFÉRICOS

3.5.1. Contagem de bactérias e fungos

Para a contagem do número de bactérias e fungos aplicou-se a metodologia de diluição em série conforme WOLLUM (1982), utilizando-se de:

a) Meio de BUNT & ROVIRA (1955), para contagem de bactérias:

Glicose	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Peptona	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Extrato de solo	250 mL
H ₂ O	750 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,4

b) Meio de MARTIN (1950) acrescido de 60 µg mL⁻¹ de penicilina e 40 µg mL⁻¹ de estreptomicina para contagem de fungos:

Glicose	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Peptona	5,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Rosa bengala	0,03 g

H ₂ O q.s.p	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	5,6

Incubaram-se os fungos à temperatura de 30 °C por 24 h para as bactérias e 72 h para os fungos.

3.5.2. Isolamento dos fungos

Os fungos foram isolados do solo rizosférico em meio Sabouraud (peptona 10,0 g, glicose 40,0 g, água 1000 mL, Ágar 15,0 g e pH 7,0), à temperatura 30 °C por 2-5 dias. Foram obtidos 501 isolados, previamente classificados por avaliação morfológica: cor, forma, estrutura etc. Esses isolados estavam distribuídos nos nove tratamentos deste estudo.

3.5.3. Manutenção dos isolados

Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo meio de cultura Sabouraud, sendo conservados em geladeira à temperatura de 4°C até o momento de serem utilizados, contudo pelo período máximo de 30 dias quando foram renovados (NAHAS et al., 1994).

3.5.4. Atividade amilolítica

Para a avaliação da atividade amilolítica utilizou-se do meio BDYA. Após a incubação à temperatura 30 °C por 96 h foi utilizado reagente de iodo* para revelação da atividade enzimática, caracterizada por um halo hialino ao redor da colônia (modificado de MELO & CAMPOS -TAKAKI, 1989):

Extrato de batata**	1000 mL
Glicose	20,0 g

Extrato de levedura	0,5 g
Ágar	15,0 g
pH	7,0
*Reagente de Iodo: KI 2,0 g, I ₂ 0,2 g e água 100 mL.	
**200 g de batatas cozidas em 1000 mL de água, originando uma suspensão que foi filtrada em gaze, e novamente ajustada para 1000 mL.	

3.5.5. Atividade ureolítica

Para a avaliação da atividade ureolítica utilizou-se da ureia 1% como substrato após a esterilização da mesma por filtração em membrana filtrante (filtro de celulose acetato 0,45 µm). Logo em seguida, essa solução foi adicionada ao meio de cultura devidamente esterilizado e resfriado (\pm 48°C), conforme metodologia de HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). Após incubação a 30°C por 96 h, a formação de um halo azul em volta da colônia caracterizava a atividade ureolítica. O meio de cultura conforme abaixo descrito:

Triptona	5,0 g
Glicose	1,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
H ₂ O q.s.p	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	6,0
Azul de bromotimol	5 mL de uma solução 1%

3.5.6. Atividade celulolítica

Para a avaliação da atividade celulolítica utilizou-se como substrato carboximetil - celulose (CMC), conforme método de HENDRICKS et al. (1995). Após a incubação à temperatura de 30°C por 168 h foi utilizado uma solução de HCl 0,5 M sobre o meio de

cultura por 10 minutos para revelação da atividade enzimática, caracterizada por um halo hialino ao redor da colônia. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
Carboximetil celulose	1,88 g
Vermelho congo	0,2 g
Gelatina	2,0 g
Extrato de solo	100 mL
H ₂ O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,0

3.5.7. Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica, utilizou-se como substrato a caseína, conforme método descrito por CAPLAN & FAHEY (1982). Após a incubação à temperatura de 30°C por 168 h foi utilizado uma solução de HCl 0,5 M sobre o meio de cultura por 10 minutos para revelação da atividade enzimática, caracterizada por um halo hialino ao redor da colônia. A composição do meio foi conforme descrito abaixo:

KH ₂ PO ₄	3,0 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,45 g
NaNO ₃	1,0 g
NaCl	0,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Glicose	10,0 g
NaCl	0,1 g
NH ₄ Cl	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Glicose	10,0 g
Caseína	10,0 g

H ₂ O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,0

3.5.8. Atividade quitinolítica

Foi determinada conforme metodologia descrita por RENWICK et al. (1991), onde os isolados foram inoculados em meio de Czapeck, suplementado com quitina coloidal, como única fonte de carbono. Após incubação a 30°C por 120 h, a formação de um halo hialino em torno das colônias, caracterizava a atividade quitinolítica.

A quitina coloidal foi obtida após deixar a quitina em ácido fosfórico em refrigerador (4°C) por 24 h, em seguida a suspensão foi lavada por meio da adição de água deionizada, homogeneizada e centrifugada. Esse procedimento de lavagem foi realizado seguidas vezes, posteriormente foi adicionado uma solução de NaOH 1 M, até a elevação do pH da quitina peletizada para 5,0. A quitina peletizada foi armazenada em refrigerador até sua utilização. O pellet continha em torno de 4% de quitina coloidal, calculada por meio de secagem em estufa a 50°C até peso constante.

NaNO ₃	2,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Quitina coloidal*	1,0 g
H ₂ O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	6,0

Quitina Coloidal

Quitina	25 g
H ₃ PO ₄ (85%)	250 mL
NaOH 1M	

3.5.9. Solubilização de fosfato

Foi utilizada metodologia descrita por NAHAS et al. (1994). Para cada 50 mL de meio de solubilização foi adicionado 1,5 mL de solução de CaCl_2 13,25%, e 1 mL de solução de K_2HPO_4 10%, devidamente esterilizados separadamente para a produção de precipitado de fosfato inorgânico, CaHPO_4 . Após incubação a 30°C por 120 h, a formação de um halo incolor em volta da colônia caracterizava a solubilização de fosfato. O meio de cultura segue descrito:

Glicose	10,0 g
NaCl	0,1 g
NH_4Cl	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
KCl	0,2 g
Extrato de levedura	0,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
H_2O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,0

Cálculo do índice de atividade enzimática

Após a incubação dos fungos para a avaliação das atividades amilolíticas, ureolíticas, celulolíticas, proteolíticas, quitinolíticas e solubilização de fosfatos foram calculados os índices de atividade enzimática (IE). O IE é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. O cálculo é realizado através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação ($\varnothing h$) e o diâmetro da colônia ($\varnothing c$) - $\varnothing h/\varnothing c$ (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975), medidos com o auxílio de uma régua em mm. Alguns autores recomendam um $\text{IE} \geq 2,0$ para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas em meio sólido (OLIVEIRA et al., 2006; STAMFORD et al., 1998).

3.5.10. Produção de ácido indolacético (AIA)

Para a avaliação da produção de ácido indolacético (AIA) utilizou-se metodologia adaptada de BRIC et al. (1991), onde o meio Sabouraud foi suplementado com L-Triptofano. Após a inoculação do isolado fúngico no centro da placa, foi colocado sobre o meio de cultura papel filtro comum funcionando como uma membrana. Esse papel filtro foi previamente cortado no tamanho da placa de Petri, esterilizado em autoclave e com posterior secagem em estufa a 40°C. Depois de incubados a 30°C por 72 h, a membrana foi removida para outra placa e saturada em solução de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951). A formação de um halo róseo (avermelhado) na membrana, no período de 30 minutos a 2 h, caracterizava a produção de AIA pelos isolados. A composição do meio de cultura e da solução de Salkowski foi a seguinte:

Glicose	40,0 g
Peptona	10,0 g
L-Triptofano	1,02 g
H ₂ O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,0
Solução de Salkowski	
FeCl ₃ 6H ₂ O (0,5M)	1 mL
HClO ₄ 35%	50 mL

3.5.11. Produção de ácido cianídrico (HCN)

Para avaliação da produção de ácido cianídrico (HCN) utilizou-se de metodologia adaptada de BAKKER & SCHIPPERS (1987), onde o meio Sabouraud foi suplementado com glicina e cloreto de ferro. Após inoculação dos isolados fúngicos no centro das placas, foi colocado na tampa de cada placa de Petri uma membrana (papel filtro comum devidamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e seco em estufa a 40°C) saturada com uma solução de ácido pícrico (esterilizada a 121°C por 15

minutos). Em seguida, as placas foram envoltas com plástico parafilme e levadas para incubação a 30°C por 7 dias. A mudança da coloração do papel de filtro de amarelo para marrom/alaranjado caracterizava a produção de HCN.

Glicose	40,0 g
Peptona	10,0 g
Glicina	4,4 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,081 g
H ₂ O	1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	7,0
Solução de ácido pícrico	
Ácido pícrico	5,0 g
Na ₂ CO ₃	2,0 g
H ₂ O	100 mL

3.5.12. Produção de sideróforos

Para a avaliação da produção de sideróforos foi utilizada metodologia descrita por MILAGRES et al. (1999) modificada de SCHWYN & NEILANDS (1997). A composição das soluções e do meio de cultura foram os seguintes:

Solução 1

Cromo azurol S (CAS)	60,5 mg
H ₂ O deionizada	50 mL

Solução 2

Solução Ferro III:	10 mL
FeCl ₆ H ₂ O (1 mM)	0,27 g
HCl (10 mM)	0,365 g
H ₂ O	1000 mL

Solução 3

Hexadeciltrimetil amônio brometo (HDTMA)	72,9 mg
--	---------

H ₂ O	40 mL
Meio de cultura	
Pipes	30,24 g
H ₂ O	750 mL
pH	6,8
Elevar pH com solução 50% NaOH	

As três soluções foram feitas separadamente. Misturou-se a Solução 2 com a Solução 1 e em seguida adicionou-se a Solução 3, agitando-as vigorosamente. Foi obtida uma solução corante que foi posteriormente autoclavada a 121°C por 15 minutos. Também foi autoclavado o meio de cultura descrito, bem como o meio Sabouraud (composição já descrita anteriormente- Item 3.6) que também foi utilizado nessa avaliação.

A solução corante foi adicionada no meio de cultura acima descrito (ainda quente) e agitados cuidadosamente, dando origem ao meio CAS-ágar. Placas de Petri foram preparadas com meio de cultura Sabouraud. Após solidificação, o mesmo foi cortado em duas metades, com auxílio de uma espátula esterilizada na chama aquecida no bico de Bunsen. Uma das metades foi substituída pelo meio CAS-ágar. O inóculo foi colocado no centro da placa, na porção com meio Sabouraud, em seguida foi incubado a 30°C no escuro por 6 dias. A produção de sideróforos foi medida pelo avanço da coloração do azul original para amarelo, rosa ou rosa intenso expressando em mm/dia.

3.5.13. Colonização micorrízica

Para a avaliação da colonização micorrízica foram utilizadas raízes das culturas de inverno milho, girassol e guandu que foram dispensadas quando da separação do solo rizosférico. Aproximadamente 1 g de raízes finas foram retiradas, lavadas, clarificadas em KOH (10%), lavadas novamente em água corrente, colocadas em HCl (2%) por 5 minutos, em seguida coradas solução de latoglicerol com azul de tripano (solução 1:1:1 de ácido láctico: glicerina: água + 0,05 % de azul de tripano) segundo

PHILLIPS & HAYMANN (1970). Para determinar a porcentagem de colonização micorrízica das raízes foi utilizado o método da placa quadriculada, de acordo com GIOVANNETTI & MOSSE (1980), e observação em microscópio estereoscópio (40x).

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1- ANÁLISES BIOQUÍMICAS E QUÍMICAS DO SOLO

A atividade da amilase do SR e SNR variou de 148,9 a 250,9 μg glicose g^{-1} solo 24h^{-1} (Figura 3, Tabela A1, pág. 94). Maior atividade da enzima foi observada apenas no SR, em relação ao SNR, para cultura de girassol (Figura 3A) e na sequência soja/soja (Figura 3B). Tanto no SR como SNR das culturas de inverno, a maior atividade foi observada no solo sob milho que diferiu significativamente (Tukey, $p < 0,05$) da atividade do solo sob girassol (Figura 3A). A atividade da amilase foi maior no SR do que no SNR da sequência soja/soja. Foram verificados resultados semelhantes entre o SR das sequências de verão, porém foi maior ($p < 0,05$) no SNR das sequências soja/milho e milho/milho que soja/soja (Figura 3B).

Exceto na sequência soja/milho, o SR tanto das culturas de inverno (Figura 4A) como das sequências de verão (Figura 4B) mostrou maior ($p < 0,05$) atividade da urease que o SNR (Tabela A2, pág. 95). Em média, a atividade do SR foi 100% maior do que o SNR. O milho promoveu os maiores valores da atividade da urease tanto no SR como no SNR quando comparado ao guandu, sendo a atividade significativamente igual à observada no solo sob girassol (Figura 4A). No SR das sequências milho/milho e soja/soja foram observados valores superiores aos obtidos no solo milho/soja, sendo que no SNR as atividades de todas as sequências foram significativamente iguais (Figura 4B).

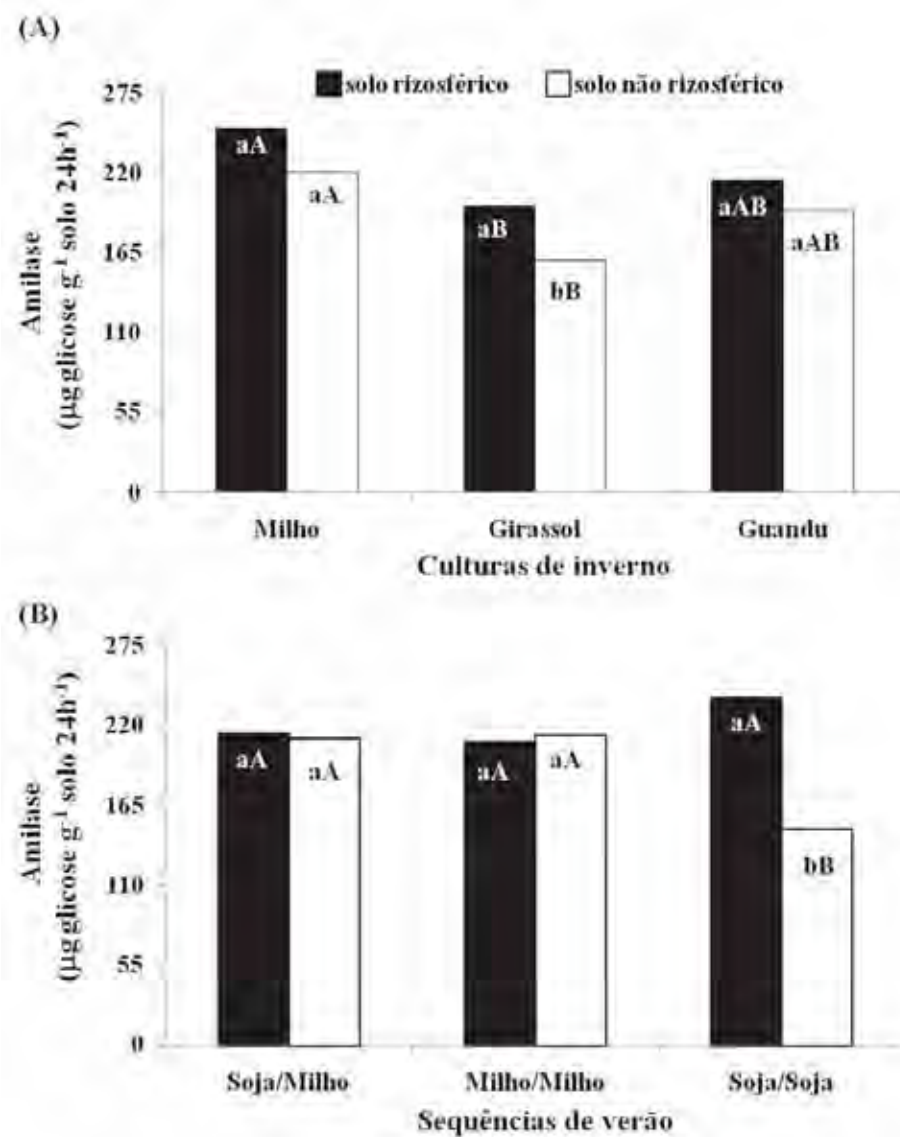


Figura 3. Efeito das culturas de inverno **(A)** e das sequências de verão **(B)** em sistema de semeadura direta, na atividade da amilase encontrada em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR). Médias seguidas da mesma letra minúscula (SR e SNR) e maiúscula (culturas de inverno e sequências de verão) não diferem entre si pelo Teste Tukey $p < 0,05$.

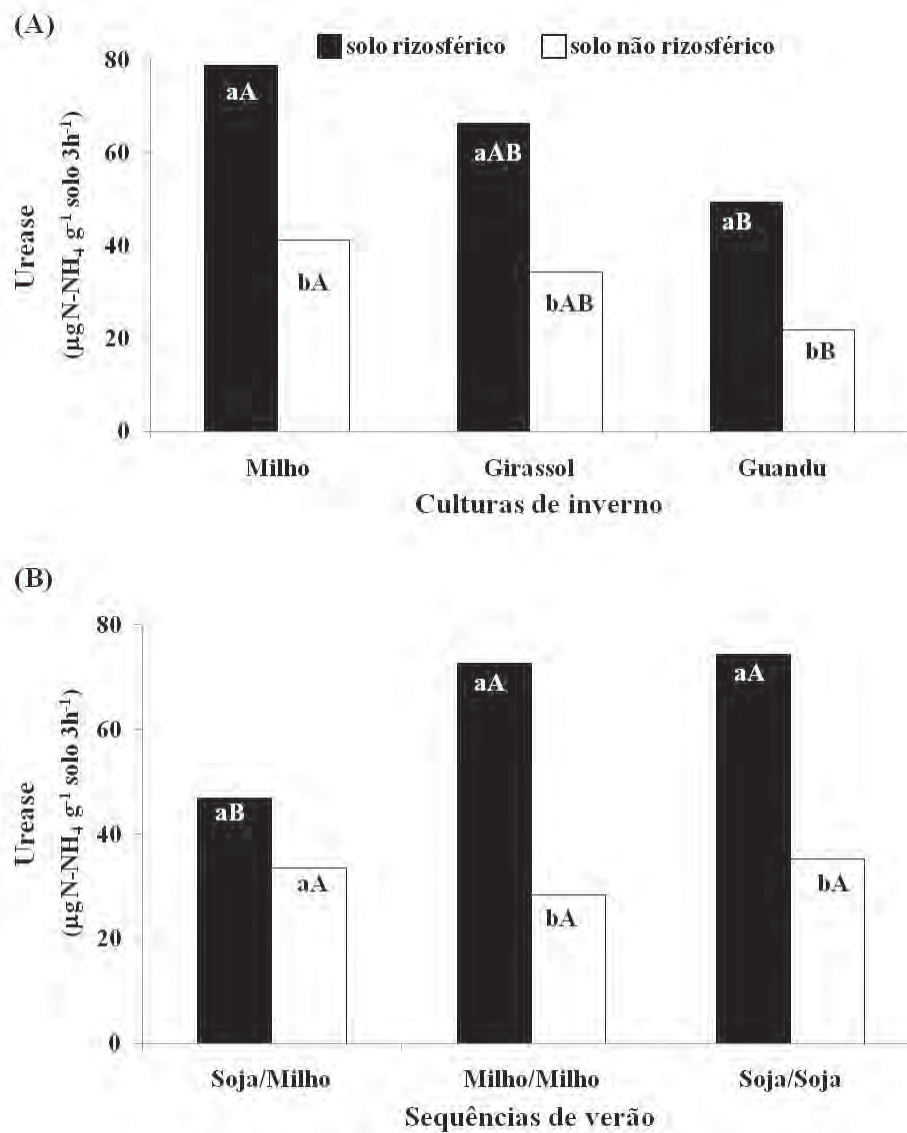


Figura 4. Efeito das culturas de inverno **(A)** e das sequências de verão **(B)** em sistema de semeadura direta, na atividade da urease encontrada em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR). Médias seguidas da mesma letra minúscula (SR e SNR) e maiúscula (culturas de inverno e sequências de verão) não diferem entre si pelo Teste Tukey $p < 0,05$.

Á semelhança da atividade da urease, o SR tanto das culturas de inverno (Figura 5A) como das sequências de verão (Figura 5B) mostrou maior ($p < 0,05$) atividade da CMC-celulase que o SNR, exceto na cultura do guandu (Tabela A3, pág. 96). Também, a atividade do SR foi consideravelmente maior, 85%, do que o SNR. O SR da cultura do milho promoveu o maior valor dessa enzima ($334,4 \pm 9 \mu\text{g glicose g}^{-1} \text{ solo } 24\text{h}^{-1}$) e foi significativamente maior que as demais culturas de inverno (Figura 5A). Nenhum efeito das sequências de verão foi verificado sobre a atividade da CMC-celulase, tanto no SR como no SNR (Figura 5B).

A atividade da protease variou de 16,7 a 67,1 $\mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ no SNR e de 34,8 a 84,1 $\mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ no SR (Tabela 3). Esses resultados mostram que a atividade da enzima foi em média 62% maiores no SR em relação ao SNR. A análise de variância mostrou efeito significativo na tripla interação (culturas de inverno x sequências de verão x SR e SNR). Assim, comparações significativas ($p < 0,05$) entre SR e SNR foram encontradas nos solos sob as culturas milho e guandu, ambos nas sequências de verão milho/milho e girassol na sequência soja/milho e soja/soja (Tabela 3). A cultura de inverno milho proporcionou a maior atividade da protease no SR ($84,1 \mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$) e SNR ($67,1 \mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$) sob as sequências milho/milho, soja/milho, respectivamente. A menor atividade da enzima foi encontrada tanto no SR como no SNR sob a influência da sequência soja/soja.

De maneira geral, os maiores valores do carbono orgânico total ($p < 0,05$) foram observados no SR em comparação ao SNR (Tabela 4). Os teores de carbono orgânico total foi em média 21% maior no SR em relação ao SNR. Tanto as interações dentro de SR como de SNR proporcionaram pouca variação nos valores do carbono orgânico, respectivamente, de 14,5 a 19,3 $\text{mg C g}^{-1} \text{ solo}$ e de 11,6 a 13,6 $\text{mg C g}^{-1} \text{ solo}$. Porém, foi maior no SR da sequência milho/milho em relação às demais.

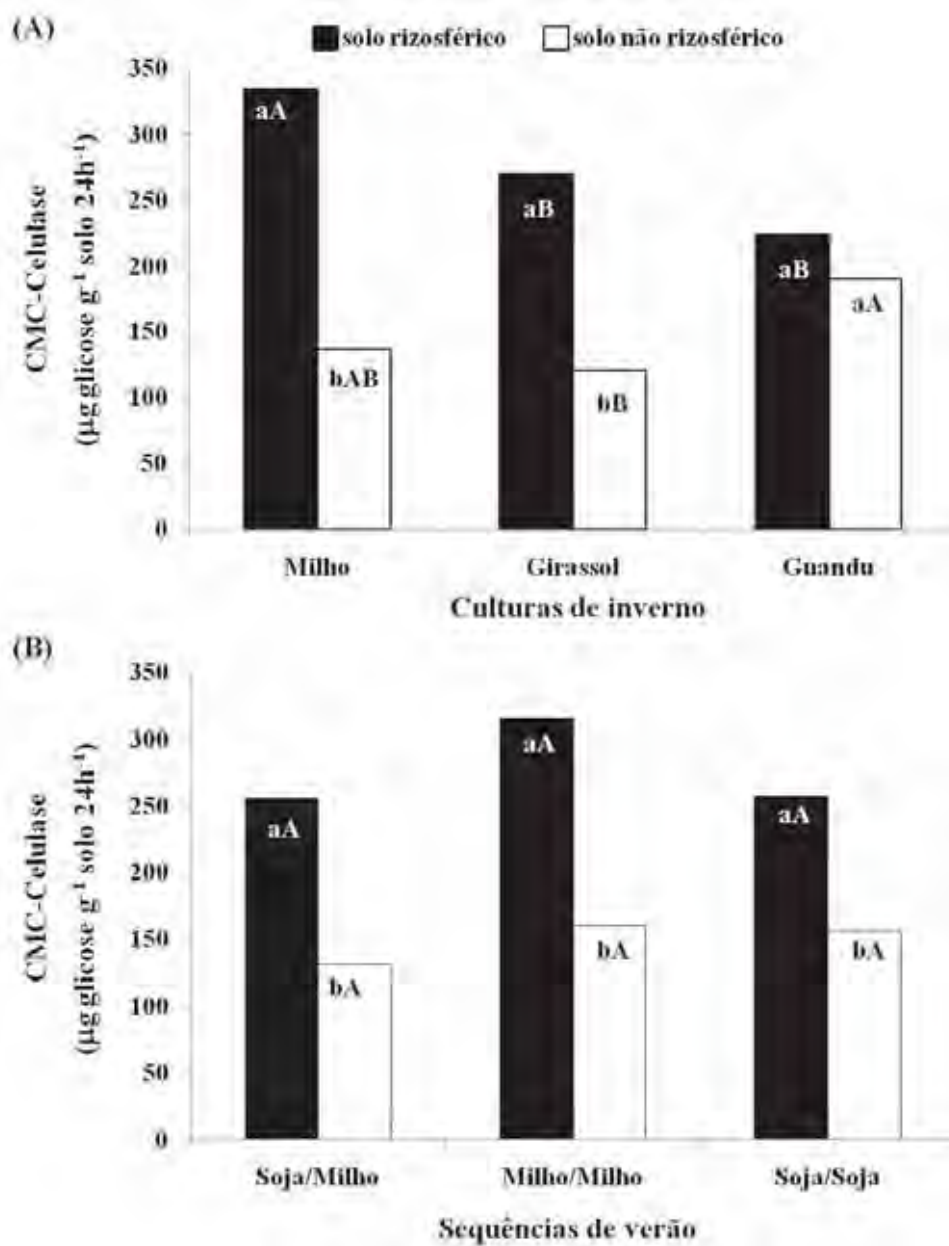


Figura 5. Efeito das culturas de inverno **(A)** e das sequências de verão **(B)** em sistema de semeadura direta, na atividade da CMC-celulase encontrada em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR). Médias seguidas da mesma letra minúscula (SR e SNR) e maiúscula (culturas de inverno e sequências de verão) não diferem entre si pelo Teste Tukey $p < 0,05$.

Tabela 3. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, na atividade da protease encontrada em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR).

SEQUÊNCIAS DE VERÃO	CULTURAS DE INVERNO			
	PROTEASE (μg tirosina g^{-1} solo h^{-1})			
	SOLO RIZOSFÉRICO			Médias
	Milho	Girassol	Guandu	
Soja/milho	77,4 Aa(a)	79,6 Aa(a)	59,8 Aa(a)	72,3 A
Milho/milho	84,1 Aa(a)	55,9 Bb(a)	70,2 Aab(a)	70,1 A
Soja/soja	52,2 Ba(a)	52,9 Ba(a)	34,8 Ba(a)	46,6 B
Médias	71,2 a	62,8 ab	54,9 b	
	SOLO NÃO RIZOSFÉRICO			Médias
	Milho	Girassol	Guandu	
Soja/milho	67,1 Aa(a)	20,3 Bb(b)	45,9 Aa(a)	44,4 A
Milho/milho	55,4 Aab(b)	55,7 Aa(a)	23,9 Bb(b)	45,0 A
Soja/soja	40,9 Ba(a)	16,7 Bb(b)	24,8 ABab(a)	27,5 B
Médias	54,5 a	30,9 b	31,5 b	
	Teste F		Coefficiente de variação %	
Sequência de verão (V)		31,15*	CV (V)	17
Culturas de inverno (I)		11,34*	CV (I)	25
Posição de coleta do solo (R)		97,89*	CV (V x I)	12
V x I		1,67 ^{ns}	CV (V x I x R)	7
V x R		1,04 ^{ns}		
I x R		3,15 ^{ns}		
V x I x R		12,43*		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, maiúscula na coluna e minúscula entre parênteses comparando SR e SNR, não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela 4. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, no teor de carbono orgânico total encontrado em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR).

SEQUÊNCIAS DE VERÃO	CULTURAS DE INVERNO			
	CARBONO ORGÂNICO TOTAL (mg C g ⁻¹ solo)			
	SOLO RIZOSFÉRICO			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	15,6 Aa(a)	14,7 Aa(a)	16,3 Aa(a)	15,5 B
Milho/milho	16,7 Ab(a)	19,3 Aa(a)	15,4 Ab(a)	17,1 A
Soja/soja	14,8 Aa(a)	15,9 Aa(a)	14,5 Aa(a)	15,1 B
Médias	15,7 a	16,6 a	15,4 a	
	SOLO NÃO RIZOSFÉRICO			
Soja/milho	12,5 Aa(b)	12,7 Aa(b)	12,5 Aa(b)	12,6 A
Milho/milho	11,6 Ab(b)	13,2 Aab(b)	14,6 Aa(a)	13,1 A
Soja/soja	13,6 Aa(a)	13,2 Aa(b)	13,1 Aa(b)	13,3 A
Médias	12,6 a	13,1 a	13,4 a	
	Teste F		Coeficiente de variação %	
Sequência de verão (V)	6,96*		CV (V)	6
Culturas de inverno (I)	2,62 ^{ns}		CV (I)	6
Posição de coleta do solo (R)	80,44*		CV (V x I)	14
V x I	0,70 ^{ns}		CV (V x I x R)	8
V x R	3,98*			
I x R	1,95 ^{ns}			
V x I x R	3,97*			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, maiúscula na coluna e minúscula entre parênteses comparando SR e SNR, não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Houve uma variação nos teores dos carboidratos totais 1295,5 a 1550,6 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo (Figura 6, Tabela A4, pág. 97), porém diferença significativa entre os conteúdos do SR e SNR apenas foi constatada na cultura de girassol (Figura 6A). Enquanto o aumento da quantidade de carboidratos totais do SNR para o solo SR foi em média de 5%, na cultura de girassol foi de 15%. Observou-se que o SR das culturas milho e girassol apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) aos encontrados do guandu, porém não houve efeito do SNR das culturas de inverno (Figura 6A). Nenhum efeito das

sequências de verão foi verificado sobre os teores de carboidratos totais, tanto no SR como no SNR (Figura 6B).

Diferenças significativas dos teores das proteínas totais foram verificadas entre o SR e SNR (aumento médio de 23%) em todas as culturas de verão e inverno, exceto o guandu (Figura 7, Tabela A5, pág. 98). Porém, nenhum efeito significativo foi verificado tanto das culturas de inverno (Figuras 7A) como das de verão (Figuras 7B).

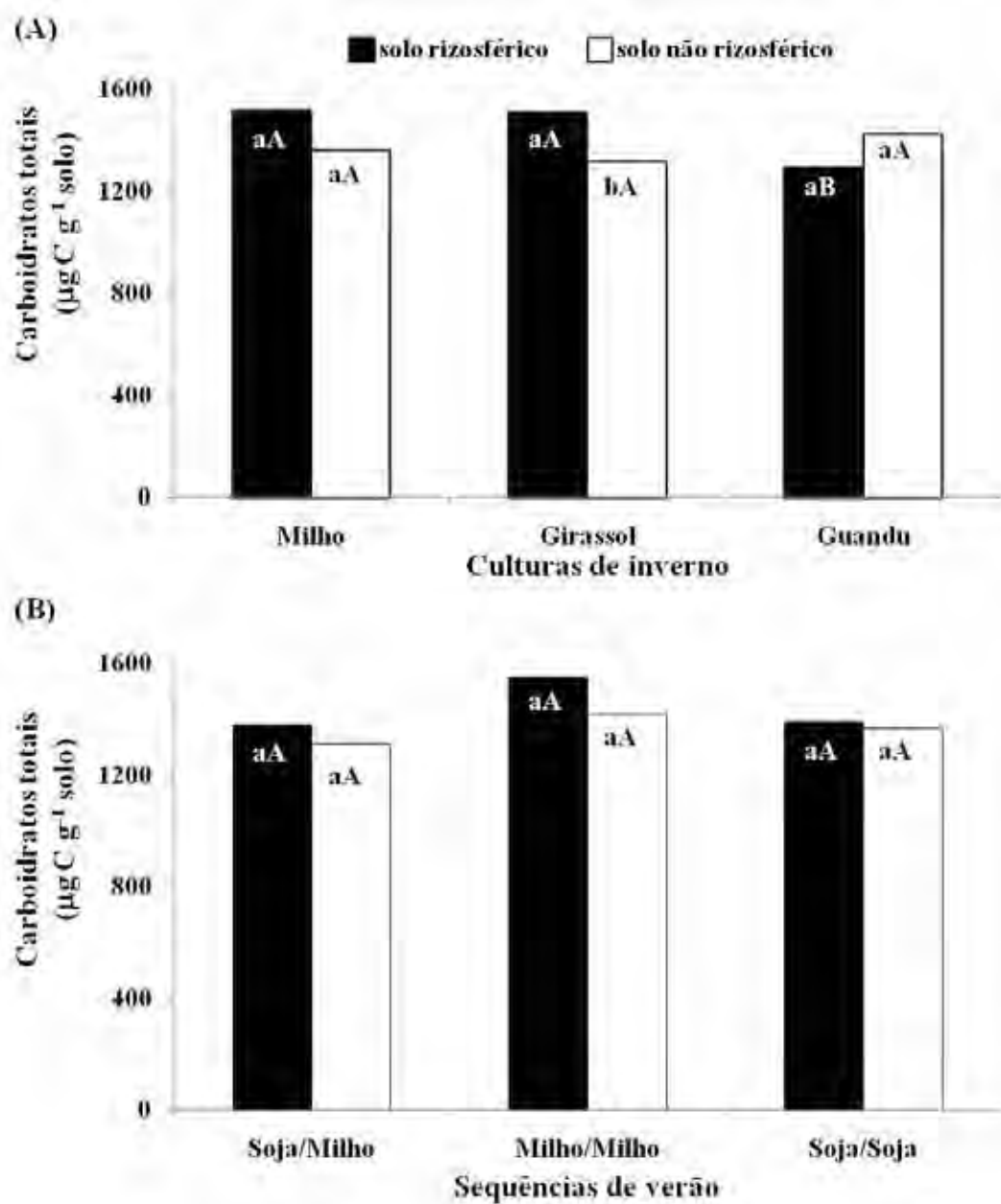


Figura 6. Efeito das culturas de inverno (A) e das sequências de verão (B) em sistema de semeadura direta, no teor de carboidratos totais encontrado em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR). Médias seguidas da mesma letra minúscula (SR e SNR) e maiúscula (culturas de inverno e sequências de verão) não diferem entre si pelo Teste Tukey $p < 0,05$.

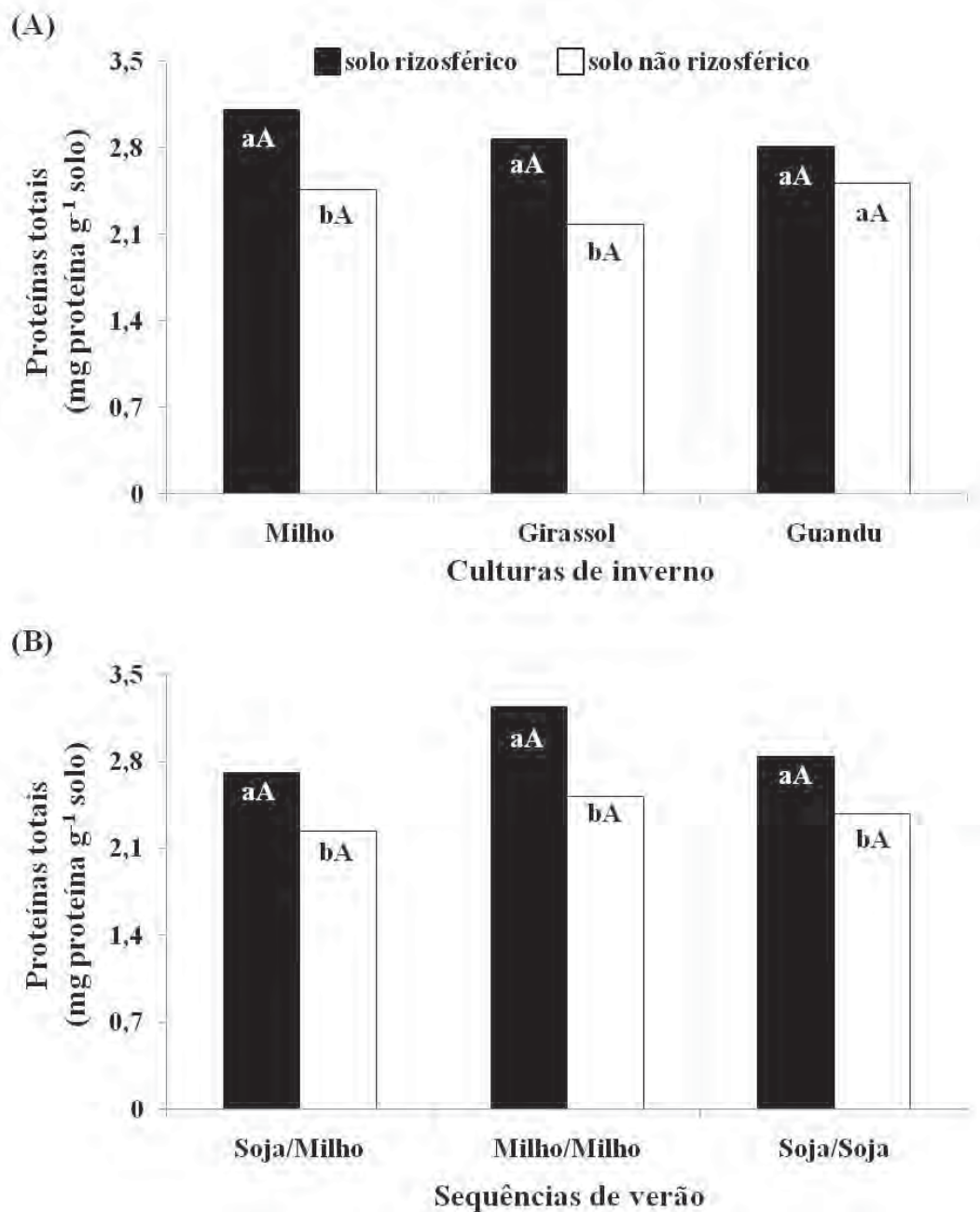


Figura 7. Efeito das culturas de inverno **(A)** e das sequências de verão **(B)** em sistema de semeadura direta, no teor de proteínas totais encontrado em solo rizosférico (SR) e solo não rizosférico (SNR). Médias seguidas da mesma letra minúscula (SR e SNR) e maiúscula (culturas de inverno e sequências de verão) não diferem entre si pelo Teste Tukey $p < 0,05$.

Na Tabela 5 foram incluídas as médias gerais dos resultados com a finalidade de verificar o efeito do solo rizosférico (SR/SNR) sobre as variáveis estudadas. Excetuando os teores de carboidratos totais, os valores observados no SR foram significativamente maiores, em média 45%, do que no SNR. As atividades da celulase, protease e urease no SR foram 85, 62 e 100% maiores do que no SNR. O efeito da rizosfera para as demais variáveis variou de 16 a 21%.

Tabela 5. Efeito rizosférico sobre a atividade das enzimas amilase, celulase, protease e urease e valores das análises químicas carboidratos totais, proteínas totais, carbono orgânico.

Variáveis	SR	SNR	SR/SNR	Probabilidade
Amilase (μg glicose g^{-1} solo 24h^{-1})	221,0 a	191,2 b	116	9,45*
Celulase (μg glicose g^{-1} solo 24h^{-1})	276,1 a	149,4 b	185	75,83*
Protease (μg tirosina g^{-1} solo h^{-1})	63,1 a	39,0 b	162	97,51*
Urease (μg N-NH ₄ g^{-1} solo 3h^{-1})	64,7 a	32,4 b	200	64,45*
Carboidratos totais (μg C g^{-1} solo)	1550,6 a	1419,0 a	109	2,46 ^{ns}
Proteínas Totais (mg proteína g^{-1} solo)	2,9 a	2,4 b	121	24,10*
Carbono orgânico Total (mg C g^{-1} solo)	15,9 a	13,1 b	121	80,44*
Média			145	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

4.2. EXPERIMENTO 2- HABILIDADE METABÓLICA DOS FUNGOS RIZOSFÉRICOS

Os resultados obtidos na Tabela 6 mostram que comparando as contagens de fungos e de bactérias do SR em relação ao SNR: a) o número de UFC de fungos do SR foi em média 2,6 vezes maior do que o do SNR e o de bactérias de 1,8. b) o SR da cultura de inverno milho promoveu as maiores contagens de fungos e de bactérias em relação ao SNR; c) o número de UFC de fungos e de bactérias foi maior ($p < 0,05$) no SR do milho em relação ao SR das demais culturas de inverno, nas sequências de verão milho/milho e soja/soja; d) O guandu e o girassol, respectivamente nas sequências de verão soja/milho e milho/milho, influenciaram nas maiores contagens dos fungos totais no SR em relação ao SNR (Tabela 6); e) nenhuma diferença significativa foi observada nas contagens de fungos e de bactérias no SNR das culturas de inverno e f) não foram observadas diferenças significativas no número de UFC de fungos e bactérias quando comparadas as sequências de verão.

Após a quantificação dos fungos e bactérias do solo rizosférico e não rizosférico foram isolados apenas os fungos do solo rizosférico. Foram obtidos 501 isolados distribuídos nos nove tratamentos (combinações das três sequências de verão com as três culturas de inverno) e a habilidade metabólica desses isolados foi estudada. A Tabela 7 mostra os números das unidades formadoras de colônias dos fungos envolvidos nas transformações de diferentes compostos no solo por meio da atividade amilolítica, ureolítica, celulolítica, proteolítica e quitinolítica.

Exceto para os fungos com atividade ureolítica, as contagens dos fungos para as demais atividades não foram influenciadas pelas sequências de verão ($p < 0,05$). Sendo assim, os fungos ureolíticos foram influenciados pelas sequências de verão soja/milho e milho/milho que promoveram maiores contagens que a sequência soja/soja (Tabela 7).

A cultura de inverno milho promoveu os maiores valores de contagem ($p < 0,05$) para os fungos amilolíticos e celulolíticos em relação às demais culturas de inverno. Também o milho, promoveu os maiores números dos fungos proteolíticos na sequência soja/soja, dos ureolíticos nas sequências soja/milho e milho/milho e dos quitinolíticos na sequência milho/milho (Tabela 7).

Tabela 6. Fungos e bactérias do solo rizosférico das culturas de inverno em rotação com sequências de verão em sistema de semeadura direta.

Tratamentos		Solo rizosférico	Solo não rizosférico	Solo rizosférico	Solo não rizosférico
Sequência de verão	Cultura de inverno	Fungos		Bactérias	
		ufc x 10 ⁵ g ⁻¹ solo seco		ufc x 10 ⁶ g ⁻¹ solo seco	
Soja/milho	Milho	19,86 a	9,30 b	31,91 a	13,37 b
	Girassol	7,74 a	6,04 a	27,22 a	15,08 a
	Guandu	17,45 a	6,65 b	18,57 a	13,22 a
Milho/milho	Milho	32,81 aA	6,19 b	36,61 aA	12,53 b
	Girassol	17,77 a	6,93 b	23,60 a	14,67 a
	Guandu	9,94 a	7,67 a	15,42 a	13,17 a
Soja/soja	Milho	22,18 aA	4,03 b	35,44 aA	11,75 b
	Girassol	6,76 a	4,43 a	20,37 a	16,25 a
	Guandu	7,95 a	4,55 a	14,81 a	13,26 a
Teste F					
		Fungos	Bactérias		
Sequência de verão (V)		3,24 ^{ns}	0,13 ^{ns}		
Culturas de inverno (I)		7,98*	6,37*		
Posição no solo (R)		32,79*	30,40*		
V x I		0,93 ^{ns}	0,15 ^{ns}		
V x R		1,16 ^{ns}	0,12 ^{ns}		
I x R		6,86*	6,37*		
V x I x R		1,63 ^{ns}	0,34 ^{ns}		
CV %		56	38		

Letras iguais minúsculas na linha (comparando solo rizosférico e solo não rizosférico) não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de significância. Médias com a letra 'A' são maiores que as demais ($p < 0,05$) na coluna (comparando as culturas de inverno dentro de cada sequência de verão). * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela 7. Fungos amilolíticos (AMIL), ureolíticos (URE), celulolíticos (CEL), proteolíticos (PROT) e quitinolíticos (QUIT) isolados de rizosfera de culturas de inverno em rotação com sequências de verão em sistema de semeadura direta.

Tratamentos		AMIL	URE	CEL	PROT	QUIT
Sequência de verão	Cultura de inverno	UFC x 10 ⁴ g ⁻¹ solo seco				
Soja/milho	Milho	4,5A	4,4Aa	6,3A	2,8	0,20
	Girassol	1,8	1,6	2,5	1,5	0,10
	Guandu	2,3	2,6	3,2	2,6	ND
Milho/milho	Milho	4,2A	4,1Aa	5,0A	3,5	0,40A
	Girassol	1,9	2,0	1,9	2,2	0,03
	Guandu	1,5	1,5	2,4	1,6	ND
Soja/soja	Milho	4,0A	2,7	4,9A	3,0A	0,10
	Girassol	1,0	1,0	1,3	1,1	0,07
	Guandu	1,3	1,1	1,5	1,1	0,10
		Teste F				
Sequências de verão (V)		0,97 ^{ns}	3,73*	2,10 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,36 ^{ns}
Cultivos de inverno (I)		14,74*	12,38*	14,18*	5,85*	3,38*
(V) x (I)		0,14 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,83 ^{ns}	1,34 ^{ns}
CV %		47	44	47	48	148

Médias com a letra 'A' são maiores que as demais ($p < 0,05$) na coluna (comparando as culturas de inverno dentro das sequências de verão) e com a letra 'a' são maiores que as demais ($p < 0,05$) na coluna (comparando as sequências de verão). * ($p < 0,05$); ^{ns} (não significativo); ND- não detectada.

A atividade relativa dos fungos amilolíticos isolados do solo rizosférico das culturas de inverno em rotação com as sequências de verão está apresentada na Tabela 8. Foi observado que do total de fungos isolados 47% apresentaram atividade amilolítica, e que porcentagens decrescentes foram observadas a partir do menor índice de atividade enzimática (IE de 1,00-1,49), que representou 39,58%, para maior (IE \geq 2,00) com 1,28% do total. A Figura 8a mostra o halo hialino de degradação promovido pela amilase. A maior frequência de fungos com atividade amilolítica (IE de 1,00-1,49) acima da média (39,58%) foi observada no SR do guandu cultivado após a sequência soja/soja e SR de girassol e guandu cultivados após a sequência soja/milho. Verificou-se, também, maior número de fungos com IE de 1,50-1,99 no SR de guandu após a sequência soja/soja e SR de milho e girassol após a sequência milho/milho, respectivamente. Os isolados com maior IE \geq 2,00 foram verificados no SR de milho após soja/soja e SR de milho e guandu após milho/milho (Tabela 8).

Para a atividade relativa dos fungos ureolíticos foi observado que mais de 45% do total de isolados apresentaram essa atividade. A maior frequência foi observada na menor faixa de IE de 1,01-1,99, sendo que as culturas de inverno guandu sobre as sequências de verão soja/milho e milho/milho e a cultura do girassol sobre soja/soja apresentaram as maiores porcentagens de fungos ureolíticos. Os IE's \geq 2,00 (IE de 2,00-2,99 e IE \geq 3,00) somaram-se mais de 20% do total dos isolados com alta atividade ureolítica, sendo que o SR das culturas de girassol e guandu sobre a sequência soja/milho apresentaram as maiores porcentagens no IE = 2-2,99 e o SR das culturas de inverno milho e girassol sobre soja/milho e guandu sobre soja/soja apresentaram as maiores porcentagens de fungos ureolíticos com IE \geq 3,00 (Tabela 9). A atividade ureolítica foi detectada pelo halo azul em volta da colônia decorrente da diminuição do pH do meio de cultura pela presença da enzima urease (Figura 8b).

Dos 501 isolados, mais de 61% apresentaram atividade celulolítica, conforme descrito na Tabela 10. A maior frequência relativa foi observada no IE de 1,01-1,49 com 33,67% decrescendo até a maior faixa (IE \geq 2,00) com 13,05% do total. As culturas de inverno girassol e guandu após a sequências soja/milho apresentaram as maiores porcentagens para esses fungos com IE = 1,01-1,99. Para IE = 1,50 a 1,99, as maiores

porcentagens foram observadas nas culturas o milho sobre milho/milho e girassol sobre soja/soja e a maior porcentagem dos fungos celulolíticos com $IE \geq 2$ foi verificada na cultura de inverno guandu sobre a sequência de verão milho/milho (Tabela 10). A atividade celulolítica foi detectada por meio da formação do halo hialino em torno da colônia devido à degradação do substrato carboximetilcelulose pela enzima celulase (Figura 8c).

Para a atividade relativa dos fungos proteolíticos foi observado que 58,05% dos isolados não apresentaram essa atividade e que a maioria dos isolados proteolíticos (40,42%) apresentaram atividade na menor faixa de IE (1,01-1,49), sendo que a culturas de inverno guandu após a sequência de verão soja/milho e as culturas girassol e guandu sobre a sequência soja/soja apresentaram as maiores porcentagens desses isolados (Tabela 11). A cultura de inverno milho sobre soja/soja apresentou a maior porcentagem de isolados de fungos proteolíticos no IE = 1,50-1,99. A atividade proteolítica dos fungos foi detectada pela formação de um halo hialino de degradação da caseína promovida pela enzima protease (Figura 8d).

Do total de fungos isolados, a grande maioria (mais de 97%) não apresentou atividade quitinolítica, e os 2,79% que apresentaram essa atividade retiva estão na menor faixa do IE (1,01-1,49). A cultura de inverno guandu nas sequências soja/milho e milho/milho não foram detectados nenhum isolado com atividade quitinolítica, e na sequência soja/soja apresentou a maior porcentagem (Tabela 12). Na Figura 8e está o isolado 648 com halo ao redor da colônia indicando a atividade quitinolítica.

Tabela 8. Porcentagem de fungos amilolíticos isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) – mm				
			ND	1,01-1,49	1,50-1,99	$\geq 2,00$	Amilolíticos
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	55,43	38,04	5,43	1,09	44,57
Soja/Milho	Girassol	63	50,79	46,03	3,17	0,00	49,21
Soja/Milho	Guandu	49	53,06	40,82	4,08	2,04	46,94
Milho/milho	Milho	42	52,38	38,10	7,14	2,38	47,62
Milho/milho	Girassol	43	60,47	27,91	11,63	0,00	39,53
Milho/milho	Guandu	56	55,36	41,07	1,79	1,79	44,64
Soja/soja	Milho	64	54,69	39,06	6,25	0,00	45,31
Soja/soja	Girassol	48	54,17	37,50	4,17	4,17	45,83
Soja/soja	Guandu	44	40,91	47,73	11,36	0,00	59,09
Média			53,03	39,58	6,11	1,28	46,97

ND- não detectada.

Tabela 9. Porcentagem de fungos ureolíticos isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) – mm				
			ND	1,01-1,99	2,00-2,99	$\geq 3,00$	Ureolíticos
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	46,74	9,78	15,22	28,26	53,26
Soja/Milho	Girassol	63	55,56	14,29	20,63	9,52	44,44
Soja/Milho	Guandu	49	44,90	34,69	20,41	0,00	55,10
Milho/milho	Milho	42	54,76	26,19	16,67	2,38	45,24
Milho/milho	Girassol	43	60,47	30,23	9,30	0,00	39,53
Milho/milho	Guandu	56	57,14	32,14	10,71	0,00	42,86
Soja/soja	Milho	64	68,75	18,75	10,94	1,56	31,25
Soja/soja	Girassol	48	54,17	33,33	8,33	4,17	45,83
Soja/soja	Guandu	44	50,00	22,73	15,91	11,36	50,00
Média			54,72	24,68	14,24	6,36	45,28

ND- não detectada.

Tabela 10. Porcentagem de fungos celulolíticos isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) – mm				
			ND	1,01-1,49	1,50-1,99	$\geq 2,00$	Celulolíticos
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	38,04	36,96	14,13	10,87	61,96
Soja/Milho	Girassol	63	23,81	49,21	15,87	11,11	76,19
Soja/Milho	Guandu	49	36,73	42,86	6,12	14,29	63,27
Milho/milho	Milho	42	42,86	21,43	21,43	14,29	57,14
Milho/milho	Girassol	43	60,47	18,60	9,30	11,63	39,53
Milho/milho	Guandu	56	32,14	32,14	7,14	28,57	67,86
Soja/soja	Milho	64	43,75	35,94	15,63	4,69	56,25
Soja/soja	Girassol	48	41,67	25,00	25,00	8,33	58,33
Soja/soja	Guandu	44	29,55	40,91	15,91	13,64	70,45
Média			38,78	33,67	14,50	13,05	61,22

ND- não detectada.

Tabela 11. Porcentagem de fungos proteolíticos isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) – mm				
			ND	1,01-1,49	1,50-1,99	$\geq 2,00$	Proteolíticos
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	72,83	27,17	0,00	0,00	27,17
Soja/Milho	Girassol	63	55,56	41,27	3,17	0,00	44,44
Soja/Milho	Guandu	49	53,06	46,94	0,00	0,00	46,94
Milho/milho	Milho	42	61,90	38,10	0,00	0,00	38,10
Milho/milho	Girassol	43	58,14	41,86	0,00	0,00	41,86
Milho/milho	Guandu	56	55,36	41,07	3,57	0,00	44,64
Soja/soja	Milho	64	65,63	29,69	4,69	0,00	34,38
Soja/soja	Girassol	48	50,00	50,00	0,00	0,00	50,00
Soja/soja	Guandu	44	50,00	47,73	2,27	0,00	50,00
Média			58,05	40,42	1,53	0,00	41,95

ND- não detectada.

Tabela 12. Porcentagem de fungos quitinolíticos isolados de solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) – mm				
			ND	1,01-1,49	1,50-1,99	$\geq 2,00$	Quitinolíticos
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	95,65	4,35	0,00	0,00	4,35
Soja/Milho	Girassol	63	96,83	3,17	0,00	0,00	3,17
Soja/Milho	Guandu	49	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Milho/milho	Milho	42	95,24	4,76	0,00	0,00	4,76
Milho/milho	Girassol	43	97,67	2,33	0,00	0,00	2,33
Milho/milho	Guandu	56	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Soja/soja	Milho	64	98,44	1,56	0,00	0,00	1,56
Soja/soja	Girassol	48	97,92	2,08	0,00	0,00	2,08
Soja/soja	Guandu	44	93,18	6,82	0,00	0,00	6,82
Média			97,21	2,79	0,00	0,00	2,79

ND- não detectada.

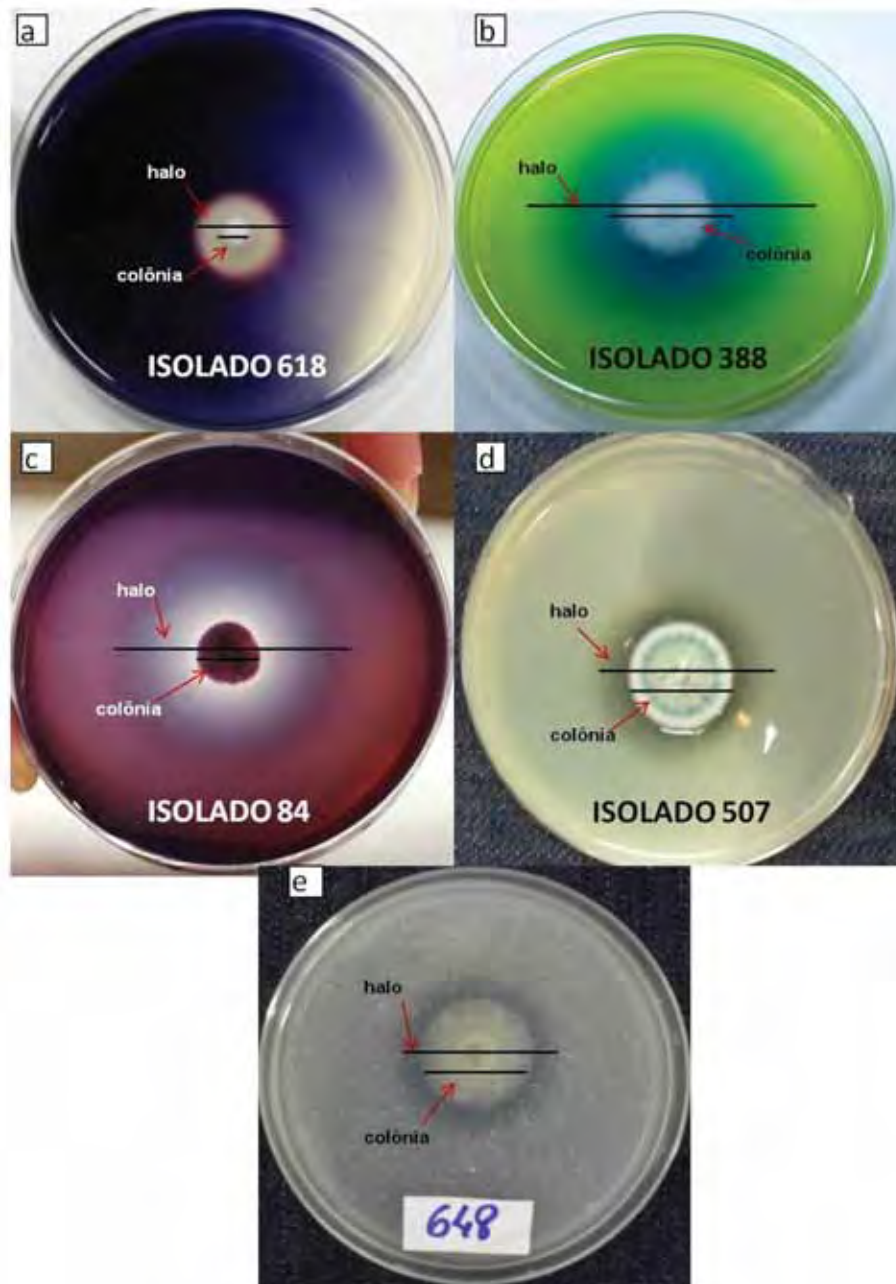


Figura 8. Produção de enzimas extracelulares pelos diferentes isolados de fungos indicada pela formação do halo ao redor da colônia do isolado. **a)** amilase- isolado 618; **b)** celulase- isolado 84; **c)** protease- isolado 507; **d)** urease- isolado 388; e, **e)** quitinase- isolado 648.

As contagens dos fungos envolvidos na promoção direta ou indireta de crescimento de plantas como os solubilizadores de fosfato, os produtores de ácido indolacético (AIA), produtores de ácido cianídrico (HCN) e produtores de sideróforos, e ainda, a porcentagem de colonização micorrízica das culturas de inverno, estão apresentadas na Tabela 13.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as sequências de verão sobre as contagens desses grupos de fungos, bem como para a colonização micorrízica (Tabela 13). A cultura do milho, novamente se destacou, influenciando as maiores contagens ($p < 0,05$) dos fungos solubilizadores de fosfato, dos produtores de AIA e dos produtores de sideróforos quando comparadas às demais culturas de inverno. Para os fungos produtores de HCN não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as culturas de inverno, assim como para as sequências de verão. Também não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a porcentagem de colonização micorrízica das culturas de inverno milho, girassol e guandu.

Tabela 13. Fungos solubilizadores de fosfato (SOL), produtores de ácido indolacético (AIA), produtores de ácido cianídrico (HCN) e produtores de sideróforos (SID) isolados do solo rizosférico e porcentagem de colonização micorrízica (MIC) de culturas de inverno em rotação com sequências de verão em sistema de semeadura direta.

Sequência de verão	Cultura de inverno	SOL	AIA	HCN	SID	MIC
		UFC x 10 ⁴ g ⁻¹ solo seco				
Soja/milho	Milho	4,4A	2,0A	1,0	5,9A	53,60
	Girassol	1,1	0,5	0,7	1,5	54,96
	Guandu	1,3	1,1	1,2	2,8	50,24
Milho/milho	Milho	4,8A	2,1A	1,1	4,7A	44,40
	Girassol	1,3	0,4	1,2	1,9	50,22
	Guandu	1,5	0,3	0,5	1,2	53,53
Soja/soja	Milho	4,0A	1,8A	0,8	4,4A	55,03
	Girassol	1,0	0,5	0,6	1,0	54,07
	Guandu	0,9	0,4	0,2	1,1	46,98
Teste F						
Sequências de verão (V)		0,39 ^{ns}	1,43 ^{ns}	1,91 ^{ns}	1,40 ^{ns}	1,19 ^{ns}
Cultivos de inverno (I)		18,94 [*]	38,31 [*]	1,42 ^{ns}	14,08 [*]	0,75 ^{ns}
(V) x (I)		0,03 ^{ns}	1,43 ^{ns}	1,62 ^{ns}	0,33 ^{ns}	2,34 ^{ns}
CV %		58	39	96	57	9

Médias com a letra 'A' são maiores que as demais na coluna (comparando as culturas de inverno) pelo Teste Tukey a 5% de significância. * ($p > 0,05$); ^{ns} (não significativo).

A solubilização de fosfato relativa dos isolados de fungos está representada na Tabela 14. Aproximadamente 40% dos isolados avaliados foram solubilizadores de fosfato, apresentando porcentagens decrescentes a partir da menor faixa de IE (IE de 1,01-1,49), que apresentou 36,26% para maior (IE \geq 2,00) com 1,09% do total. As culturas milho sobre a sequência de verão milho/milho e girassol sobre soja/soja apresentaram as maiores porcentagens de isolados solubilizadores de fosfato no IE = 1,01-1,49. As culturas de inverno milho e girassol sobre a sequência de verão soja/milho apresentaram as maiores porcentagens de solubilizadores na no I = 1,50-1,99 e a cultura milho sobre as sequências soja/milho e soja/soja apresentaram as maiores porcentagens dos isolados solubilizadores de fosfato com IE \geq 2,00 (Tabela 14). A solubilização de fosfato está representada na Figura 9a por meio da formação do halo hialino em torno da colônia devido a produção de ácidos orgânicos pelo fungo que solubilizou o fósforo do precipitado CaHPO_4 .

A produção AIA relativa dos isolados de fungos estão na Tabela 15. Verificou-se que aproximadamente 19% do total de isolados fúngicos produziram AIA, sendo divididos em rosa com 17,75% e rosa intenso com 1,23%. A intensidade da coloração no papel filtro sobre os isolados pode estar relacionada com a maior produção de AIA, e a maior porcentagem de isolados que apresentou essa maior intensidade na coloração rosa foi verificada na cultura de inverno guandu sobre a sequência de verão milho/milho (Tabela 15). A produção de AIA está representada na Figura 9b por meio da coloração rosa intenso no papel filtro, promovida pela reação com a solução de Salkowski, que é uma solução reveladora da produção de AIA pelos fungos através do precursor desse hormônio L-Triptofano que foi previamente adicionado ao meio de cultura.

A produção de HCN relativa dos isolados estão na Tabela 16. Foram observados que em média 10,8% do total dos isolados fúngicos produziram HCN, sendo 7,5% apresentando coloração laranja e 3,3% laranja intenso. As maiores porcentagens de isolados produtores de HCN foram verificadas no SR das culturas girassol e guandu sobre as sequências de verão milho/milho. A produção de HCN foi detectada através da coloração laranja do papel filtro previamente embebido em solução de ácido pícrico,

que reagiu com a glicina e o ferro, que são substâncias que estimulam a produção desse composto pelos fungos (Figura 9c).

As porcentagens relativas dos isolados que produziram sideróforos por meio do avanço na coloração/dia nos diferentes tratamentos estão representados na Tabela 17. Foram observados que aproximadamente 48% dos isolados estudados produziram sideróforos, e que a maior frequência dos isolados (16,97%) estão na maior faixa de avanço da coloração/dia ($\geq 3,00$ mm). A cultura de inverno milho sobre a sequência de verão milho/milho apresentou as maiores porcentagens de fungos produtores de sideróforos nas faixas de avanço 0,10-1,00 mm e 1,01-2,00 mm. O SR do milho sobre soja/soja promoveu a maior porcentagem de isolados produtores desse composto na faixa 2-2,99 mm. As culturas de inverno milho e girassol sobre a sequência soja/milho apresentaram as maiores porcentagens de fungos sideróforos com avanço da coloração diário $\geq 3,00$ mm. A produção de sideróforos foi detectada na porção azul do meio de cultura (CAS-ágar) por meio do avanço da coloração rósea ou amarela devido à complexação do ferro presente no meio de cultura pelos sideróforos produzidos pelos fungos (Figura 9d).

Tabela 14. Porcentagem de fungos solubilizadores de fosfato isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Índice de atividade enzimática ($\phi h/\phi c$) - mm				Solubilizadores de Fosfato
			ND	1,01-1,49	1,50-1,99	$\geq 2,00$	
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%				
Soja/Milho	Milho	92	58,70	34,78	3,26	3,26	41,30
Soja/Milho	Girassol	63	74,60	23,81	0,00	1,59	25,40
Soja/Milho	Guandu	49	73,47	26,53	0,00	0,00	26,53
Milho/milho	Milho	42	45,24	50,00	4,76	0,00	54,76
Milho/milho	Girassol	43	72,09	23,26	4,65	0,00	27,91
Milho/milho	Guandu	56	58,93	37,50	1,79	1,79	41,07
Soja/soja	Milho	64	51,56	43,75	1,56	3,13	48,44
Soja/soja	Girassol	48	54,17	45,83	0,00	0,00	45,83
Soja/soja	Guandu	44	59,09	40,91	0,00	0,00	40,91
Média			60,87	36,26	1,78	1,09	39,13

ND- não detectada.

Tabela 15. Porcentagem de fungos produtores de ácido indolacético (AIA) isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Coloração			
			ND	Rosa	Rosa intenso	AIA
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%			
Soja/Milho	Milho	92	73,91	26,09	0,00	26,09
Soja/Milho	Girassol	63	84,13	14,29	1,59	15,87
Soja/Milho	Guandu	49	81,63	18,37	0,00	18,37
Milho/milho	Milho	42	76,19	23,81	0,00	23,81
Milho/milho	Girassol	43	88,37	11,63	0,00	11,63
Milho/milho	Guandu	56	85,71	10,71	3,57	14,29
Soja/soja	Milho	64	82,81	15,63	1,56	17,19
Soja/soja	Girassol	48	79,17	18,75	2,08	20,83
Soja/soja	Guandu	44	77,27	20,45	2,27	22,73
Média			81,02	17,75	1,23	18,98

ND- não detectada.

Tabela 16. Porcentagem de fungos produtores de ácido cianídrico (HCN) isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Coloração			
			ND	Laranja	Laranja intenso	HCN
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%			
Soja/Milho	Milho	92	93,5	5,4	1,1	6,5
Soja/Milho	Girassol	63	96,8	0,0	3,2	3,2
Soja/Milho	Guandu	49	83,7	8,2	8,2	16,3
Milho/milho	Milho	42	88,1	9,5	2,4	11,9
Milho/milho	Girassol	43	74,4	14,0	11,6	25,6
Milho/milho	Guandu	56	85,7	10,7	3,6	14,3
Soja/soja	Milho	64	92,2	7,8	0,0	7,8
Soja/soja	Girassol	48	97,9	2,1	0,0	2,1
Soja/soja	Guandu	44	90,9	9,1	0,0	9,1
Média			89,2	7,5	3,3	10,8

ND- não detectada.

Tabela 17. Porcentagem de fungos produtores de sideróforos isolados do solo rizosférico de culturas de inverno em rotação com culturas de verão no sistema de semeadura direta.

Tratamentos			Avanço da coloração/dia (mm)					Sideróforos
			ND	0,1-1,0	1,01-2,00	2,01-2,99	≥ 3,00	
Sequências de Verão	Culturas de Inverno	Total de isolados	%					
Soja/Milho	Milho	92	41,30	7,61	16,30	13,04	21,74	58,70
Soja/Milho	Girassol	63	46,03	6,35	9,52	15,87	22,22	53,97
Soja/Milho	Guandu	49	55,10	8,16	12,24	8,16	16,33	44,90
Milho/milho	Milho	42	47,62	9,52	21,43	7,14	14,29	52,38
Milho/milho	Girassol	43	58,14	2,33	13,95	9,30	16,28	41,86
Milho/milho	Guandu	56	66,07	0,00	8,93	10,71	14,29	33,93
Soja/soja	Milho	64	53,13	1,56	14,06	18,75	12,50	46,88
Soja/soja	Girassol	48	54,17	0,00	14,58	16,67	14,58	45,83
Soja/soja	Guandu	44	47,73	2,27	15,91	13,64	20,45	52,27
Média			52,14	4,20	14,10	12,59	16,97	47,86

ND- não detectada.

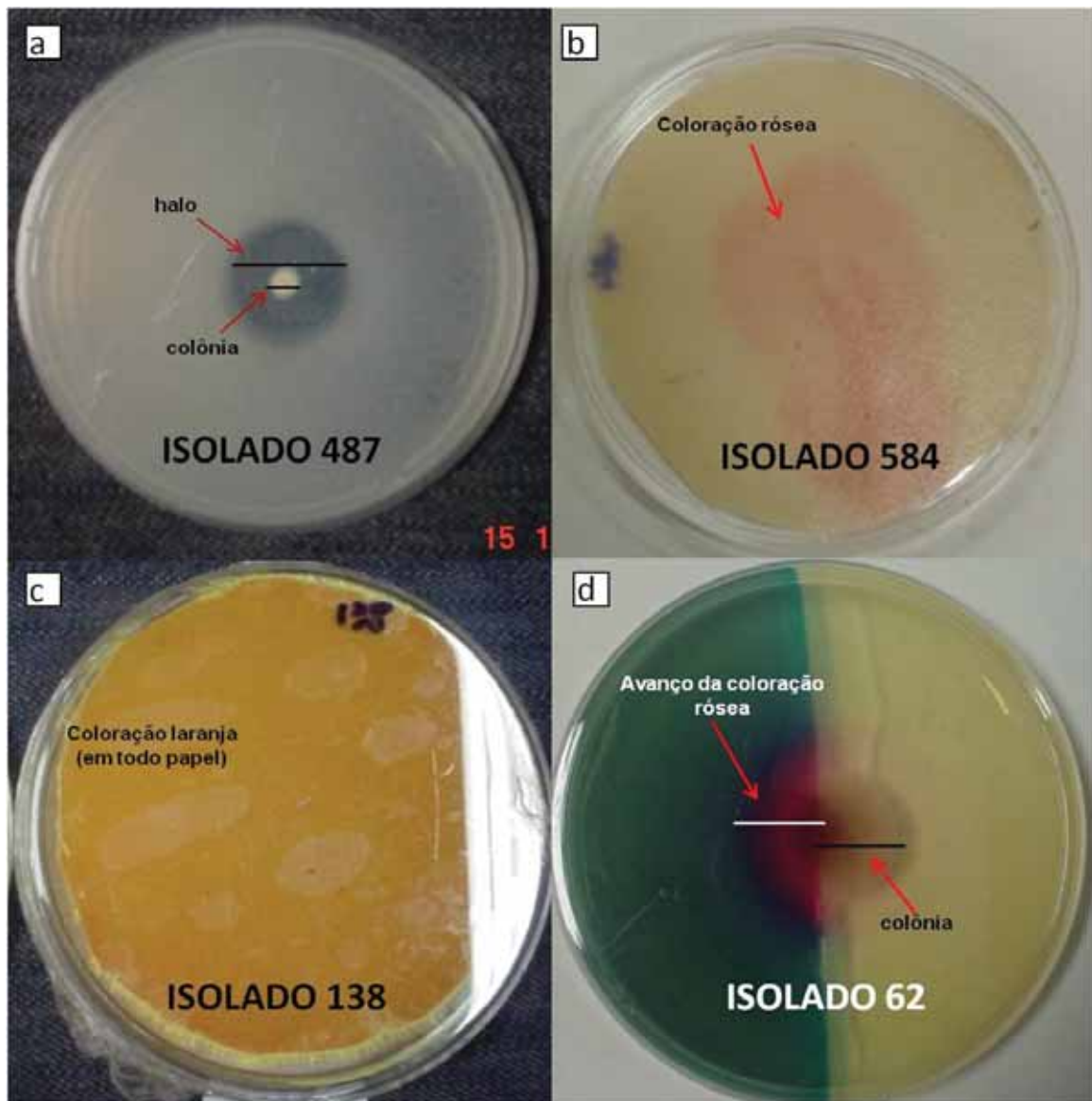


Figura 9. Produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas pelos diferentes isolados de fungos: **a)** solubilização de fosfato indicada pela formação do halo hialino ao redor da colônia do isolado 487; **b)** produção de AIA indicada pela coloração rósea no papel filtro; **c)** produção de HCN indicada pela coloração laranja no papel filtro e **d)** produção de sideróforos indicada pelo avanço da coloração rósea no meio CAS-ágar (na porção azul).

Na Tabela A6 (Apêndice, pág. 99) foram incluídos os resultados das atividades amilolítica, celulolítica, proteolítica, ureolítica, quitinolítica, solubilização de fosfato, produção de AIA, produção de HCN e produção de sideróforos dos isolados. Do total de 501 fungos, 455 isolados apresentaram uma ou mais atividades, assim distribuídas: 67 isolados apresentaram uma atividade, 94 apresentaram duas atividades, 84 isolados apresentaram três atividades, 73 isolados apresentaram quatro atividades, 70 isolados apresentaram cinco atividades, 60 isolados apresentaram seis atividades, 6 isolados apresentaram sete atividades e 1 isolado apresentou oito atividades. Portanto, apenas 46 dos isolados avaliados não apresentaram resposta em nenhuma das atividades avaliadas nesse estudo (isolados não apresentados na Tabela A6).

Do total de isolados, observou-se maior porcentagem de fungos celulolíticos do que os demais grupos estudados (Tabela A6, pág. 99), decrescendo na seguinte ordem: celulolíticos (61%), produtores de sideróforos (48%), amilolíticos (47%), ureolíticos (45%), proteolíticos (42%), solubilizadores de fosfato (39%), produtores de AIA (19%), produtores de HCN (11%) e quitinolíticos (2,8%).

5. DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO 1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E QUÍMICAS DO SOLO

Efeito do solo rizosférico

As enzimas avaliadas fazem parte do ciclo do carbono (amilase e CMC-celulase) e do ciclo do nitrogênio (urease e protease) e são responsáveis por catalisar importantes reações no solo como a hidrólise da ureia pela urease, a degradação de resíduos vegetais pela CMC-celulase e amilase (SHAN et al, 2008) e a mineralização do nitrogênio orgânico pela protease (MONDINI et al., 2008). Estudos prévios mostraram que a atividade dessas enzimas foi maior no SR em relação ao SNR (DINESH et al., 2010; ABDALLA & LANGER, 2009; NANNIPIERI et al., 2007; PANDEY & PALNI, 2007). Em acordo com esses estudos, as atividades da urease, CMC-celulase e protease foram estimuladas no SR das culturas de inverno quando comparadas ao SNR (Figuras 4 e 5 e Tabela 3). Em adição, maiores quantidades de carbono orgânico total e proteína, foram observadas no SR comparado ao SNR (Tabela 4 e Figura 7). Esse resultado está de acordo com KORANDA et al. (2011), que relatam a disponibilidade de alto conteúdo de carbono e de nitrogênio no SR comparado ao SNR em estudo com solo SR e SNR de árvores de floresta na Europa. Interessante ressaltar que o efeito rizosférico sobre a atividade da amilase apenas ocorreu na cultura do girassol (Figura 2). Provavelmente, esta resposta foi decorrente do acúmulo de carboidratos ter ocorrido apenas nessa cultura.

A fração rizosfera atua como componente auxiliando na manutenção e desenvolvimento das plantas. O material depositado no SR inclui compostos de baixo e alto peso molecular como monômeros tais como glicose e aminoácidos, polímeros, tais como polissacarídeos e proteínas, que são substâncias prontamente utilizadas pelos microrganismos, favorecendo a atividade enzimática (PANDEY & PALNI, 2007), além de restos e células de raiz, resíduos e células microbianas e enzimas extracelulares

(NANNIPIERE et al., 2007), o que explica a maior atividade microbiana observada no SR (Tabela 4).

No sistema de cultivo mínimo e de rotação de culturas esse efeito decorre também das interações dos resíduos vegetais que afetam o fluxo de energia e nutrientes das raízes das plantas (BAREA et al., 2005). Em estudo de BALOTA et al. (2004), avaliando a biomassa e a atividade microbiana em solo sob sistema de semeadura direta e as rotações de culturas soja/trigo, milho/trigo e algodão/trigo, verificaram o aumento da atividade enzimática bem como o aumento da biomassa microbiana, atribuindo esse aumento à melhoria das condições físicas e químicas do solo.

Efeito das culturas

Dentre as culturas de inverno, a cultura do milho estimulou mais as atividades das enzimas amilase, CMC-celulase, urease e protease do SR do que as outras culturas (Figuras 3, 4 e 5 e Tabela 3). Efeito semelhante também foi observado com a atividade das enzimas amilase, urease e protease do SNR. No SR da sequência milho/milho também foi constatado os mais altos teores de carbono orgânico em comparação com as demais sequências (Tabela 4).

Esse resultado pode ser atribuído ao sistema radicular da cultura do milho por ser mais denso e agressivo, que promove benefícios ao solo como em sua estruturação, umidade e na deposição de exsudados e dessa forma beneficiam de forma direta os microrganismos (TEIXEIRA et al., 2003). Além disso, as plantas também constituem fontes de enzimas para o solo sendo possível que a composição química das culturas cultivadas influencie nesse aspecto (MENDES & REIS JÚNIOR, 2004).

As atividades da amilase e da CMC-celulase do SR não foram influenciadas pelas sequências de verão. Contudo, efeito diferenciado ocorreu sobre as atividades da urease e da protease: a atividade da urease foi mais estimulada pelas sequências milho/milho e soja/soja, a da protease aumentou mais sob a influência das sequências milho/milho e soja/milho (Figura 5 e Tabela 3). Em geral, os resultados da atividade das

enzimas do SNR foram similares aos obtidos no SR das sequências de verão. As divergentes respostas apresentadas pelas diferentes plantas sobre a atividade das enzimas podem ser decorrentes do estímulo diferenciado da comunidade microbiana ao efeito da rizosfera (CARAVACA et al., 2004). A rotação de culturas e o sistema de semeadura direta avaliados nesse estudo são manejos que podem influenciar a composição dos exsudados através do tipo e a idade das plantas utilizadas, do metabolismo, da condição nutricional e outros fatores ambientais (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, as quantidades de resíduos vegetais incorporados ao solo, incluindo o sistema radicular morto e a taxa de decomposição desses resíduos, também afetam os fluxos de energia e nutrientes para comunidade microbiana (NANNIPIERE et al., 2007).

As plantas são as principais responsáveis pela adição ao solo de compostos orgânicos primários sintetizados no processo de fotossíntese, que dependendo da quantidade de resíduos depositados no solo poderá resultar em aumento no teor de carbono orgânico do solo (FARIA et al., 2008), bem como de carboidratos e proteínas totais, que são constituintes da matéria orgânica do solo, oriundos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano (GUERRA et al., 2008). Neste estudo, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as culturas de inverno e sequências de verão para as proteínas totais. Os carboidratos totais foram influenciados pelas culturas de inverno milho e girassol (Figura 6).

A falta de significância observada para os teores de carbono orgânico total nas culturas de inverno está de acordo com vários trabalhos. D'ANDREA et al. (2004) não observaram diferenças para o carbono orgânico total em superfície na comparação de sistemas de manejo como plantio direto de milho, feijão e arroz. STEINER et al. (2011) avaliando sistema de produção em rotação ou não com culturas de cobertura (aveia + ervilhaca + nabo/milho/trigo/mucuna + brachiária + crotalária/milho/soja) não verificaram influências significativas nos teores de carbono orgânico do solo, atribuindo tal efeito à rápida mineralização da matéria orgânica dos resíduos vegetais em função das altas temperaturas e umidade. Já o resultado superior no teor de carbono orgânico total observado para sequência de verão milho/milho em relação às demais sequências

(Tabela 4), pode estar relacionado com a menor taxa de decomposição dos resíduos de milho, comparado a soja (MARCELO et al., 2009), tratando-se de um efeito residual da safra de verão. Culturas com sistema radicular abundante e agressivo, que alocam uma fração maior do carbono fotossintetizado para as raízes, podem ser mais eficientes em aumentar os estoques do carbono orgânico total no solo e conseqüentemente no carbono residual (CARNEIRO et al., 2009).

5.2. Experimento 2- Habilidade metabólica dos fungos rizosféricos

Contagem de fungos e bactérias

As contagens de fungos e bactérias obtidas neste estudo (Tabela 6) foram semelhantes às encontradas por MELLONI et al. (2001) em um estudo realizado com solo de mata ciliar, onde obtiveram $7,0 \times 10^5$ e 13×10^6 ufc g⁻¹ solo seco, respectivamente, para fungos e bactérias. A mata ciliar é um sistema estável e com aportes de nutrientes no solo de maneira contínua. Portanto, pode-se sugerir que o sistema de semeadura direta e rotação de culturas vêm promovendo influência positiva nas condições biológicas do solo da área em estudo, visto que mesmo no SNR as contagens foram altas.

As contagens de fungos e bactérias no SR da cultura do milho foram respectivamente, até 5 vezes e 3 vezes maiores que aos das demais culturas (Tabela 6). Esta resposta pode estar relacionada ao sistema radicular denso e de renovação contínua apresentado pelas gramíneas (SPERA et al., 2004). Outros fatores que podem influenciar o aumento do número de microrganismos são a composição e a complexidade química dos exsudados radiculares, que são diferenciadas de acordo com a espécie de planta, estado nutricional, manejo do solo dentre outros fatores ambientais (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007).

Fungos amilolíticos, ureolíticos, celulolíticos, proteolíticos e quitinolíticos

Em geral, os fungos apresentam a capacidade de produzir e secretar enzimas para o meio ambiente com finalidades diversas, incluindo a mineralização da matéria orgânica, disponibilização de nutrientes do solo para plantas e no controle biológico. O uso de meios de cultura sólidos, como os utilizados neste estudo, permite uma triagem rápida de grandes populações de fungos, permitindo a detecção de enzimas específicas e ajudando na diferenciação dos grupos de microrganismos (ALVES et al., 2002).

Para este trabalho, de maneira geral, o número de unidade formadora de colônias dos fungos amilolíticos, ureolíticos, celulolíticos, proteolíticos e quitinolíticos foi mais estimulado no SR da cultura do milho do que nas demais culturas de inverno. Em estudo de SANOMIYA & NAHAS (2003) o número de UFC de fungos amilolíticos, ureolíticos, celulolíticos e proteolíticos foi maior em solo sob braquiária do que sob guandu e em pousio. Embora as contagens dos fungos celulolíticos tenham sido semelhante, o número de fungos amilolíticos, ureolíticos e proteolíticos neste estudo em questão foi 2 a 4 vezes maior que os encontrados por SANOMIYA & NAHAS (2003). Apesar das plantas braquiária e milho serem da mesma família, a superioridade observada neste estudo para a cultura do milho pode ser atribuída ao efeito rizosférico em razão da presença de exsudados e secreções radiculares que representam as maiores fontes de carbono prontamente disponíveis para os microrganismos (ZILLI et al., 2003).

Ficou evidenciado que a cultura de inverno milho também proporcionou o maior número de isolados de fungos (valores absolutos) com atividade amilolítica, ureolítica, celulolítica e quitinolítica em relação às culturas do girassol e guandu, independentemente da sequência de verão (Figura 10). Em adição, o número de isolados com atividade proteolítica foi menor na rizosfera do milho do que nas culturas girassol e guandu, que apresentaram o mesmo número de isolados.

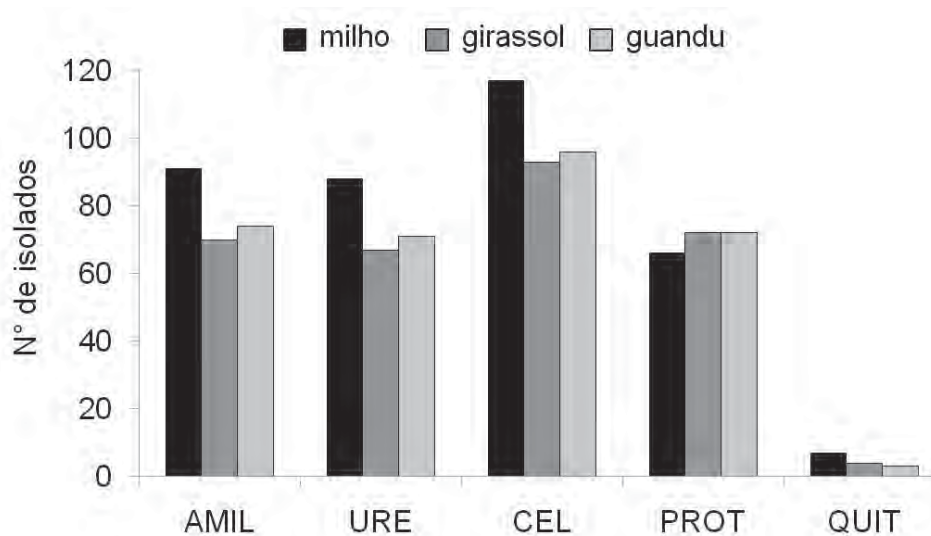


Figura 10. Habilidade metabólica dos fungos isolados da rizosfera das culturas de inverno milho, girassol e guandu. Atividade amilolítica (AMIL), ureolítica (URE), celulolítica (CEL), proteolítica (PROT) e quitinolítica (QUIT).

A porcentagem de fungos amilolíticos obtidos no SR das culturas de inverno milho, girassol e guandu foi de aproximadamente 47% do total de isolados (Tabela 8). MOREIRA & SIQUEIRA (2006) relatam que há poucos microrganismos aptos a degradar o amido, porém o que se observou neste estudo foi o contrário, ou seja, quase metade dos fungos isolados apresentou atividade amilolítica, estando presente em todos os tratamentos avaliados. Em trabalho de MISHRA & DADHICH (2010), com quinze isolados de fungos de solos da Índia, verificaram que todos produziram amilase extracelular, dentre eles: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp., com destaque para o *Aspergillus niger*, considerado altamente produtor dessa enzima. O amido é uma mistura de dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, sendo o mais importante composto orgânico de reserva das plantas (SPIER et al., 2004), portanto, a presença de microrganismos que degradam esse substrato é imprescindível nos sistemas agrícolas, como a semeadura direta e rotação de culturas utilizadas neste estudo, onde há a presença abundante desse substrato.

Os fungos com atividade ureolítica representaram mais de 45% dos isolados estudados (Tabela 9). Esse resultado foi muito superior ao encontrado por SANOMYIA & NAHAS (2003) em estudo com microrganismos produtores de hidrolases em diferentes sistemas de cultivo (pousio, guandu e braquiária), onde verificaram que 13,1% do total de isolados fúngicos obtidos possuíam atividade ureolítica. Essa superioridade pode ser explicada pelo efeito rizosférico mencionada anteriormente, visto que os fungos deste estudo foram isolados da rizosfera das culturas de inverno. O manejo do solo também pode ter influenciado na alta porcentagem de fungos ureolíticos, pois de acordo com CARNEIRO et al. (2008) a atividade da urease é superior em sistemas conservacionistas do solo, como na área deste estudo, que está sob sistema de semeadura direta com rotação de culturas a seis anos. Apesar de não ter sido utilizada ureia nas adubações das culturas deste estudo, a presença dos microrganismos ureolíticos é essencial nos solos agrícolas que utilizam esse fertilizante, pois para aumentar sua eficiência e minimizar as perdas de nitrogênio há a necessidade da presença da urease no solo (OLIVEIRA et al., 2006).

Foi verificada uma alta porcentagem de fungos celulolíticos neste estudo, 61% do total, e destes, mais de 13% do total dos isolados apresentaram alta atividade (IE > 2,0), distribuídos em todos os solos rizosféricos das culturas estudadas (Tabela 10). RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004) em estudo da atividade celulolítica de 80 linhagens de fungos isolados do solo de uma estação ecológica em São Paulo, verificaram que 45% desse total apresentaram atividade celulolítica e que alguns isolados, como *Penicillium herquei* e *Trichoderma hamatum* apresentaram IE > 4, portanto, altamente produtores de celulasas. BALDRIAN et al. (2011) avaliando 29 linhagens de fungos isolados de solo de floresta verificaram que metade desses fungos foram capazes de degradar celulose. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na biomassa vegetal, sendo degradado por uma série de microrganismos por meio da ação de enzimas celulolíticas (MURASHIMA et al., 2002). Os fungos celulolíticos, ao atacarem a celulose, clivam sua molécula de alto peso molecular, desdobrando-a, após uma seqüência de reações, em celobiose (um dissacarídeo, produto da hidrólise incompleta da celulose) e glicose livre. Sendo assim, são microrganismos importantes

na decomposição da matéria orgânica de solos agrícolas, assim como são importantes na promoção de crescimento de plantas por meio da mineralização de nutrientes. Também podem agir como agentes de biocontrole de microrganismos que possuem celulose na composição da parede celular como alguns gêneros de fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* e *Pythium* (LIMA, 1998).

Dos isolados estudados, 42% apresentaram atividade proteolítica, porém não foi observado nenhum isolado com IE > 2,0 mm, considerado bom produtor de enzima (Tabela 11). Apesar disso, esses resultados são bem superiores aos encontrados por SANOMYIA & NAHAS (2003), que verificaram em estudo com isolados de fungos de diferentes sistemas de manejo, que 92,6% dos mesmos não apresentaram atividade proteolítica, e que os 8,4% dos isolados restantes apresentaram IE de 1 a 3 mm. As proteases incluem todas as enzimas que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas (CO-NH) de uma molécula de proteína em peptídeos ou aminoácidos livres (SANDHYA et al., 2005). Participam do ciclo do nitrogênio por meio da mineralização do nitrogênio orgânico no solo (MONDINI et al., 2008), portanto, essas enzimas são importantes em solo com a presença abundante de resíduos vegetais, como na área com sistema de semeadura direta e rotação de culturas deste estudo. Além disso, as proteases atuam na lise de células de alguns fungos fitopatogênicos, como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* entre outros, atuando como biocontroladores de doenças (OLIVEIRA et al., 2003).

Diferentemente das outras enzimas, baixo número de isolados quitinolíticos (2,8 % do total de isolados) foi encontrado neste estudo, inclusive, nenhum representante desse grupo de microrganismos foi verificado no solo da cultura de inverno guandu, nas sequências soja/milho e milho/milho (Tabela 12). Resultado contrário foi relatado por BALDRIAN et al. (2011) que verificaram capacidade de degradação de quitina em 24 de 29 linhagens de fungos isolados de solo de floresta. O baixo número de isolados quitinolíticos encontrados neste trabalho não diminui a importância da presença desses fungos no solo, pois a quitina é o biopolímero mais importante em solos que não se origina da biomassa vegetal. Pesquisas com genomas de fungos filamentosos mostram que os esses possuem entre 10 e 25 quitinases diferentes em comparação com as

bactérias que possuem de 2 a 4 (BALDRIAN et al., 2011). Essa diversidade indica um importante papel desse grupo de fungos na transformação da quitina em solos. Além disso, a produção de quitinase pelos fungos, assim como pelos demais microrganismos, pode ser um mecanismo utilizado no biocontrole, principalmente de fungos fitopatogênicos, considerando que a parede celular desses é composta basicamente por polissacarídeos, como a quitina e glucana, desempenhando importante atividade micoparasítica (ALVARENGA et al., 2007). Várias espécies de fungos como *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens*, *Fusarium chlamydosporum* têm sido relatadas como produtoras de quitinase e eficientes no micoparasitismo de patógenos de solo, assim como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* também têm sido destacadas como fungos entomopatogênicos, devido à presença de quitinases que paralisam o desenvolvimento de ovos de nematóides no solo (DUO-CHUAN, 2006).

Fungos solubilizadores de fosfato, produtores de AIA, produtores de sideróforos e micorrízicos arbusculares.

Como já relatado anteriormente, a cultura do milho comparada às culturas do girassol e guandu, apresenta sistema radicular fasciculado, que caracteriza maior densidade e, ainda, renovação contínua no solo (SPERA et al., 2004), podendo beneficiar os grupos de microrganismos pelo seu efeito rizosférico. Portanto, é provável que essas características tenham promovido os maiores números de solubilizadores de fosfatos, produtores de AIA e produtores de sideróforos no solo rizosférico da cultura de inverno milho comparado às demais culturas (Tabela 13).

Independentemente da sequência de verão, a mesma resposta foi observada, ou seja, a cultura de inverno milho promoveu o maior número de isolados com capacidade de solubilizar fosfato, produzir AIA e produzir sideróforos (Figura 11- dados absolutos).

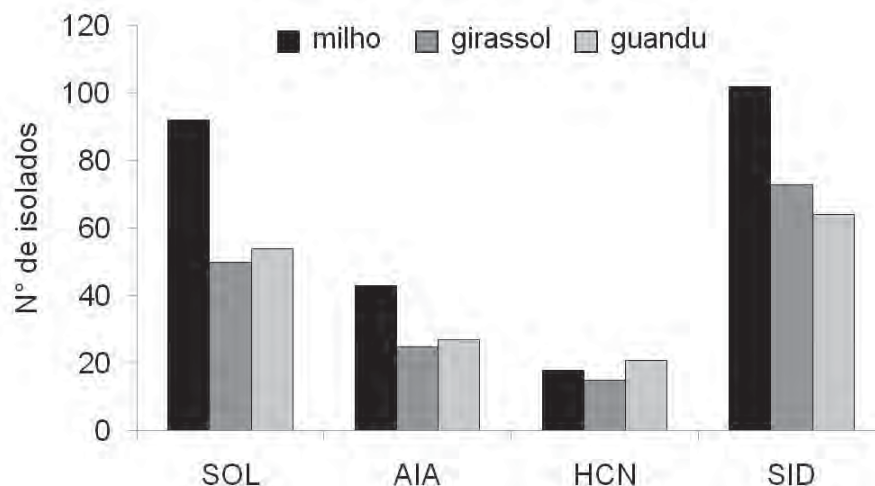


Figura 11. Habilidade metabólica dos fungos isolados da rizosfera das culturas de inverno milho, girassol e guandu. Solubilização de fosfato (SOL), produção de AIA (AIA), produção de ácido cianídrico (HCN) e produção de sideróforos (SID).

A porcentagem de colonização micorrízica foi semelhante entre as culturas estudadas, em média 51, 53 e 50%, respectivamente, para milho, girassol e guandu (Tabela 13). Esses resultados estão de acordo com outros estudos, como por MIRANDA et al. (2001) que em uma área no sistema de plantio direto encontraram 51 e 52%, respectivamente, para girassol e guandu. Em estudo em área com diferentes manejos, CORDEIRO et al. (2005) encontraram em média 42% de colonização micorrízica em milho. A simbiose entre os fungos micorrízicos arbusculares e as plantas possibilitam a promoção do crescimento das mesmas. Os FMA, por meio de suas hifas, permitem a absorção de nutrientes fora da zona de absorção das raízes (especialmente o fósforo que é um elemento imóvel no solo), a absorção de água, o favorecimento da nodulação e a fixação biológica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), o que destaca a importância desses fungos para o estabelecimento e sucesso da cultura nos sistemas agrícolas.

Quanto à solubilização de fosfatos, 39% dos fungos isolados apresentaram essa habilidade metabólica (Tabela 14). Em estudo de HOYOS-CARVAJAL et al. (2009) com 101 fungos do gênero *Trichoderma* isolados de solo rizosférico de diferentes plantas e

de solo não rizosférico, verificaram que 96 foram solubilizadores de fosfato, através da avaliação em meio de cultura, observando que os mesmos produziram ácidos que diminuíram o pH do meio. Segundo SILVA FILHO et al. (2002), fungos envolvidos nos processos de solubilização do fósforo inorgânico excretam ácidos orgânicos que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato. A porcentagem de isolados solubilizadores de fosfato encontrada neste estudo, 39%, está de acordo com SOUCHIE & ABBOUD (2007), que relata que o número de microrganismos solubilizadores é muito variável, podendo ser de 0,1 a 50% da população da microbiota do solo. A alta porcentagem de fungos solubilizadores de fosfato observada no estudo de HOYOS-CARVAJAL et al. (2009), 95%, refere-se apenas a espécies do fungo *Trichoderma*, que é uma espécie tida como promissora na promoção de crescimento de plantas e no biocontrole de patógenos no solo (MELO, 1996). Os fungos solubilizadores de fosfatos são de grande importância para os sistemas agrícolas, pois atuam de maneira direta na promoção de crescimento de plantas, possibilitando às mesmas o aproveitamento de fontes menos solúveis de fósforo do solo (SILVA FILHO et al., 2001; NAHAS et al., 1994).

Os fungos produtores de AIA representaram 19% do total de isolados e estão distribuídos em todos os tratamentos (Tabela 15). HOYOS-CARVAJAL et al. (2009) em estudo com isolados de fungos de solo rizosférico e não rizosférico de diferentes tipos de plantas em solo tropical, verificaram que 60% do total de isolados avaliados apresentaram produção de AIA em meio de cultura, porém, apenas fungos do gênero *Trichoderma* foram avaliados. A produção de reguladores de crescimento ativos como fitohormônios faz parte do metabolismo de algumas espécies de fungos associadas aos vegetais causando modificações na morfologia das raízes, influenciando a absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, promovendo o crescimento vegetal (HASAN, 2002; FURUKAWA & SYONO, 1998). Como os fungos produtores de AIA encontrados neste estudo são habitantes do solo rizosférico, estes podem ter utilizado metabólitos das plantas que eles próprios estimularam o crescimento em virtude de sua produção de fitohormônios, ou seja, os fungos beneficiam as plantas por meio da promoção de

crescimento pelo AIA e estas beneficiam os fungos pelo aumento da produção de exsudados (OLIVEIRA et al., 2003).

Aproximadamente 11% dos isolados apresentaram a produção ácido cianídrico (HCN) que está envolvido indiretamente na promoção do crescimento de plantas (Tabela 16). O HCN age no controle de fungos e bactérias patogênicas do solo através da inibição das enzimas envolvidas nos principais processos metabólicos, incluindo respiração e o transporte de elétrons (DEVI et al., 2007). A presença de microrganismos no solo capazes de produzir essa substância é importante para o biocontrole de patógenos em áreas agrícolas, onde a quantidade de fitopatógenos é grande devido à baixa diversidade de organismos provocada pelas mudanças do sistema de uso da terra.

Os fungos produtores de sideróforos representaram aproximadamente 48% do total de isolados (Tabela 17). Esses resultados assemelham-se aos encontrados por HOYOS-CARVAJAL et al. (2009) em estudo com isolados de fungos de solo rizosférico e não rizosférico de diferentes tipos de plantas em solo tropical, onde observaram que 55% dos isolados avaliados produziram sideróforos, porém apenas fungos do gênero *Trichoderma* foram avaliadas, o que diferencia deste estudo em questão, pois apesar de não ter sido realizada a identificação dos isolados, estes parecem representar diferentes gêneros de fungos. A presença de produtores de sideróforos é muito importante para a promoção do crescimento de vegetais, pois confere aos mesmos, maior competitividade no solo, uma vez que os sideróforos atuam como moléculas sequestradoras de ferro, excretados por microrganismos em resposta a baixa disponibilidade de Fe^{3+} (OLIVEIRA et al., 2003). Esses compostos atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas de ferro em solução e ligando-as especificadamente em receptores do complexo localizado na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim o ferro disponível para o crescimento dos vegetais (NEILANDS & LEONG, 1986). Ao mesmo tempo, os microrganismos sideróforos inibem a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, devido à retenção do Fe^{3+} , tornando-o indisponível para os patógenos (WEI et al., 1996). A presença de isolados que produzem sideróforos ocorreu em todas as culturas estudadas.

Na Tabela A6 (Apêndice, pág. 98) foram relacionados os 455 isolados da rizosfera das culturas de inverno sobre as sequências de verão no sistema de semeadura direta que tiveram uma ou mais habilidades metabólicas avaliadas nesse estudo, representando mais de 90% do total de isolados de fungos.

Por exemplo, o isolado n° 6 apresentou atividade amilolítica, celulolítica, proteolítica, ureolítica, solubilização de fosfato, produção de AIA e produção de sideróforos; portanto sete atividades distintas. O isolado n° 264 apresentou seis atividades diferentes: amilolítica, celulolítica, proteolítica, ureolítica, solubilização de fosfato e produção de AIA e o isolado 167, excetuando a produção de HCN, apresentou atividade em todas as demais avaliações realizadas neste estudo. A diversidade funcional dos microrganismos, segundo TÓTOLA & CHAER (2002), permitem maior compreensão do funcionamento da comunidade microbiana, uma vez que permitem averiguar a redundância funcional do solo, isto é, a existência de populações que desempenham o mesmo papel funcional. Quanto maior a redundância funcional e a diversidade de microrganismos, mais rápido o ecossistema pode retornar às condições originais, ou seja, maior resiliência dos processos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Práticas conservacionistas no solo como a rotação de culturas e o sistema de semeadura direta, utilizados nesse estudo, promovem mudanças na qualidade e quantidade de resíduos comparada aos monocultivos, altera a biomassa microbiana e a dinâmica da comunidade microbiana afetando a ciclagem de nutrientes (WRIGHT et al., 2008) podendo aumentar ou garantir sua biodiversidade do solo. A perda dessa biodiversidade pode acarretar a perda de redundância funcional do ecossistema, levando também a uma menor resiliência, comprometendo talvez a funcionalidade e sustentabilidade do mesmo (TÓTOLA & CHAER, 2002).

A maior frequência dos fungos celulolíticos em relação aos demais grupos avaliados nesse estudo pode estar relacionada com presença contínua de substrato para esses microrganismos, que são os resíduos vegetais aportados pelo sistema de semeadura direta e pela rotação de culturas, utilizados na área experimental há mais de seis anos. Segundo BALDRIAN et al. (2011), fungos saprofíticos são considerados os decompositores mais eficientes da celulose e que estes parecem dominar esse nicho

de decomposição. Portanto, a presença desse grupo de fungos representa grande importância no processo de transformação do carbono de áreas agrícolas, pois como já relatado anteriormente, a celulose é o biopolímero mais abundante nos biomas terrestres.

6. CONCLUSÕES

1. A atividade enzimática (amilase, urease, celulase e protease) e os atributos químicos (conteúdos de carbono orgânico total e proteínas totais) foram aumentados no solo rizosférico em relação ao não rizosférico.
2. O milho, dentre as culturas de inverno, foi o que mais estimulou a atividade das enzimas amilase, CMC-celulase, urease e protease do solo rizosférico e também, a atividade das enzimas amilase, urease e protease do solo não rizosférico.
3. Dentre as sequências de verão, a sequência milho/milho promoveu os maiores teores de carbono orgânico total.
4. As contagens de fungos e bactérias foram maiores no solo rizosférico da cultura de inverno milho quando comparadas ao solo não rizosférico.
5. A frequência de fungos com habilidade metabólica decresceu na seguinte ordem: celulolíticos (61%), produtores de sideróforos (48%), amilolíticos (47%), ureolíticos (45%), proteolíticos (42%), solubilizadores de fosfato (39%), produtores de AIA (19%), produtores de HCN (11%) e quitinolíticos (2,8%).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. A.; LANGER, U. Soil enzymes activities in irrigated and Rain-Fed Vertisols of the Semi-Arid tropics of Sudan. **International Journal of Soil Science**, New York, v.4, p.67-79, 2009.

ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; ALMEIDA, A. M.; MELLO, S. C. M. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: EMBRAPA, 2007. 24p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 168).

AMBROSANO, E. J.; TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; RAIJ, B.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. Leguminosas e oleaginosas. In: RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997. Leguminosas e oleaginosas, p.189-204.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.325-330, 2002.

ANDERSON, T. H.; GUTHRIE, E. A.; WALTON, B. T. Biorremediation. **Environmental Science Technology**, Washington, v.27, n.13, p.191-, 1993.

ANGERS, D. A.; MEHUYS, G. R. Effects of Cropping on Carbohydrate Content and Water-Stable Aggregation of a Clay Soil. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.69, n.2, p.373-380, 1989.

ARAÚJO, S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp*- mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.451-457, 1987.

BALDRIAN, P.; VOŘÍŠKOVÁ, J.; DOBIÁŠOVÁ, P.; MERHAUTOVÁ, V.; LISÁ, L.; VALÁŠKOVÁ, V. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. **Plant and Soil**, Amsterdam, v.338, p.111-125, 2011.

BALOTA, E. L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, R. P. Soil enzyme activities under long-term tillage an crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.300-306, 2004.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, n.417, p.1761–1778, 2005.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S.P. Sideróforos: “uma resposta dos microorganismos”. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.6b, p.1155-1164, 2002.

BORIE, F.; RUBIO, R.; ROUANET, J. L.; MORALES, A.; BORIE, G.; ROJAS, C. Effects of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. **Soil and Tillage Research**, Oxford , v.88, n.1-2, p.253-261, 2006.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE. S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.

BUNT, J. S.; ROVIRA, A. D. Microbiological studies of some subantartic soils. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.6, p.119-128, 1955.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B.; CAMARGO, C. E. O. Cereais. In: RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997. Cereais, p.43-72.

CAPLAN, J. A.; FAHEY, J. W. Plate-clearing technique to screen mixed microbial populations for protein degraders. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p.373-375, 1982.

CARAVACA, F.; LAX, A.; ALBALADEJO, J. Aggregate stability and carbon characteristics of particle-size fractions in cultivated and forested soils of semiarid Spain. **Soil and Tillage Research**, v.78, p.83-90, 2004.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA M. A. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In.: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 79-96.

CARNEIRO, C. E. A.; JÚNIOR, N. J. M.; AZEVEDO, M. C. B.; ANDRADE, E. A.; KOGUISHI, M. C.; DIEHL, R. C.; RICCE, W.; PASSARIN, A. L.; VAZ, R. H. M.; STELMACHUK, T. L. L.; GUIMARÃES, M. F.; RALISCH, R. Efeitos dos sistemas de manejo sobre o carbono orgânico total e carbono residual de um Latossolo vermelho eutroférico. **Semina**, v.30, p.5-10, 2009.

CARNEIRO, M. A. C.; ASSIS, P. C. R.; MELO, L. B. C.; PEREIRA, H. S.; PAULINO, H. B.; NETO, A. N. S. Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.38, n.4, p. 276-283, 2008.

CARNEIRO, R.G.; MENDES, I. C.; LOVATO, P.E.; CARVALHO, A. M.; VIVALDI, L. J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p. 661-669, 2004.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p.

CHANDANIE, W. A.; KUBOTA, M.; HYAKUMACHI, M. Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 286, p. 209–217, 2006.

CLAASENS, S.; VAN RENSBURG, P. J. J.; MABOETA, M. S.; VAN RENSBURG, L. Soil Microbial Community Function and Structure in a Post-mining Chronosequence. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.194, p.315-329, 2008.

COLE, M. A. Lead inhibition of enzyme synthesis in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.33, n.2, p.262-268, 1977.

CONCEIÇÃO, P. C.; AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J. ; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.777-788, 2005.

CORDEIRO, M. A. S.; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do Cerrado sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.3, p.147-153, 2005.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; HAGGBLOM, M. M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.6, p.2683–2691, 2001.

DEVI, K. K.; NIDHI, S.; SHALINI, K.; KOTHAMASI, D. Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under *in vitro* conditions. **Current Microbiology**, New York, v.54, p.74–78, 2007.

DINESH, R.; SRINIVASAN, V.; HAMZA, S.; PARTHASARATHY, V. A.; AIPE, K. C. Physico-chemical, biochemical and microbial properties of the rhizospheric soils of tree species used as supports for black pepper cultivation in the humid tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v.158, n.3-4, p.252-258, 2010.

DORAN, J.W.; ELLIOTT, E.T.; PAUSTIAN, K. Soil microbial, nitrogen cycling, and long-term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. **Soil and Tillage Research**, Oxford, v. 49, p. 3-18, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa em Solos. 2006. 306 p.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v.6, p.36-41, 2008.

FURUKAWA, T.; SYONO, K. Increased production of IAA by *Rhizoctonia solani* is induced by culture filtrate from rice suspension cultures. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.39, n.1, p.43-48, 1998.

GARCIA, M. R. L.; NAHAS, E. Biomassa e atividade microbiana de solo pastejado por diferentes lotações de ovinos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, n.2, p.269-276, 2007.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v.26, p.192-195, 1951.

GRIGOLETTI, J. R. A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, Colombo, v.30, n.1/2, p.155-165, 2000.

GUERRA, J. G. M.; SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CAMARGO, F. A. O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. Ed. **Fundamentos da matéria orgânica do solo. Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.19-25.

HABTE, M.; FOX, R. L.; AZIZ, T.; EL-SWAIFY, S. A. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with erosion in and oxisol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.945-950, 1988.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n. 3, p. 369-378,1998.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, Philadelphia, v.67, n.3, p.597-607, 1975.

HASAN, H. A. H. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. **Rostlinná Výroba**, Praha, v.48, n.3, p.101–106, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v.48, p.422-427, 1972.

HENDRICKS, C.W.; DOYLE, J.D.; HUGLEY, B. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2016-2019, 1995.

HERMAN, D. J.; JOHNSON, K. K.; JAEGER, C. H.; SCHWARTZ, E.; FIRESTONE, M. K. Root influence on nitrogen mineralization and nitrification in avena barbata rhizosphere soil. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v.70, p.1504–1511, 2006.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft**, Berlin, v.98, p.59-78, 1904.

HORINOUCHE, H.; KATSUYAMA, N.; TAGUCHI, Y.; HYAKUMACHI, M. Control of Fusarium crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. **Crop Protection**, Oxford, v.27, p.859–864, 2008.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, Washington, v.51, p.409-416, 2009.

HYAKUMACHI, M. Plant-growth-promoting fungi from Turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression. **Soil Microorganism**, v.44, p.53–68, 1994.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M. Dependência de micorrizas para a nodulação de espécies arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.4, p.545-552, 2005.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicações de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: TORRADO, P. V.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; DA SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. B. N. **Tópicos em Ciência do solo**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.85-144.

KANAZAWA, S.; MIYASHITA, K. A. Modified method for determination of cellulase activity in forest soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.32, n.1, p.71-79, 1986.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004. 452p.

KLEIN, V. A., VIEIRA, M. L., DURIGON, F. F., MASSING, J. P., FÁVERO, F. Porosidade de aeração de um Latossolo Vermelho e rendimento de trigo em plantio direto escarificado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.365-371, 2008.

KLUEPFEL, D. A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.441-472, 1993.

KNOWLES, C.J. Microorganisms and Cyanide. **Bacteriological reviews**, Baltimore, v.40, n.3, p.652-680, 1976.

KORANDA, M.; SCHNECKER, J.; KAISER, C.; FUCHSLUEGER, L.; KITZLER, B.; STANGE, C. F.; SESSITSCH, A.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech e The influence of plant C exudates. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.43, p.51-558, 2011.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, v.2, p. 263-304. 1998.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.7, p.181-191, 2008.

MARCELO, A. V., CORÁ, J. E., FERNANDES, C., MARTINS, M. R.; JORGE, R. F. Crop sequences in no-tillage system: effects on soil fertility and soybean, maize and rice yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, p.417-428, 2009.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.69, p.215-232, 1950.

McGARITY, J. W.; MYERS, M. G. A survey of urease activity in soils of Northern South Wales. **Plant and Soil**, Amsterdam, v.27, p.217-238, 1967.

MEERA, M. S.; SHIVANNA, M. B.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Plant growth promoting fungi from zoysiagrass rhizosphere as potential inducers of systemic resistance in cucumbers. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.1399–1406, 1994.

MELLONI, R.; PEREIRA, E. G.; TRANNIN, I. C. B.; SANTOS, D. R.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.7-13, 2001.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

MELO, M. G. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Uso do meio sólido para screening de atividade amilolítica em *Aspergillus niger*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, p. 613-620, 1989.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. **Uso de parâmetros biológicos e bioquímicos para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade de agroecossistemas**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2004. 34p. (Documentos, 112).

MILAGRES, A. M. F.; MACHUCA, A.; NAPOLEÃO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal Microbiology Methodology**, Amsterdam, v.37, n.1, p.1 -6, 1999.

MIRANDA, C. C. M, MIRANDA, L. N. **Contribuição da micorriza arbuscular para a produtividade e sustentabilidade nos sistemas de produção com plantio direto e convencional no Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 2007. 6p. (Comunicado Técnico, 134)

MIRANDA, C. C. M.; MIRANDA, L. N.; VILELA, L.; VARGAS, M. A.; CARVALHO, A. M. **Manejo da micorriza arbuscular por meio da rotação de culturas nos sistemas agrícolas do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 2001. 3p. (Comunicado Técnico, 42).

MISHRA, B.K.; DADHICH, S.K. Production of amylase and aylanase enzymes from soil fungi of Rajasthan. **Journal of Advances in Developmental Research**, Sambasiva Raju, v.1, p.21-23, 2010.

MONDINI, C.; CAYUELA, M. L.; SANCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass activation by trace amounts of readily available substrate. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.42, p.542–549, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 626p.

MURASHIMA, K.; A. KOSUGI Y R. H. DOI. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.184, p.5088-5095, 2002.

NAHAS, E. M.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, n.1, p.43-48, 1994.

NAHAS, E.; DELFINO, J. H.; ASSIS, L. C. Atividade microbiana e propriedades bioquímicas do solo resultantes da aplicação de gesso agrícola na cultura do repolho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.3, p.160-166, 1997.

NANNIPIERI, P.; PEDRAZZINI, F.; ARCARA, P. G.; PIOVANELLI, C. Changes in amino acids, enzyme activities, and biomasses during soil microbial growth. **Soil Science**, Baltimore, v.127, p.26-34, 1979.

NANNIPIERI, P.; ACHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LAND, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G.; VALORI, F. Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. **Ciencia del Suelo**, Buenos Aires, v.25, n.1, p.89-97, 2007.

NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L.; ANJOS, J. T.; SILVA FILHO, G. N. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 37, n.6, p. 841-845, 2002.

NEILANDS, J. B.; LEONG, S. A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Reviews in Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.187-208, 1986.

PAULA, M. A.; J. O. SIQUEIRA. Efeito da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja. II. Crescimento, nutrição e relação água-planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.11, n.3, p.289-293, 1987.

OBeregger, H., Schoeser, M.; ZADRA, I.; ABT, B.; HAAS, H. SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Baltimore, v.41, n.5, p.1077–1089, 2001.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Documentos 161).

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; SCOTTI, M. R.; CARVALHO, V. M. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1473-1482, 2009.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.853-860, 2006.

PANDEY, A.; PALNI, L. M. The rhizosphere effect in trees of the indian central himalaya with special reference to altitude. **Applied Ecology and Environmental Research**, Budapest, v.5, n.1, p.93-102, 2007.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, n.1, p.158-161, 1970.

RAIJ, B. VAN.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundação IAC, 1997. 285 p.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of *in vivo* nous field crops: Facilitating the evolution of an effective associa-screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, Malden, v.40, p.524-532, 1991.

RESENDE, M. L.; PEREIRA, C. E.; OLIVERA, J. A.; GUIMARÃES, J. A. Qualidade de sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com fungicida e inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.36, n.1, p.60-66, 2005.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v.40, p.2689–2694, 2005.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.835-842, 2003.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v.160, p.47-56, 1997.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycology Research**, Cambridge, v.105, n.12, p.1413-1421, 2001.

SHAN, Q.; YU, Y.; YU, J.; ZHANG, J. Soil enzymes activities and their indication for fertility of urban forest soil. **Frontiers Environmental Science and Engineering in China**, Beijing, v.2, n.2, p.218–223, 2008.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.12, p.1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.6, p.847-854, 2002.

SIMS, J. R.; HABY, V. A. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. **Soil Science**, Baltimore, v.112, p.137-141, 1971.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.12-21, 2002.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa-CNPAF-CNPSO, 1994. 142p.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.195, p.19-23, 1952.

SONG, Y., LOGAN, B. E. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v.239, p.229-234, 2004.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n.1, p.11-18, 2007.

SPERA, S. T.; SANTOS, H.P.; FONTANELI, R.S.; TOMM, G.O. Efeitos de sistemas de produção de grãos envolvendo pastagens sob plantio direto nos atributos físicos de solo e na produtividade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.533-542, 2004.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 6**. Anais... Rio de Janeiro: Enzitec, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p.382-385, 1998.

TEIXEIRA, C. F. A.; PAULETTO, E. A.; SILVA, J. B. Resistência mecânica à penetração de um argissolo amarelo distrófico típico sob diferentes sistemas de produção em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, p.1165-1167, 2003.

THIMANN, K.V. On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. The **Journal of Biological Chemistry**, v.109, n.1, p.279-291, 1935.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Ed). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002, p.195-276.

Van LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal Plant Pathology**, London, v. 119, p. 243–254, 2007.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOOA, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.40, p.1–10, 2008.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, St Paul, v.86, n.2, p.221-224, 1996.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.487-511, 2001.

WOLLUM, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis**. Madison: Wisconsin, p. 781- 802, 1982.

WRIGHT, A. L.; HONS, F. M.; LEMON, R. G.; MCFARLAND, M. L.; NICHOLS, R. L. Microbial activity and soil C sequestration for reduced and conventional tillage cotton. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.38, p.168-173, 2008.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.161, p.575-586, 1996.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.**

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.1, p.345–351, 2000.

YANG, L.; LI, T.; LI, F.; LEMCOFF, J. H.; COHEN, S. Fertilization regulates soil enzymatic activity and fertility dynamics in a cucumber field. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.116, p.21–26, 2008.

APÊNDICE

Tabela A1. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, na atividade da amilase do solo rizosférico e solo não rizosférico.

Sequências de verão	Culturas de inverno			
	Amilase (μg glicose g^{-1} solo 24h^{-1})			
	Solo rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	261,68	185,68	196,46	214,61 A
Milho/milho	228,79	193,70	204,67	209,05 A
Soja/soja	262,49	212,63	243,20	239,44 A
Médias	250,99 A	197,34 B	214,77 AB	
	Solo não rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	260,68	161,88	210,94	211,17 A
Milho/milho	224,68	177,67	237,75	213,42 A
Soja/soja	175,29	139,64	131,93	148,95 A
Médias	220,27 A	159,73 B	193,53 AB	
	Teste F	Coeficiente de variação %		
Sequência de verão (V)	1,11 ^{ns}	CV (V)	20	
Culturas de inverno (I)	24,57*	CV (I)	11	
Posição de coleta do solo (R)	9,45*	CV (V x I)	22	
V x I	0,69 ^{ns}	CV (V x I x R)	17	
V x R	9,81*			
I x R	0,24 ^{ns}			
V x I x R	0,71 ^{ns}			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela A2. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, na atividade da urease do solo rizosférico e solo não rizosférico.

Sequências de verão	Culturas de inverno			
	Urease ($\mu\text{gN-NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ solo } 3\text{h}^{-1}$)			
	Solo rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	64,02	51,63	24,87	46,84 B
Milho/milho	94,80	57,71	65,82	72,77 A
Soja/soja	77,40	89,21	57,10	74,47 A
Médias	78,65 A	66,18 AB	49,25 B	
	Solo não rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	52,28	26,05	22,39	33,57 A
Milho/milho	30,64	31,84	22,88	28,45 A
Soja/soja	40,80	44,95	20,26	35,32 A
Médias	41,23 A	34,28 AB	21,84 B	
	Teste F		Coeficiente de variação %	
Sequência de verão (V)		3,96 ^{ns}	CV (V)	33
Culturas de inverno (I)		7,74 [*]	CV (I)	38
Posição de coleta do solo (R)		64,45 [*]	CV (V x I)	19
V x I		3,71 ^{ns}	CV (V x I x R)	30
V x R		5,72 [*]		
I x R		0,52 ^{ns}		
V x I x R		1,54 ^{ns}		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela A3. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, na atividade da CMC-celulase do solo rizosférico e solo não rizosférico.

Sequências de verão	Culturas de inverno			
	CMC-Celulase ($\mu\text{g glicose g}^{-1}$ solo 24h^{-1})			
	Solo rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	319,98	190,41	256,19	255,52 A
Milho/milho	372,75	356,83	218,35	315,94 A
Soja/soja	310,57	262,61	197,58	256,92 A
Médias	334,41 A	269,95 B	224,04 B	
	Solo não rizosférico			
Soja/milho	128,09	127,35	214,64	131,22 A
Milho/milho	143,18	115,98	221,56	160,24 A
Soja/soja	140,95	118,69	134,02	156,69 A
Médias	137,41 AB	120,67 B	190,08 A	
	Teste F	Coeficiente de variação %		
Sequência de verão (V)		3,65 ^{ns}	CV (V)	23
Culturas de inverno (I)		2,78 ^{ns}	CV (I)	25
Posição de coleta do solo (R)		75,83 [*]	CV (V x I)	21
V x I		2,41 ^{ns}	CV (V x I x R)	25
V x R		1,27 ^{ns}		
I x R		11,05 [*]		
V x I x R		1,98 ^{ns}		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela A4. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, no teor de carboidratos totais do solo rizosférico e solo não rizosférico.

Sequências de verão	Culturas de inverno			
	Carboidratos totais ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo)			
	Solo rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	1618,43	1273,82	1540,63	1379,87 A
Milho/milho	1619,31	1715,16	1317,45	1550,64 A
Soja/soja	1313,88	1535,62	1321,74	1390,41 A
Médias	1517,21A	1508,20A	1295,52B	
	Solo não rizosférico			
Soja/milho	1200,14	1189,41	1247,35	1310,06 A
Milho/milho	1438,34	1410,44	1408,30	1419,03 A
Soja/soja	1441,91	1346,06	1312,45	1366,81 A
Médias	1360,13A	1315,31A bA	1420,46A	
	Teste F	Coeficiente de variação %		
Sequência de verão (V)	2,09 ^{ns}	CV (V)	15	
Culturas de inverno (I)	2,13 ^{ns}	CV (I)	8	
Posição de coleta do solo (R)	2,47 ^{ns}	CV (V x I)	8	
V x I	3,86 ^{ns}	CV (V x I x R)	12	
V x R	0,43 ^{ns}			
I x R	4,42 [*]			
V x I x R	2,49 ^{ns}			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela A5. Efeito das culturas de inverno e das sequências de verão em sistema de semeadura direta, no teor de proteínas totais do solo rizosférico e solo não rizosférico.

Sequências de verão	Culturas de inverno			
	Proteínas totais (mg proteína g ⁻¹ solo)			
	Solo rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	3,16	2,64	2,73	2,71 A
Milho/milho	3,10	3,32	3,31	3,24 A
Soja/soja	3,08	2,66	2,39	2,84 A
Médias	3,11 A	2,87 A	2,81 A	
	Solo não rizosférico			
	Milho	Girassol	Guandu	Médias
Soja/milho	2,56	2,05	2,56	2,24 A
Milho/milho	2,51	2,38	2,66	2,52 A
Soja/soja	2,32	2,11	2,30	2,38 A
Médias	2,46 A	2,18 A	2,51 A	
	Teste F		Coefficiente de variação %	
Sequência de verão (V)		2,10 ^{ns}	CV (V)	22
Culturas de inverno (I)		1,31 ^{ns}	CV (I)	17
Posição de coleta do solo (R)		24,11 [*]	CV (V x I)	15
V x I		1,13 ^{ns}	CV (V x I x R)	15
V x R		0,64 ^{ns}		
I x R		1,20 ^{ns}		
V x I x R		0,32 ^{ns}		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. * ($p < 0,05$), ^{ns} (não significativo).

Tabela A6. Atividade metabólica dos fungos isolados do solo rizosférico das culturas de inverno sobre as sequências de verão em sistema de semeadura direta. Atividade amilolítica (Amil), celulolítica (Cel), proteolítica (Prot), ureolítica (Ure), quitinolítica (Quit), solubilização de fosfato (Sol), produção de ácido indolacético (AIA), produção de ácido cianídrico (HCN) e produção de sideróforos (Sid).

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	milho	1	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	milho	2	X	X	X	X		X	X			6
Soja/milho	milho	3	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	milho	4	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	milho	6	X	X	X	X		X	X		X	7
Soja/milho	milho	7	X	X	X	X		X	X			6
Soja/milho	milho	8		X								1
Soja/milho	milho	9	X	X		X						3
Soja/milho	milho	10	X	X	X	X					X	5
Soja/milho	milho	11	X	X		X	X	X			X	6
Soja/milho	milho	12		X								1
Soja/milho	milho	13	X	X	X	X			X			5
Soja/milho	milho	14	X	X	X	X		X	X			6
Soja/milho	milho	15		X							X	2
Soja/milho	milho	16		X	X							2
Soja/milho	milho	17	X	X		X			X			4
Soja/milho	milho	18	X	X		X			X			4
Soja/milho	milho	19				X					X	2
Soja/milho	milho	20	X	X	X	X			X			5
Soja/milho	milho	21	X	X				X			X	4

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	milho	22		X	X				X	X	X	5
Soja/milho	milho	23	X					X				2
Soja/milho	milho	24	X			X		X	X			4
Soja/milho	milho	25	X			X					X	3
Soja/milho	milho	26	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	milho	27								X	X	2
Soja/milho	milho	28	X	X				X	X		X	5
Soja/milho	milho	29	X	X								2
Soja/milho	milho	31	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	milho	32			X	X					X	3
Soja/milho	milho	33				X						1
Soja/milho	milho	34		X	X	X					X	4
Soja/milho	milho	35		X	X	X					X	4
Soja/milho	milho	36		X		X	X	X				4
Soja/milho	milho	37	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	milho	38	X			X					X	3
Soja/milho	milho	39		X	X	X		X	X			5
Soja/milho	milho	40	X	X		X			X		X	5
Soja/milho	milho	41	X			X		X			X	4
Soja/milho	milho	42	X			X	X				X	4
Soja/milho	milho	43					X				X	2
Soja/milho	milho	44	X									1
Soja/milho	milho	45									X	1

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	milho	46				X		X	X		X	4
Soja/milho	milho	47						X			X	2
Soja/milho	milho	48		X	X				X			3
Soja/milho	milho	49	X	X		X			X			4
Soja/milho	milho	50	X	X				X	X			4
Soja/milho	milho	51						X			X	2
Soja/milho	milho	52				X				X	X	3
Soja/milho	milho	53				X					X	2
Soja/milho	milho	54						X				1
Soja/milho	milho	55		X	X			X			X	4
Soja/milho	milho	56		X	X	X			X		X	5
Soja/milho	milho	57	X	X		X		X	X			5
Soja/milho	milho	58		X		X						2
Soja/milho	milho	59	X	X		X		X	X			5
Soja/milho	milho	60				X					X	2
Soja/milho	milho	61		X	X						X	3
Soja/milho	milho	62		X				X			X	3
Soja/milho	milho	63		X		X			X			3
Soja/milho	milho	64		X		X						2
Soja/milho	milho	65		X		X			X			3
Soja/milho	milho	66				X		X			X	3
Soja/milho	milho	67								X		1
Soja/milho	milho	68			X						X	2

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	milho	69			X			X			X	3
Soja/milho	milho	70			X	X						2
Soja/milho	milho	71	X					X	X			3
Soja/milho	milho	72		X						X		2
Soja/milho	milho	75	X	X				X				3
Soja/milho	milho	76		X				X				2
Soja/milho	milho	77						X			X	2
Soja/milho	milho	78		X		X						2
Soja/milho	milho	80	X	X	X	X						4
Soja/milho	milho	81	X	X	X	X						4
Soja/milho	milho	82	X	X				X				3
Soja/milho	milho	83		X		X					X	3
Soja/milho	milho	84	X	X							X	3
Soja/milho	milho	86	X					X			X	3
Soja/milho	milho	88		X	X						X	3
Soja/milho	milho	89								X	X	2
Soja/milho	milho	92		X				X				2
Soja/milho	milho	93	X	X		X						3
Soja/milho	milho	95						X			X	2
Soja/milho	milho	96	X	X				X	X			4
Soja/milho	girassol	97	X	X					X			3
Soja/milho	girassol	98	X	X			X					3
Soja/milho	girassol	99									X	1

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	girassol	100		X		X			X			3
Soja/milho	girassol	103									X	1
Soja/milho	girassol	105	X	X	X							3
Soja/milho	girassol	106	X		X							2
Soja/milho	girassol	107		X	X						X	3
Soja/milho	girassol	108		X							X	2
Soja/milho	girassol	109		X	X	X		X			X	5
Soja/milho	girassol	114	X	X	X	X			X			5
Soja/milho	girassol	115	X		X						X	3
Soja/milho	girassol	116	X	X				X			X	4
Soja/milho	girassol	117		X								1
Soja/milho	girassol	118		X	X	X					X	4
Soja/milho	girassol	119				X			X			2
Soja/milho	girassol	121	X	X	X	X					X	5
Soja/milho	girassol	122	X	X	X	X						4
Soja/milho	girassol	123		X	X	X					X	4
Soja/milho	girassol	124		X				X				2
Soja/milho	girassol	125	X	X	X				X			4
Soja/milho	girassol	126							X	X		2
Soja/milho	girassol	129	X	X		X			X			4
Soja/milho	girassol	131	X	X		X						3
Soja/milho	girassol	132		X								1
Soja/milho	girassol	134	X	X	X	X					X	5

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	girassol	135		X								1
Soja/milho	girassol	136	X	X				X			X	4
Soja/milho	girassol	137	X	X	X	X					X	5
Soja/milho	girassol	138								X	X	2
Soja/milho	girassol	139		X								1
Soja/milho	girassol	141		X								1
Soja/milho	girassol	143		X								1
Soja/milho	girassol	145		X	X							2
Soja/milho	girassol	146	X	X	X							3
Soja/milho	girassol	148				X						1
Soja/milho	girassol	149		X	X						X	3
Soja/milho	girassol	150		X	X							2
Soja/milho	girassol	151		X								1
Soja/milho	girassol	153	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	girassol	154	X						X		X	3
Soja/milho	girassol	155	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	girassol	158	X					X			X	3
Soja/milho	girassol	159		X								1
Soja/milho	girassol	160									X	1
Soja/milho	girassol	163		X		X						2
Soja/milho	girassol	164	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	girassol	167	X	X	X	X	X	X	X		X	8

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	girassol	168	X	X	X	X					X	5
Soja/milho	girassol	169	X		X			X			X	4
Soja/milho	girassol	171	X	X		X					X	4
Soja/milho	girassol	172	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	girassol	173		X	X	X			X		X	5
Soja/milho	girassol	174	X					X				2
Soja/milho	girassol	175	X	X	X	X					X	5
Soja/milho	girassol	176		X		X						2
Soja/milho	girassol	177		X				X			X	3
Soja/milho	girassol	178	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	girassol	179		X								1
Soja/milho	girassol	180			X	X						2
Soja/milho	girassol	182	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	girassol	183	X		X						X	3
Soja/milho	girassol	184	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	guandu	185				X						1
Soja/milho	guandu	186		X								1
Soja/milho	guandu	187		X		X					X	3
Soja/milho	guandu	188	X	X	X	X		X			X	6
Soja/milho	guandu	190	X	X	X	X		X				5
Soja/milho	guandu	194	X	X	X	X	X	X			X	7
Soja/milho	guandu	195		X		X		X	X			4
Soja/milho	guandu	196	X	X		X						3

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	guandu	197	X			X						2
Soja/milho	guandu	199	X	X	X	X		X				5
Soja/milho	guandu	201	X	X		X			X			3
Soja/milho	guandu	202				X						1
Soja/milho	guandu	207		X	X	X					X	4
Soja/milho	guandu	208	X	X	X	X						4
Soja/milho	guandu	209	X	X	X	X		X				5
Soja/milho	guandu	210	X	X	X	X		X				5
Soja/milho	guandu	212									X	1
Soja/milho	guandu	213	X	X								2
Soja/milho	guandu	215	X	X		X			X			4
Soja/milho	guandu	217		X		X						2
Soja/milho	guandu	220		X					X	X		3
Soja/milho	guandu	222		X						X	X	3
Soja/milho	guandu	224		X	X							2
Soja/milho	guandu	225	X	X		X		X			X	5
Soja/milho	guandu	227		X	X	X					X	4
Soja/milho	guandu	232		X	X	X		X				4
Soja/milho	guandu	233		X						X	X	3
Soja/milho	guandu	234		X	X	X		X	X			5
Soja/milho	guandu	235	X	X	X			X			X	5
Soja/milho	guandu	236			X							1
Soja/milho	guandu	237	X	X	X	X		X	X			6

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/milho	guandu	238	X									1
Soja/milho	guandu	240								X	X	2
Soja/milho	guandu	242		X	X	X					X	4
Soja/milho	guandu	243			X					X		2
Soja/milho	guandu	244			X					X	X	3
Soja/milho	guandu	248								X		1
Soja/milho	guandu	249	X		X				X			3
Soja/milho	guandu	250	X	X	X	X			X		X	6
Soja/milho	guandu	252								X		1
Soja/milho	guandu	254									X	1
Soja/milho	guandu	256	X	X		X					X	4
Soja/milho	guandu	257			X							1
Soja/milho	guandu	258									X	1
Soja/milho	guandu	259	X									1
Soja/milho	guandu	261									X	1
Soja/milho	guandu	263	X	X	X	X			X		X	6
Soja/milho	guandu	264	X	X	X	X		X	X			6
Milho/milho	milho	265	X	X				X				3
Milho/milho	milho	266						X	X			2
Milho/milho	milho	267	X	X								2
Milho/milho	milho	268	X	X		X		X				4
Milho/milho	milho	271							X			1
Milho/milho	milho	272	X	X	X			X				4

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	milho	275	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	milho	277		X		X		X				3
Milho/milho	milho	280	X	X	X	X		X	X			6
Milho/milho	milho	285	X	X	X		X	X	X			6
Milho/milho	milho	286									X	1
Milho/milho	milho	289		X	X	X		X	X			5
Milho/milho	milho	293	X	X				X			X	4
Milho/milho	milho	294								X		1
Milho/milho	milho	296	X	X		X						3
Milho/milho	milho	298		X	X	X		X				4
Milho/milho	milho	299	X	X				X				3
Milho/milho	milho	300		X	X	X		X	X			5
Milho/milho	milho	301								X	X	2
Milho/milho	milho	302	X	X		X		X			X	5
Milho/milho	milho	304	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	milho	308	X	X	X	X		X	X			6
Milho/milho	milho	310								X	X	2
Milho/milho	milho	313	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	milho	315	X	X				X			X	4
Milho/milho	milho	316	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	milho	317	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	milho	319								X	X	2
Milho/milho	milho	321	X	X	X	X		X	X		X	7

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	milho	324								X	X	2
Milho/milho	milho	327			X						X	2
Milho/milho	milho	328	X		X	X		X	X		X	6
Milho/milho	milho	331				X					X	2
Milho/milho	milho	332	X	X		X		X			X	5
Milho/milho	milho	333		X	X	X			X			4
Milho/milho	girassol	334							X			1
Milho/milho	girassol	336								X	X	2
Milho/milho	girassol	338			X					X	X	3
Milho/milho	girassol	339	X	X				X			X	4
Milho/milho	girassol	340						X			X	2
Milho/milho	girassol	341								X		1
Milho/milho	girassol	342		X								1
Milho/milho	girassol	347	X	X		X		X			X	5
Milho/milho	girassol	348							X			1
Milho/milho	girassol	350	X	X	X	X			X		X	6
Milho/milho	girassol	352	X	X	X	X		X	X		X	7
Milho/milho	girassol	353								X	X	2
Milho/milho	girassol	355			X	X						2
Milho/milho	girassol	356	X	X		X	X					4
Milho/milho	girassol	358			X							1
Milho/milho	girassol	359	X	X				X			X	4
Milho/milho	girassol	360			X						X	2

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	girassol	361			X	X				X		3
Milho/milho	girassol	362	X	X	X	X			X		X	6
Milho/milho	girassol	364								X		1
Milho/milho	girassol	365			X					X		2
Milho/milho	girassol	366	X	X				X				3
Milho/milho	girassol	368			X							1
Milho/milho	girassol	369	X	X	X	X		X				5
Milho/milho	girassol	370			X					X	X	3
Milho/milho	girassol	372	X	X		X						3
Milho/milho	girassol	373				X						1
Milho/milho	girassol	374	X	X				X			X	4
Milho/milho	girassol	375	X	X		X						3
Milho/milho	girassol	381	X	X		X		X			X	5
Milho/milho	girassol	382			X					X	X	3
Milho/milho	girassol	384	X	X		X		X				4
Milho/milho	girassol	386	X	X		X		X	X			5
Milho/milho	girassol	388				X						1
Milho/milho	girassol	390			X					X	X	3
Milho/milho	girassol	391			X					X	X	3
Milho/milho	girassol	392	X	X		X		X				4
Milho/milho	girassol	394	X		X						X	3
Milho/milho	girassol	395			X						X	2
Milho/milho	girassol	396			X	X						2

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	guandu	397	X	X	X							3
Milho/milho	guandu	399	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	guandu	401	X	X	X	X						4
Milho/milho	guandu	402				X						1
Milho/milho	guandu	403	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	guandu	404	X	X	X							3
Milho/milho	guandu	405	X	X		X		X				4
Milho/milho	guandu	406	X	X				X		X		4
Milho/milho	guandu	408	X	X	X	X						4
Milho/milho	guandu	409						X		X	X	3
Milho/milho	guandu	410	X	X		X		X	X		X	6
Milho/milho	guandu	411	X	X								2
Milho/milho	guandu	412	X	X								2
Milho/milho	guandu	415	X	X		X						3
Milho/milho	guandu	416						X		X		2
Milho/milho	guandu	418	X	X	X	X						4
Milho/milho	guandu	419		X	X							2
Milho/milho	guandu	420						X			X	2
Milho/milho	guandu	421		X	X							2
Milho/milho	guandu	422	X	X	X	X		X			X	6
Milho/milho	guandu	423		X	X	X						3
Milho/milho	guandu	424						X			X	2
Milho/milho	guandu	426	X	X		X		X			X	5

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	guandu	427	X		X						X	3
Milho/milho	guandu	429							X		X	2
Milho/milho	guandu	430	X	X	X	X		X	X			6
Milho/milho	guandu	431		X		X						2
Milho/milho	guandu	433		X				X			X	3
Milho/milho	guandu	435						X		X		2
Milho/milho	guandu	437			X	X						2
Milho/milho	guandu	438		X				X		X		3
Milho/milho	guandu	439		X	X							2
Milho/milho	guandu	440	X	X	X	X						4
Milho/milho	guandu	441						X		X	X	3
Milho/milho	guandu	442		X				X				2
Milho/milho	guandu	443		X				X			X	3
Milho/milho	guandu	444						X		X		2
Milho/milho	guandu	445	X		X							2
Milho/milho	guandu	446	X	X	X			X			X	5
Milho/milho	guandu	448	X					X			X	3
Milho/milho	guandu	451	X		X	X			X			4
Milho/milho	guandu	453		X	X	X			X			4
Milho/milho	guandu	455		X	X							2
Milho/milho	guandu	456		X	X							2
Milho/milho	guandu	457				X			X			2
Milho/milho	guandu	458	X	X		X		X			X	5

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Milho/milho	guandu	459		X				X		X		3
Milho/milho	guandu	460		X	X							2
Milho/milho	guandu	461		X	X	X						3
Milho/milho	guandu	462		X								1
Milho/milho	guandu	464	X		X	X			X			4
Milho/milho	guandu	465	X	X		X		X	X		X	6
Milho/milho	guandu	466		X		X						2
Milho/milho	guandu	468									X	1
Milho/milho	guandu	469	X	X		X						3
Soja/soja	milho	470	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	471	X					X	X	X		4
Soja/soja	milho	472	X		X	X			X		X	5
Soja/soja	milho	473	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	477	X	X		X		X				4
Soja/soja	milho	479	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	480	X	X				X			X	4
Soja/soja	milho	481	X			X	X		X			4
Soja/soja	milho	482						X		X	X	3
Soja/soja	milho	483		X	X	X		X			X	5
Soja/soja	milho	484	X			X		X			X	4
Soja/soja	milho	486		X								1
Soja/soja	milho	487						X			X	2
Soja/soja	milho	488	X	X	X	X		X			X	6

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/soja	milho	490		X								1
Soja/soja	milho	493						X		X		2
Soja/soja	milho	494	X		X			X	X			4
Soja/soja	milho	495	X	X	X							3
Soja/soja	milho	496	X									1
Soja/soja	milho	497		X				X			X	3
Soja/soja	milho	498	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	499						X			X	2
Soja/soja	milho	500	X			X			X			3
Soja/soja	milho	504		X	X							2
Soja/soja	milho	505	X	X	X	X		X	X		X	7
Soja/soja	milho	506		X	X							2
Soja/soja	milho	507	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	509	X	X		X		X				4
Soja/soja	milho	510	X	X								2
Soja/soja	milho	514	X	X				X			X	4
Soja/soja	milho	515	X	X				X			X	4
Soja/soja	milho	519		X	X			X				3
Soja/soja	milho	520		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	milho	521		X	X			X				3
Soja/soja	milho	523	X	X				X			X	4
Soja/soja	milho	524		X				X				2
Soja/soja	milho	529	X	X	X	X			X		X	6

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/soja	milho	531									X	1
Soja/soja	milho	532	X	X				X				3
Soja/soja	milho	533	X	X				X				3
Soja/soja	milho	536	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	milho	539	X	X						X		3
Soja/soja	milho	546	X	X	X						X	4
Soja/soja	milho	547		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	milho	548								X	X	2
Soja/soja	milho	552	X	X		X		X	X		X	6
Soja/soja	milho	557		X								1
Soja/soja	milho	558	X	X	X			X			X	5
Soja/soja	milho	559		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	milho	560						X			X	2
Soja/soja	girassol	561	X	X	X	X		X				5
Soja/soja	girassol	566	X	X	X			X			X	5
Soja/soja	girassol	567		X								1
Soja/soja	girassol	568	X	X	X							3
Soja/soja	girassol	569						X				1
Soja/soja	girassol	571	X	X	X	X			X		X	6
Soja/soja	girassol	572		X								1
Soja/soja	girassol	574	X	X	X			X			X	5
Soja/soja	girassol	575	X	X	X			X			X	5
Soja/soja	girassol	579	X	X	X	X		X			X	6

Continuação...

Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/soja	girassol	580		X	X	X						3
Soja/soja	girassol	582			X	X			X			3
Soja/soja	girassol	583	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	584				X			X			2
Soja/soja	girassol	586	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	587	X					X				2
Soja/soja	girassol	588		X							X	2
Soja/soja	girassol	590	X	X				X				3
Soja/soja	girassol	592	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	593		X	X	X		X	X		X	6
Soja/soja	girassol	595	X	X	X	X					X	5
Soja/soja	girassol	596	X	X	X	X			X			5
Soja/soja	girassol	597	X	X		X					X	4
Soja/soja	girassol	602		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	girassol	603	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	604		X	X	X	X	X				5
Soja/soja	girassol	613						X			X	2
Soja/soja	girassol	617	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	618	X					X				2
Soja/soja	girassol	619		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	girassol	620	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	girassol	622		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	girassol	626	X	X	X	X		X				5

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/soja	girassol	627	X					X	X			3
Soja/soja	girassol	628	X					X				2
Soja/soja	girassol	630		X	X	X		X	X		X	6
Soja/soja	girassol	631								X	X	2
Soja/soja	guandu	632		X						X		1
Soja/soja	guandu	634	X	X	X	X		X				5
Soja/soja	guandu	635	X					X				1
Soja/soja	guandu	636		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	guandu	637	X	X	X	X			X		X	6
Soja/soja	guandu	638	X	X								2
Soja/soja	guandu	641									X	1
Soja/soja	guandu	642	X	X	X	X			X			5
Soja/soja	guandu	643	X	X	X	X	X	X			X	7
Soja/soja	guandu	644	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	646		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	guandu	647	X	X				X			X	4
Soja/soja	guandu	648	X	X			X	X				4
Soja/soja	guandu	649		X	X	X					X	4
Soja/soja	guandu	650	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	651	X	X			X					3
Soja/soja	guandu	652			X	X			X		X	4
Soja/soja	guandu	653	X	X	X	X						4
Soja/soja	guandu	654	X	X	X			X			X	5

Continuação...												
Tratamentos		N° do Isolado	Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid	Tot
Seq. de Verão	Culturas Inverno											
Soja/soja	guandu	656								X		1
Soja/soja	guandu	657	X		X	X		X	X			5
Soja/soja	guandu	658	X	X	X	X					X	5
Soja/soja	guandu	659	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	660	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	661		X	X	X			X		X	5
Soja/soja	guandu	662	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	664									X	1
Soja/soja	guandu	665	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	666		X								1
Soja/soja	guandu	669	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	670			X							1
Soja/soja	guandu	672	X	X								2
Soja/soja	guandu	674	X	X				X			X	4
Soja/soja	guandu	675	X	X	X	X		X			X	6
Soja/soja	guandu	677								X		1
Soja/soja	guandu	678								X		1
Soja/soja	guandu	685	X	X				X	X		X	5
Soja/soja	guandu	687		X								1
Soja/soja	guandu	688	X	X				X	X			4
Soja/soja	guandu	690	X	X		X			X		X	5
Soja/soja	guandu	693				X						1

Total de isolados	NDA*	DA**	Atividade metabólica (n° isolados)								
			Amil	Cel	Prot	Ure	Quit	Sol	AIA	HCN	Sid
501	46	455	235	306	210	226	14	196	95	54	239
	%							%			
100	9,2	90,8	47	61	42	45	2,8	39	19	11	48

*NDA- não detectado atividade e **DA- detectado ao menos uma atividade