

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS NA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DE SOLOS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
MILHO**

Beatriz de Oliveira Costa

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Janeiro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS NA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DE SOLOS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
MILHO**

Beatriz de Oliveira Costa

Orientador: Prof. Dr. Ely Nahas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Ciência do Solo.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Janeiro – 2010

C837e Costa, Beatriz de Oliveira
Efeito da inoculação de fungos na atividade enzimática de solos e germinação de sementes de milho / Beatriz de Oliveira Costa. -- Jaboticabal, 2010
xv, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Ely Nahas
Banca examinadora: José da Cruz Machado, Antônio Carlos Monteiro
Bibliografia

1. *Fusarium verticillioides*. 2. *Aspergillus flavus*. 3. *Penicillium* sp. 4. desidrogenase. 5. amilase. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA
DE SOLOS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO.

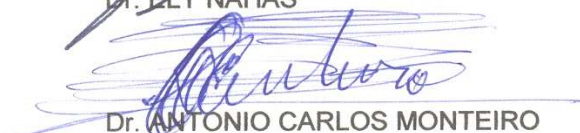
AUTORA: BEATRIZ DE OLIVEIRA COSTA

ORIENTADOR: Dr. ELY NAHAS

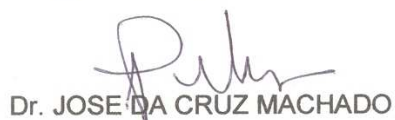
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA
(CIÊNCIA DO SOLO) pela Comissão Examinadora:



Dr. ELY NAHAS

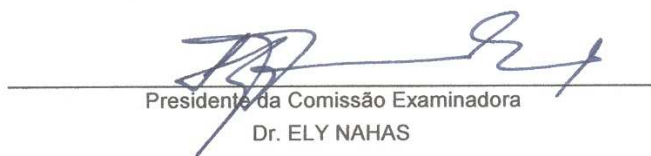


Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO



Dr. JOSE DA CRUZ MACHADO

Data da realização: 26 de janeiro de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ELY NAHAS

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BEATRIZ DE OLIVEIRA COSTA – nascida em 12 de dezembro de 1973, em Araxá, Minas Gerais, Brasil. Filha de Benedito Teixeira de Toledo Costa e Teresinha Maria Costa. Licenciatura em Ciências e Matemática, formada em dezembro de 1994 pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Araxá, MG. Bióloga formada em dezembro de 2002 pelo Centro Universitário do Triângulo, Uberlândia (MG). Especialização em Biotecnologia no ano de 2005 pela Universidade Federal de Lavras. Ingressou em agosto de 2007 no curso de Mestrado, área de concentração em Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. Funcionária da Syngenta Seeds desde maio de 1997.

*“Mestre, qual é o maior mandamento da lei? Ele lhe respondeu:
Amareis o Senhor vosso Deus de todo o vosso coração, de toda a
Vossa alma e de todo o vosso espírito; é o maior e o primeiro Mandamento.
E eis o segundo: Amareis vosso próximo como a vós mesmos.
Toda a lei está contida nesses dois mandamentos.”*

Jesus de Nazaré

(Mateus, cap. XXII, v.34 a 40)

*“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se
milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração,
em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive
no mundo, mas o mundo vive em você.”*

Frederick Buechner

*(Frase do livro: **A Cabana** – p.195)*

Dedico

*Com amor e carinho aos meus pais, **Benedito e Teresinha**, pessoas que sempre foram exemplos de coragem, amor, determinação, retidão e perseverança.*

*Aos meus irmãos, **Hélio, Márcio** e cunhada **Tatiane**.*

A uma pessoa especial, meu namorado, o qual sabe que o valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

E que por isto existem, momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

*A você **Adolfo Valente Marcelo**,*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, proteção e por ter permitido mais esta vitória.

Ao orientador **Prof. Dr. Ely Nahas**, pelo incentivo, estímulo, apoio, paciência e ensinamentos transmitidos. Ofereço meus agradecimentos e respeito pelo seu profissionalismo e sabedoria. Sinto-me honrada por ter sido sua orientada.

Ao técnico **Luiz Carlos Assis**, pelo aprendizado, amizade, companheirismo e apoio constante, durante as análises de laboratório.

Aos companheiros de laboratório e colegas de Pós Graduação, em especial, **Breno, Clóvis, Rose, Meire e Rosângela**, pelo companheirismo, amizade, ajuda e carinho.

À secretária do departamento, **Edna D'áquila**, pela simpatia e disposição nas inúmeras vezes que me socorreu.

À funcionária do departamento **Rosângela**, pela amizade, companheirismo e o delicioso café preparado ao longo deste tempo.

À **Cynthia Barroso** (in memorian) e **Eliane Cardoso**, pelos ensinamentos, sugestões, convivência e amizade no início deste trabalho.

A todos os funcionários da **seção de Pós-Graduação**, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** – Campus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela estrutura e curso oferecidos, respectivamente.

A todos os **amigos da Syngenta®**, em especial à **Aline Serrano** e ao nosso gerente, **Sr. Élcio Perretto**, pelo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À família do Adolfo, **Dra. Regina, Dr. Roberto, Mariana e Marcelo**, que sempre me acolheram com muito carinho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Efeito das condições ambientais sobre o crescimento dos fungos no solo	3
2.2. Cultura do Milho	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Caracterização do meio físico e coleta do solo	9
3.2. Isolamento e cultivo dos fungos utilizados neste trabalho	10
3.3. Crescimento dos fungos	10
3.4. Obtenção das sementes de milho	10
3.5. Multiplicação das culturas fúngicas e preparo do inóculo para inoculação	11
3.6. Determinação da concentração de esporos	12
3.7. Crescimento dos fungos no solo	13
3.8. Altura dos coleóptilos, comprimento das raízes e massa da matéria seca	15
3.9. Determinação dos carboidratos totais	15
3.10. Atividade da desidrogenase	16
3.11. Atividade da amilase	16
3.12. Eletroforese de isoenzimas	16
3.12.1. Tampão de extração das proteínas	16
3.12.2. Extração da proteína do material vegetal e sua maceração	17
3.12.3. Tampão do eletrodo	19
3.12.4. Tampão do gel	19
3.12.5. Preparo do gel de amido	19
3.12.6. Carregamento do gel	20
3.12.7. Fatiamento do gel	22

3.12.8. Revelação do gel.....	24
3.12.9. Visualização dos géis de acordo com a intensidade das bandas.....	26
3.13. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Crescimento dos fungos em meio de cultura	27
4.2. Crescimento dos fungos no solo	30
4.3. Características das plântulas	36
4.3.1. Altura dos coleótilos	36
4.3.2. Comprimento das raízes	40
4.3.3. Massa de matéria seca	43
4.4. Análise isoenzimática dos coleótilos	44
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios dos nutrientes que compõem o milho.....	8
Tabela 2. Composição do meio de cultura BDYA	10
Tabela 3. Controle das análises realizadas no laboratório de Sanidade de Sementes	11
Tabela 4. Composição do meio de cultura Sabouraud	12
Tabela 5. Tratamentos utilizados no desenvolvimento deste ensaio	12
Tabela 6. Protocolo para revelação das enzimas, calculado por fatia de gel	24
Tabela 7. Equações referentes aos teores de carboidratos totais residuais (μg), após crescimento dos fungos inoculados em solos, adicionados não e não adicionados de glicose.	31
Tabela 8. Efeito da inoculação de fungos e adição de glicose no desenvolvimento dos coleóptilos de milho no solo LVef	40
Tabela 9. Massa (g) de matéria seca de milho crescido no LVef, acrescido ou não de glicose e inoculado com fungos	44
Tabela 10. Isoenzimas dos coleóptilos de milho obtidos após germinação das sementes no solo LVd inoculado com fungos e não inoculado	47
Tabela 11. Isoenzimas dos coleóptilos de milho obtidos após germinação das sementes no solo LVef, inoculado com fungos e não inoculado	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleta de solos em área de cultura anual e mata nativa – Latossolo Vermelho eutroférico (a), Latossolo Vermelho distrófico (b), solos peneirados (c) e secagem (d).	9
Figura 2. Preparo das placas, inoculação dos fungos e adição da glicose: preparo das placas (a, b), reidratados à 60% da capacidade de retenção de água de cada solo (c), semeadura (d, e), incubados em B.O.D.'s (f), placas com 2 dias de germinação (g) e com 5 dias de germinação (h).	14
Figura 3. Avaliação das plântulas: retirada de pedaços dos coleóptilos (a), medição da altura dos coleóptilos e do comprimento das raízes (b), lavagem (c) e secagem (d).....	15
Figura 4. Maceração do coleóptilo para extração da proteína.....	17
Figura 5. Posição e controle das amostras durante as análises de isoenzimas. (A) placas de Petri com plântulas; (B) placas de acrílico com 24 poços com os coleóptilos.	18
Figura 6. Disposição das fatias do gel na cuba de eletroforese	20
Figura 7. Forma de afastar as fatias para aplicação das amostras	20
Figura 8. Esquema de absorção das amostras por pentes de papel absorvente e posição destes no gel.....	21
Figura 9. Sequência da eletroforese: (A) preparo do gel; (B) polimerização na bandeja de acrílico; (C) carregando o gel com as amostras; (D) eletroforese a 4°C	22
Figura 10. Corte diagonal do gel para indicar a posição das amostras	23
Figura 11. Posição do gel para retirada das fatias	23
Figura 12. Sequência da revelação do gel: (A) fatiamento do gel; (B) cada fatia na caixa de revelação correspondente; (C) distribuição da solução revelação.....	25
Figura 13. Exemplo da intensidade das bandas dos coleóptilos das sementes germinadas no solo sem inoculação de fungos	26

Figura 14. Crescimento radial das colônias dos fungos	28
Figura 15. Produção de esporos pelos fungos crescidos em meio de cultura, com e sem glicose	29
Figura 16. Carboidratos totais residuais no LVd e LVef, inoculados e não inoculados com fungos.....	32
Figura 17. Atividade da desidrogenase observada no Latossolo Vermelho distrófico (A) e Latossolo Vermelho eutroférico (B), acrescido e não acrescido de glicose.....	33
Figura 18. Atividade da amilase observada no Latossolo Vermelho distrófico (A) e Latossolo Vermelho eutroférico (B), acrescido e não acrescido de glicose	35
Figura 19. Altura dos coleóptilos de milho obtidos em solos com e sem adição de glicose	37
Figura 20. Altura dos coleóptilos de milho obtidos em solos inoculados com fungos e não inoculados	39
Figura 21. Crescimento das raízes de milho nos solos adicionados e não adicionados de glicose	41
Figura 22. Crescimento das raízes de milho nos solos inoculados com fungos e não inoculados	42
Figura 23. Matéria seca das plântulas de milho desenvolvidas em solos adicionados e não adicionados de glicose	43

EFEITO DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOLOS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO

RESUMO – O conhecimento da atividade das enzimas hidrolíticas é essencial para compreender as transformações dos nutrientes no solo. O milho é uma das principais culturas sob o ponto de vista econômico. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do crescimento dos fungos em dois tipos de solos, na presença e ausência de glicose, no desenvolvimento das plântulas de milho, no padrão isoenzimático dos coleóptilos, nos teores de carboidratos totais residuais, nas atividades da desidrogenase e amilase. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial. A adição de glicose no meio de cultura aumentou a velocidade de crescimento de *A. flavus* e *Penicillium* sp., mas não de *F. verticillioides*. Na presença de glicose, a produção de esporos aumentou de 1,2 (*F. verticillioides*) e 8,2 vezes (*A. flavus*), e reduzido de 3,5 vezes com *Penicillium* sp. A redução dos teores de carboidratos totais ajustou-se significativamente às equações de 1º e 2º grau. *A. flavus* e *Penicillium* sp., apresentaram maior consumo de carboidratos totais que o solo sem inoculação ou inoculado com *F. verticillioides*. A adição de glicose no solo favoreceu o consumo de carboidratos residuais, provavelmente devido ao estímulo do crescimento dos fungos. Exceto com *F. verticillioides*, a atividade da desidrogenase aumentou em média de 1,5 a 1,8 vez ($p < 0,05$) nos solos com glicose em relação aos solos sem glicose. À atividade da amilase, aumentou 1,3 a 1,5 vez por efeito da adição de glicose no solo. Maior atividade da amilase foi observada no solo Latossolo Vermelho distrófico (LVd) com glicose e inoculado com *A. flavus* e *Penicillium* sp. em relação ao controle. As dimensões das plântulas como altura dos coleóptilos, comprimento das raízes e massa seca das plântulas de milho dos solos adicionados de glicose e/ou inoculados com os fungos foram diminuídas. A expressão genética das sementes de milho foi alterada devido à provável infecção pelos fungos adicionados ao solo. O padrão das isoenzimas dos coleóptilos foi alterado logo aos 5 dias de incubação dos solos inoculados com os fungos, quando comparado com os solos não inoculados.

Palavras chave: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., desidrogenase, amilase.

EFFECT OF FUNGI INOCULATION ON THE ENZYMATIC ACTIVITY SOIL AND SEEDS CORN GERMINATION

SUMMARY - The knowledge about hydrolytic enzymes activity is essential to understand the nutrients transformations in soil. Corn is one of the main crops from the economic view in the whole world. The objective of this study was evaluate the fungi growth in two soil types, in the presence and absence of glucose, coleoptiles development, roots and weight of corn seedlings, coleoptiles isoenzyme pattern, content of total residual carbohydrates, enzymes dehydrogenase and amylase activity. Was used a completely randomized design with factorial arrangement. The glucose addition in culture medium increased the growth rate of *A. flavus* and *Penicillium* sp., but not *F. verticillioides*. In the presence of glucose, the spores number was increased from 1.2 (*F. verticillioides*) and 8.2 times (*A. flavus*), but was reduced 3.5 times with *Penicillium* sp. Reducing the levels of total carbohydrates, significantly adjusted to the equations of 1st and 2nd grade. *A.flavus* and *Penicillium* sp., showed higher carbohydrates consumption that the soil control or inoculated with *F. verticillioides*. The glucose addition in soil, favored the use of residual carbohydrates, probably due fungi growth stimulation. Except *F. verticillioides*, dehydrogenase activity increased in the range 1.5 to 1.8 times ($p<0.05$) in soils with glucose compared to glucose free soil. Amylase activity increased 1.3 to 1.5 times by glucose addition effect in soil. Increased amylase activity was observed in the Distrophic Red Latosol (DRL) with glucose and inoculated with *A.flavus* and *Penicillium* sp., compared to control. The seedlings dimensions as coleoptiles height, root length and dry weight of maize seedlings of the soils added with glucose and inoculated with fungi were decreased. Gene expression of maize seed was changed due probable by fungi inoculated infection in soil. The coleoptiles isoenzymes pattern was amended as early as 5 incubation days in soils inoculated with fungi, when compared with soils not inoculated.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., dehydrogenase, amylase.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho no Brasil é de grande importância para o agronegócio nacional, sendo a base de sustentação para a pequena propriedade e constituindo uma das principais atividades no complexo agro-industrial brasileiro, além de seu papel benéfico como na rotação de culturas no sistema de plantio direto. A previsão de produção de milho em grão em 2009, para ambas as safras, totaliza 51,6 milhões de toneladas, 0,6% maior que a estimada em fevereiro. Na 2ª safra deverá atingir 17,0 milhões de toneladas, 3,2% menos que a previsão de fevereiro, basicamente devido a novas informações de Mato Grosso do Sul e Goiás, onde a área plantada apresenta decréscimos de 12,4% e 34,7%, respectivamente, em parte devido ao atraso na colheita da soja e também pela queda na cotação do milho IBGE (2009). Fora os subsídios agrícolas, o aporte de tecnologia e de insumos é o que faz a diferença. Entre os fatores que afetam a produtividade do milho no Brasil está o atraso na colheita, baixo stand de plantas, falta de tecnologia, insumos e ocorrência de doenças.

A transformação da matéria orgânica no solo é amplamente determinada pela atividade de microrganismos do solo. Os fungos são encontrados em vários tipos de solos atuando em diferentes etapas de diferentes processos bioquímicos de transformação da matéria orgânica. Para seu crescimento, tais microrganismos necessitam de diferentes nutrientes e em diferentes concentrações. A glicose é considerada a fonte de carbono primária para a maioria dos fungos. Na busca de nutrientes no solo, forte competição ocorre entre os microrganismos sapróbios e os fitopatogênicos. Portanto, as condições ambientais podem influir decisivamente no crescimento dos fungos. Para garantir sua sobrevivência, os fungos podem mudar de estado de parasitismo, podendo causar doenças em sementes e nas plantas. Como consequência, a fisiologia das plantas e a expressão genética das enzimas podem ser alteradas.

O objetivo neste estudo foi o de avaliar o efeito da adição ou não da glicose e da inoculação dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* sp., em

dois tipos de solos, sobre o desenvolvimento de plântulas de milho, teores de carboidratos totais e a atividade das enzimas desidrogenase e amilase.

Objetivos específicos:

Avaliar o crescimento dos fungos em meio de cultura sólido, em dois tipos de solos, na presença e ausência de glicose;

- a) No desenvolvimento dos coleóptilos, raízes e no peso das plântulas de milho;
- b) No padrão genético das sementes de milho;
- c) Nos teores de carboidratos totais residuais;
- d) Na atividade enzimática da desidrogenase;
- e) Na atividade enzimática da amilase;
- f) No crescimento radial e produção de esporos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeito das condições ambientais sobre o crescimento dos fungos no solo

Os vegetais não têm a capacidade de aproveitar as fontes orgânicas dos nutrientes provenientes dos resíduos de plantas e animais incorporados ao solo, necessitando sua transformação em compostos minerais, gás carbônico, amônia, nitrato, fosfato, sulfato, outros compostos essenciais como também micronutrientes necessários ao seu desenvolvimento (STEVENSON, 1986). Em florestas, pastagens e desertos, isto é, sistemas não cultivados, a matéria orgânica depositada no solo supre satisfatoriamente as necessidades da vegetação de modo que a sua degradação constitui um processo vital para a manutenção desses sistemas. Nos solos cultivados, parte dos nutrientes é removida pelas colheitas, havendo a necessidade de sua reposição, o que é feita pela fertilização química. Contudo, os restos de cultura são incorporados ao solo, podendo satisfazer, em parte, as necessidades das novas culturas. A dinâmica das transformações da matéria orgânica no solo é amplamente determinada pela atividade de sistemas biológicos de regulação baseados na interação entre solos, macro e micronutrientes. Contudo, cabe aos microrganismos do solo, que apresentam maior valor de biomassa e metabolismo respiratório, a maior participação no processo de decomposição da matéria orgânica (PERSSON, 1980). Além do mais, um grande número de microrganismos pode ser encontrado no solo (VIEIRA & NAHAS, 1998), propiciando diversificadas transformações do material orgânico e dispondo dos diferentes nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas.

Os fungos são encontrados em vários tipos de solos e compõem uma parte da população microbiana que atua em diferentes processos bioquímicos de transformação da matéria orgânica e dos nutrientes. Em relação às enzimas, formas distintas denominadas isoenzimas, ocorrem como resultado das respostas adaptativas ou, então, em diferentes órgãos da mesma planta. Elas podem estar livres no solo ou ligadas à parede celular ou até mesmo localizadas na face externa do plasmalema

(OLIVEIRA et al., 1999). Na busca de nutrientes no solo, forte competição ocorre entre os microrganismos sapróbios e os fitopatogênicos (GRODNITSKAYA & SOROKIN, 2007). Portanto, as condições ambientais podem influir decisivamente no desenvolvimento dos fungos e espécies mais adaptadas à degradação da matéria orgânica, poderão sobrepujar outras espécies que dependem do parasitismo para sua sobrevivência nesse sentido, a competição por nutrientes e espaço tem sido utilizada como forma de alguns fungos fitopatogênicos no solo (VINALE et al., 2008; AMBRÓSIO et al., 2009; SILVA et al., 2007). Contudo, a adição de matéria orgânica no solo na forma de adubo verde não diminuiu a população do fungo *Pythium* spp., que inclusive aumentou junto com as populações de microrganismos (MANCINI et al., 2004).

Em decorrência dessa competição, algumas espécies sapróbias encontram no parasitismo uma forma alternativa para sua sobrevivência (GRODNITSKAYA & SOROKIN, 2007). Dentre a comunidade dos fungos, ocorrem numerosos agentes fitopatogênicos causadores de doenças em sementes e nas plantas (LONGA, 2002; FELIX, 2007). Como consequência dessas doenças, significativas perdas ocorrem na agricultura, podendo até limitar o cultivo de diversas espécies vegetais de interesse econômico.

Várias espécies de fungos podem causar doenças em plantas ocasionando consideráveis prejuízos. Entre estes organismos, *Fusarium* é um dos gêneros de fungo do solo mais ubíquo e importante, causando doenças em muitas plantas e produzindo micotoxinas prejudiciais à saúde humana (WAKELINA et al., 2008). Uma outra espécie *Fusarium graminearum*, foi considerado um dos mais importantes causadores de doenças em trigo no Canadá (HE et al., 2009).

Para seu crescimento, os fungos necessitam de diferentes nutrientes e em diferentes concentrações. No solo, além da disponibilidade desses nutrientes, várias condições ecológicas, incluindo fatores físicos e químicos, podem influir no seu crescimento e atividade dos microrganismos. A busca por nutrientes depende da habilidade metabólica de cada espécie de fungo. Por exemplo, o tamanho e a estrutura de *Fusarium* variaram pela adição de resíduos agrícolas no solo (WAKELINA et al., 2008). Baseando-se no padrão de utilização de 24 fontes de carbono, incluindo

açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, pode-se concluir que *A. flavus* e *F. verticillioides* ocuparam diferentes nichos ecológicos e isto explica a dominância nutricional das espécies de fungos sob diferentes condições ambientais (GIORNI et al., 2009). No processo de desnitrificação ocorre a redução desassimilatória do NO_3^- ou NO_2^- com a produção de N_2O e N_2 e este processo tem sido atribuído principalmente à ação das bactérias. Contudo, foi demonstrado que *F. oxysporum* é capaz também de realizar a desnitrificação e a co-desnitrificação com a produção de N_2 (LAUGHLIN & STEVENS, 2002). Dos açúcares encontrados no solo, a glicose é utilizada pela maioria dos fungos como fonte de carbono e energia. Diversos autores relataram que os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* utilizam glicose em diferentes processos metabólicos (OLSSON, 1994; BEYER et al., 2004; PANAGIOTOU et al., 2008; DAYNES et al., 2008). Por exemplo, a germinação de macroconídios de *F. graminearum*, apenas ocorreu quando incubados em meio com glicose ou sacarose, (BEYER et al., 2004). Altos níveis dos compostos intermediários do ciclo do ácido cítrico (TCA – ciclo de Krebs) foram produzidos quando *F. oxysporum* foi crescido em mistura de acetato e glicose em comparação ao crescimento apenas com glicose (PANAGIOTOU et al., 2008).

No solo, os fungos secretam diversas enzimas que possibilitam a ciclagem e a utilização de nutrientes resultantes da hidrólise de compostos poliméricos. A síntese dessas enzimas depende das condições ambientais e da habilidade de cada espécie e linhagem de fungo. De 115 culturas fúngicas isoladas de diferentes fontes como solo, ar e plantas infectadas, 68% apresentaram habilidade para degradar celulose, sendo que os fungos celulolíticos incluíram *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., (JAHANGEER et al., 2005). Em condições favoráveis de produção de aflatoxina, foi observado acúmulo de vesículas, menor síntese de vacúolos em *Aspergillus parasiticus* e aumento de 35 vezes da atividade das enzimas α -manosidase, succinato desidrogenase e lactato desidrogenase (CHANDA et al., 2009). Fungos isolados de nódulos de raízes de feijão fava como *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, apresentaram maior atividade das enzimas celulase,

pectina liase, poligalacturonase, protease, urease, amidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e arilsulfatase (OMAR & ABD-ALLA, 2000). Os fungos *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *Penicillium frequentans*, isolados de resíduos agrícolas, foram utilizados para a produção de α -amilase (ADENIRAN & ABIOSE, 2009). A atividade da desidrogenase e a diversidade funcional dos microrganismos no solo diminuíram em condições de casa de vegetação em comparação aos solos sob rotação arroz-trigo em campos abertos (LIN et al., 2004).

2.2 Cultura do milho

Devido ao valor nutritivo (Tabela 1) e dos altos rendimentos alcançados, o milho é um dos cereais mais cultivados no mundo, assumindo grande importância social e econômica. A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Dentre os cereais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo, com 51 milhões de toneladas em grãos (total) produzidas em uma área aproximadamente de 13 milhões de hectares na safra 2006/2007 (IBGE, 2009).

A produção brasileira de milho cresceu a uma taxa maior que 4% ao ano, sendo que o principal componente desse crescimento foi aumento da produtividade média (COUTO et al., 2003). Os híbridos simples e triplos representam hoje, cerca de 65% das opções para os produtores, mostrando uma tendência na agricultura brasileira e uma maior necessidade de se aprimorar os sistemas de produção utilizados, para melhor explorar o potencial genético dessas sementes (CRUZ & PEREIRA FILHO, 2007). Segundo COUTO et al. (2003), em algumas regiões do Sul, do Triângulo Mineiro, de São Paulo e, de maneira geral, no Centro-Oeste, são observados os maiores rendimentos da cultura do milho, sendo que estes crescimentos estão geralmente associados a lavouras de maior área, de orientação comercial, onde normalmente é conduzido um sistema de rotação milho-soja e é mais freqüente o uso do sistema plantio direto.

Nos últimos anos, tem aumentado substancialmente o uso do sistema de plantio direto, sendo que atualmente, mais de 26 milhões de hectares, já são cultivados com este sistema e cerca de 3 milhões de hectares ocupados com a cultura do milho; e nas regiões onde se cultiva a soja e o milho, o sistema plantio direto se beneficia desta rotação que é favorável a ambas as culturas, o mesmo ocorrendo para o plantio do milho “safrinha” plantado após a soja precoce (COELHO et al., 2004).

O plantio direto é um sistema onde a semente é depositada diretamente no solo, onde os resíduos da cultura anterior permanecem na superfície e as plantas daninhas são controladas quimicamente. Uma vez que o sistema plantio direto altera as condições químicas, físicas e biológicas do solo, também ocorrerão alterações no desenvolvimento das plantas e na produtividade.

Tabela 1 - Valores médios dos nutrientes que compõem o milho.

Composição do Milho					
Parâmetros Gerais		Minerais		Aminoácidos - %	
Matéria Seca	87,68 %	Na	0,00 %	Alanina	0,63
Proteína Bruta	8,49 %	Ca	0,04 %	Arginina	0,37
Matéria Mineral	1,15 %	Mg	0,10 %	Cistina	0,28
Fibra Bruta	2,25 %	P total	0,26 %	Fenilalanina	0,40
Extrato Etéreo	3,67 %	K	0,35 %	Fenilalanina + Tirosina	0,66
Nutrientes Digestíveis Totais	90 %	Cu	4,65 mg/kg	Glicina	0,32
E. Metabolizável Suínos	3,421 kcal/kg	Mo	0,40 mg/kg	Isoleucina	0,28
E. Metabolizável - Aves	3,230 kcal/kg	Zn	27,35 mg/kg	Leucina	1,00
E. Metab. - Ruminantes	1,43 Mcal/kg	Fe	58,67 mg/kg	Glicina + Serina	0,71
E. Digestível Suínos	3,472 kcal/kg	Mn	7,34 mg/kg	Histidina	0,24
-	-	F	0,01 mg/kg	Lisina	0,24
-	-	-	-	Metionina	0,21
-	-	-	-	Metionina + Cistina	0,48
-	-	-	-	Prolina	0,81
-	-	-	-	Serina	0,39
-	-	-	-	Tirosina	0,27
-	-	-	-	Treonina	0,27
-	-	-	-	Triptofano	0,05
-	-	-	-	Valina	0,37

Fonte: <http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3024>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do meio físico e coleta do solo

Foram selecionados solos de duas áreas localizadas no campus da UNESP em Jaboticabal, SP e classificados de acordo com Embrapa (2006). Uma área de cultivo anual com milho e soja (Latossolo Vermelho distrófico – LVD) e outra de mata nativa (Latossolo Vermelho eutrófico – LVeF). Em março de 2008 após as culturas de verão, amostras de solo foram coletadas na camada de 0-15 cm de profundidade, com auxílio de um enxadão, secos ao ar durante oito dias e passados em peneiras com malha de 4 mm (Figura 1).

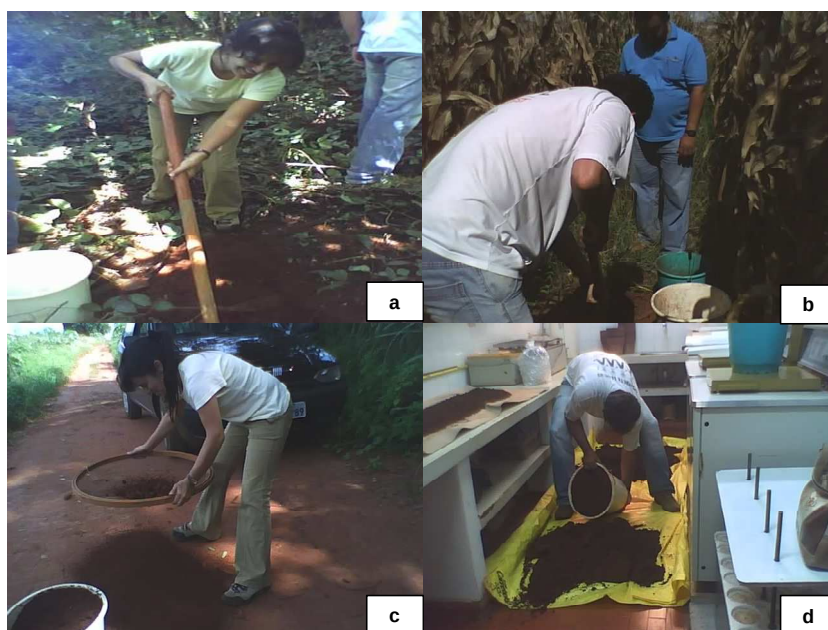


Figura 1. Coleta de solos em área de cultura anual e mata nativa – Latossolo Vermelho eutrófico (a), Latossolo Vermelho distrófico (b), solos peneirados (c) e secagem (d).

3.2 Isolamento e cultivo dos fungos utilizados neste trabalho

Os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium* sp., foram isolados de sementes de milho (*Zea mays*) e identificados de acordo com BARNETT & HUNTER (1998) e cultivados em meio de cultura BDYA (MELO & CAMPOS, 1989), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio de cultura BDYA (MELO & CAMPOS, 1989):

Compostos	Quantidades
Extrato de Batata	1000 mL
Glicose	20,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Agar	15,0 g
pH	7,0

3.3 Crescimento dos fungos

Uma vez isolados, os fungos foram transferidos para tubos de ensaio com meio BDYA e mantidos em incubadora tipo BOD a 30°C até o desenvolvimento destes. Após, todos os isolados foram mantidos na geladeira a 4°C até a sua utilização.

3.4 Obtenção das sementes de milho

Foram obtidas sementes genéticas (SG3) de milho NK1008, não tratadas e procedentes da safra 2007/2008. As amostras foram submetidas ao Teste de Sanidade de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS – 1992). Especificações conforme Tabela 3.

Tabela 3. Controle das análises realizadas no laboratório de Sanidade de Sementes.

Data de entrada no laboratório	04/03/2008
Espécie	Milho
Campo	1469
Cultivar	NK1008
Tratamento	Não
Safrá	2007/2008
Tipo	SG3
Data de instalação	10/03/2008
Nº de sementes para análise	400
Data de entrada no freezer	11/03/2008
Data de saída do freezer	12/03/2008
Data da avaliação	19/03/2008
Observações	Amostra Geral
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,25%
<i>Aspergillus flavus</i>	1,00%
<i>Penicillium sp.</i>	0,00%
Saprófitas	3,00%

3.5 Multiplicação das culturas fúngicas e preparo do inóculo para inoculação no solo

Colônias puras de cada espécie avaliada foram transferidas para o centro de placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura Sabouraud (PELCZAR et al., 1996) conforme Tabela 4, com e sem glicose, para determinação do diâmetro das colônias e contagem da concentração de esporos, incubados à temperatura de 30°C por 10 dias. As colônias foram medidas com auxílio de uma régua e o resultado apresentado em milímetros. Após esse período, 10 mL de solução de Tween 0,1% (p/v) foram

adicionados a cada placa e para cada fungo, determinaram-se os números de esporos, com base na média de três leituras (repetições) realizadas em câmara de Neubauer.

Tabela 4. Composição do meio de cultura Sabouraud (PELCZAR et al., 1996):

Compostos	Quantidades com glicose	Quantidades sem glicose
H ₂ O	1000 mL	1000 mL
Peptona	10,0 g	10,0 g
Glicose	40,0 g	-
Ágar	14,0 g	14,0 g
pH	7,0	7,0

3.6 Determinação da concentração de esporos

Após a multiplicação dos fungos em meio BDYA, foram adicionados 10 mL de água destilada aos tubos de cultivo, raspando com cuidado somente os esporos e procedendo a filtragem em funil com gaze. Desta suspensão foi retirada uma alíquota de 0,1 mL, diluída em 9,9 mL de água destilada, agitado, contado em câmara de Neubauer, estabelecida uma padronização de 1×10^6 esporos/g solo. Em seguida foi feita a contaminação do solo conforme Tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos utilizados no desenvolvimento deste ensaio:

Tratamentos	Semeadura do milho após "X" dias da inoculação					Repetições / placas		Nº de sementes / placa	
						sem glicose	com glicose	sem glicose	com glicose
Solo sem inoculação	5	9	13	17	21	3	3	4	4
<i>Fusarium verticillioides</i>	5	9	13	17	21	3	3	4	4
<i>Aspergillus flavus</i>	5	9	13	17	21	3	3	4	4
<i>Penicillium</i> sp.	5	9	13	17	21	3	3	4	4

3.7 Crescimento dos fungos no solo

Foi estabelecida a quantidade de 62 g de cada amostra de solo, devido a capacidade das placas de Petri (90 mm). Um volume de água destilada foi adicionado às referidas placas, correspondendo à 60% da capacidade de retenção de água de cada solo. Nesta água de reidratação, foram adicionados por grama de solo, 1×10^6 esporos dos fungos e 1% de glicose, de acordo com o tratamento experimental. Da variedade NK1008 de milho (*Zea mays* L), foram semeadas 4 sementes por placa. As placas de Petri com os solos e inóculos foram mantidos sem luz, a uma temperatura de 25°C por 5 dias (Figura 2).

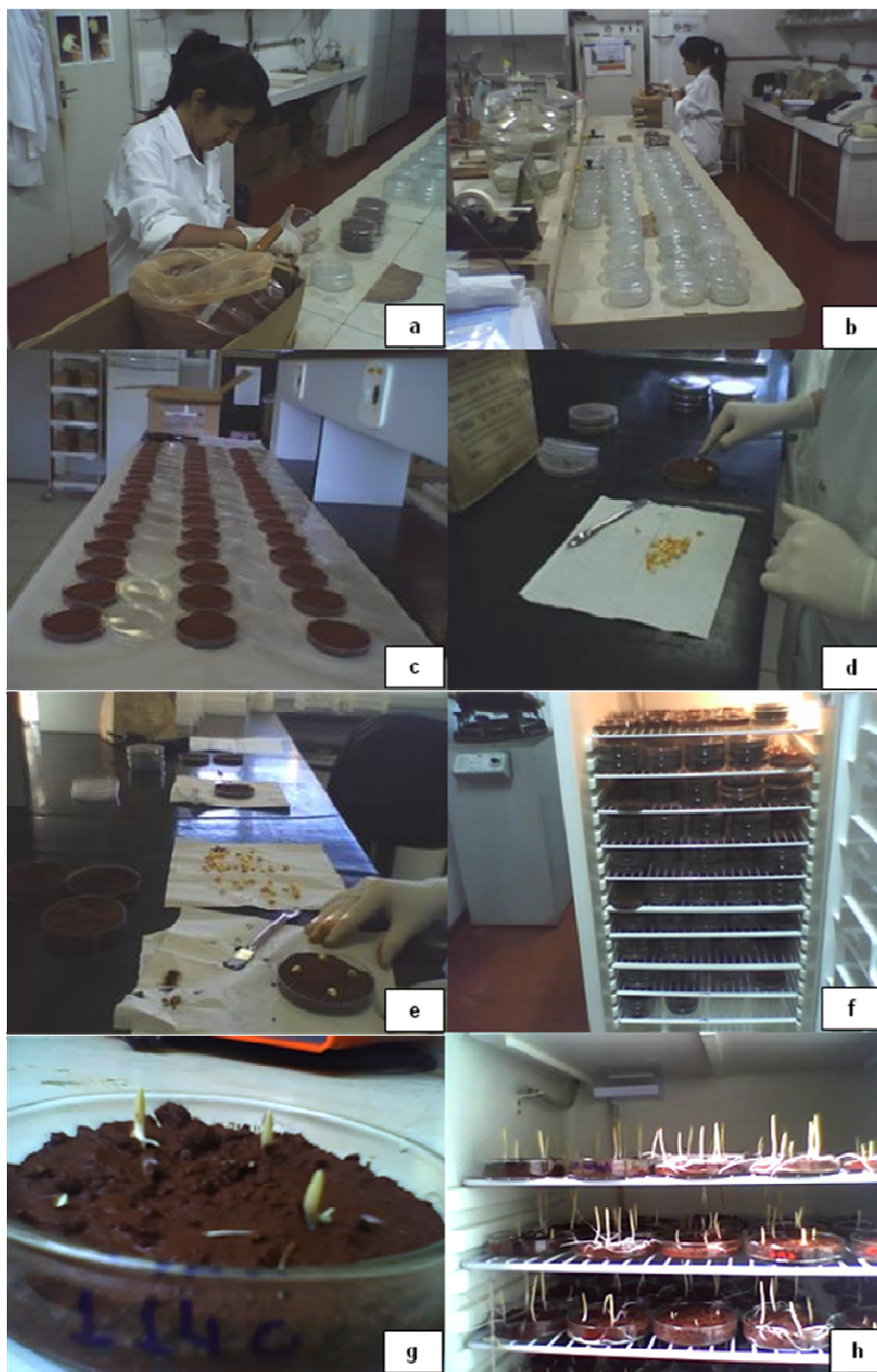


Figura 2. Preparo das placas, inoculação dos fungos e adição da glicose: preparo das placas (a, b), reidratados à 60% da capacidade de retenção de água de cada solo (c), semeadura (d, e), incubados em B.O.D.'s (f), placas com 2 dias de germinação (g) e com 5 dias de germinação (h).

3.8 Avaliação da altura dos coleóptilos, comprimento das raízes e massa da matéria seca

Após retirar um pequeno pedaço do coleótilo (10 a 12 mm), depositado este em uma placa com 24 poços (Figura 3), as plântulas foram retiradas do solo, medido a altura dos coleóptilos, o comprimento das raízes, lavadas em água corrente para retirada do solo e levadas para estufa a 60°C por 2 dias para posterior determinação da matéria seca.



Figura 3. Avaliação das plântulas: retirada de pedaços dos coleóptilos (a), medição da altura dos coleóptilos e do comprimento das raízes (b), lavagem (c) e secagem (d).

3.9 Determinação dos carboidratos totais

Os teores de carboidratos foram determinados com base em ANGERS & MEHUYS (1989), avaliados por ocasião e após 5, 13 e 21 dias após incubação. Para isto 1 g de terra fina seca ao ar (TFSA) foi colocado em tubo de ensaio 18 x 180 mm onde misturou-se com 10 mL de ácido sulfúrico 1,5 mol/litro, vedados com papel

alumínio e mantidos por 24 horas a 80°C. Após este tempo, o solo foi filtrado, lavado com água quente, vertido sobre um funil com papel de filtro e completado o volume para 100 mL. Preparou-se uma solução antrona para posterior titulação de 5 mL em cada tubo. Após vigorosa agitação dos tubos, com repouso seqüente de 15 minutos, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 607 nm.

3.10 Atividade da desidrogenase

A atividade da desidrogenase foi determinada após 13 dias de incubação, em 3,0 g de solo com 0,03 g CaCO₃ e 0,5 mL solução aquosa de TTC 3% (tetrazolium cloreto de sódio) à 37°C por 24 horas (CASIDA et al., 1964).

3.11 Atividade da amilase

A atividade da amilase foi determinada após 13 dias de incubação, na mistura de 2,0 g solo, 0,3 mL tolueno e 5 mL tampão acetato 0,1 M pH 5,0 contendo 50 mg amido solúvel à 37°C por 24 h (COLE, 1977).

3.12 Eletroforese de isoenzimas - ALFENAS (1998)

3.12.1 Tampão de extração das proteínas

Compostos	Quantidades
Sacarose	167,0 g
Ácido ascórbico	83,0 g
H ₂ O	1000 mL
pH	7,0

3.12.2 Extração da proteína do material vegetal e sua maceração

Por meio de uma pipeta multicanal adicionou-se 0,1mL do tampão de extração em cada poço da placa ou “grinder box” (Figura 4), contendo um pequeno pedaço do coleóptilo de aproximadamente 10 – 12 mm, retirado das placas de Petri (Figura 5), macerado a temperatura ambiente com um macerador até o tecido ficar completamente triturado.

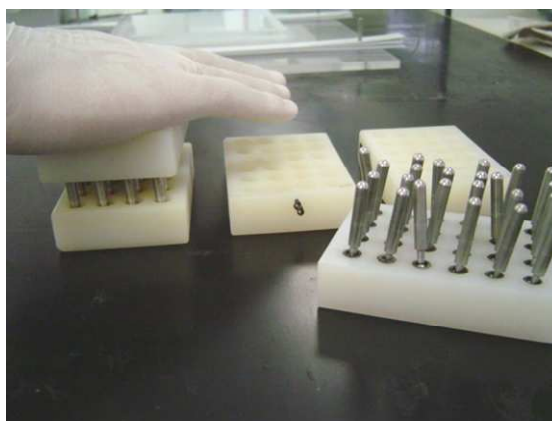


Figura 4. Maceração do coleóptilo para extração da proteína.

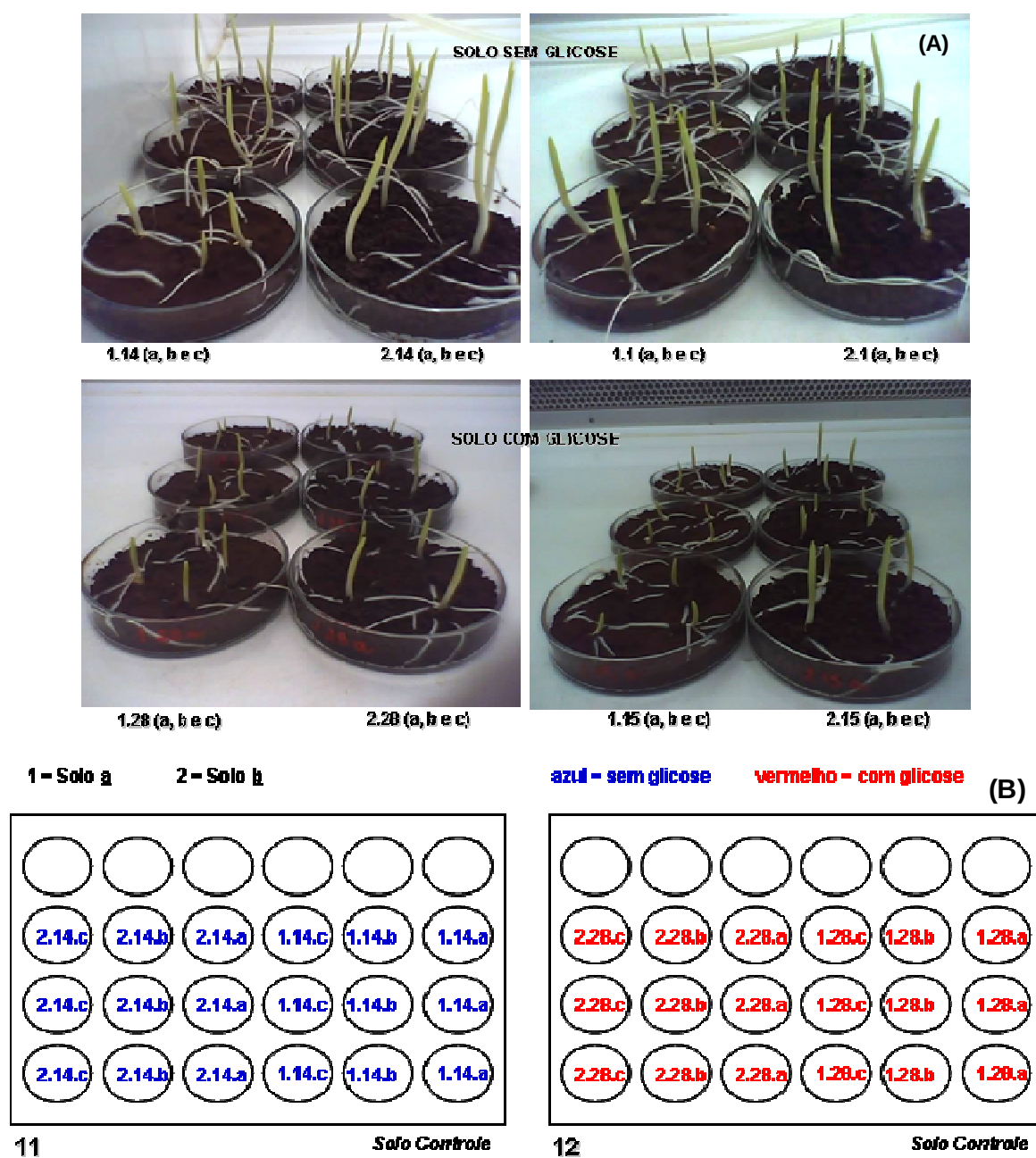


Figura 5. Posição e controle das amostras durante as análises de isoenzimas. (A) placas de Petri com plântulas; (B) placas de acrílico com 24 poços com os coleótipos.

3.12.3 Tampão do eletrodo

Compostos	Quantidades
L-histidine	8,54 g
Ácido cítrico	3,5 g
H ₂ O	850 mL
pH	5,0

3.12.4 Tampão do gel

Compostos	Quantidades
Tampão do eletrodo	70 mL
H ₂ O	430 mL

3.12.5 Preparo do gel de amido

Em um erlenmeyer com capacidade para 1000 mL, foram adicionados 68 g de amido de batata, 13 g de sacarose e 500 mL de tampão do gel. Os componentes foram misturados num agitador por aproximadamente 10 minutos (Figura 9A). Aqueceu-se até fervura no microondas derramou-se rapidamente numa bandeja de acrílico, revestida com fita adesiva nas aberturas das laterais. As bandejas foram deixadas na temperatura ambiente sobre bancadas, até ficar com coloração opaca e as fitas adesivas das laterais das bandejas foram retiradas (Figura 9B).

3.12.6 Carregamento do gel

Foram adicionados 300 mL do tampão do eletrodo em cubas de acrílico e mantidas a 4°C. Cortaram-se com estilete 3 fatias do gel que foram dispostas: uma fatia de 2 cm paralela ao cátodo, uma fatia a 7 cm da primeira (no meio do gel) e uma fatia a 2 cm do ânodo do gel, conforme Figura 6.

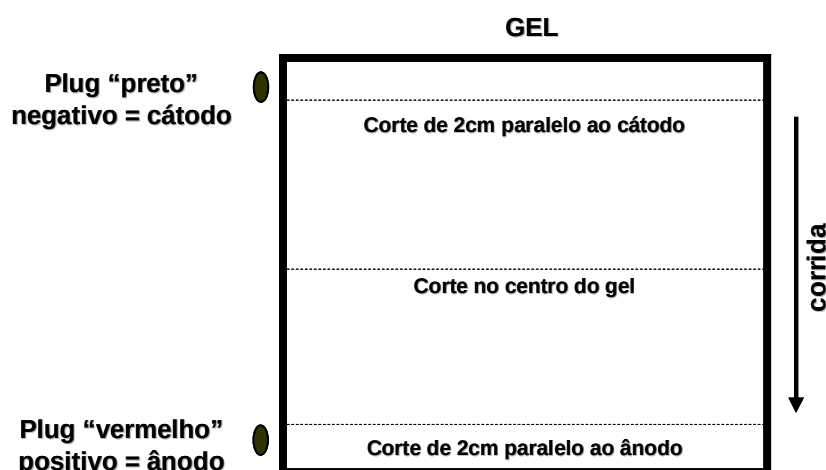


Figura 6. Disposição das fatias do gel na cuba de eletroforese.

Afastou-se um pouco a fatia inferior e superior para colocar as amostras maceradas no gel, conforme Figura 7.

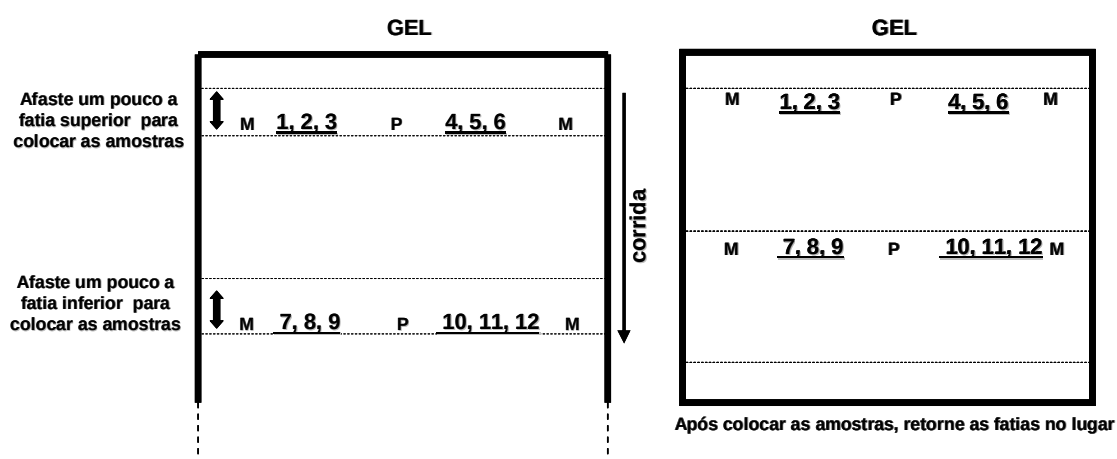


Figura 7. Forma de afastar as fatias para aplicação das amostras.

Colocou-se os "wicks" (pentes – papel absorvente) nos poços das placas por aproximadamente 10 segundos, para absorção da amostra. Adicionou seis wicks no corte inferior do gel e seis no corte superior, perfazendo um total de 72 amostras/gel e wicks marcadores nas extremidades do gel (Figura 8 e 9C), para acompanhar a corrida das amostras.

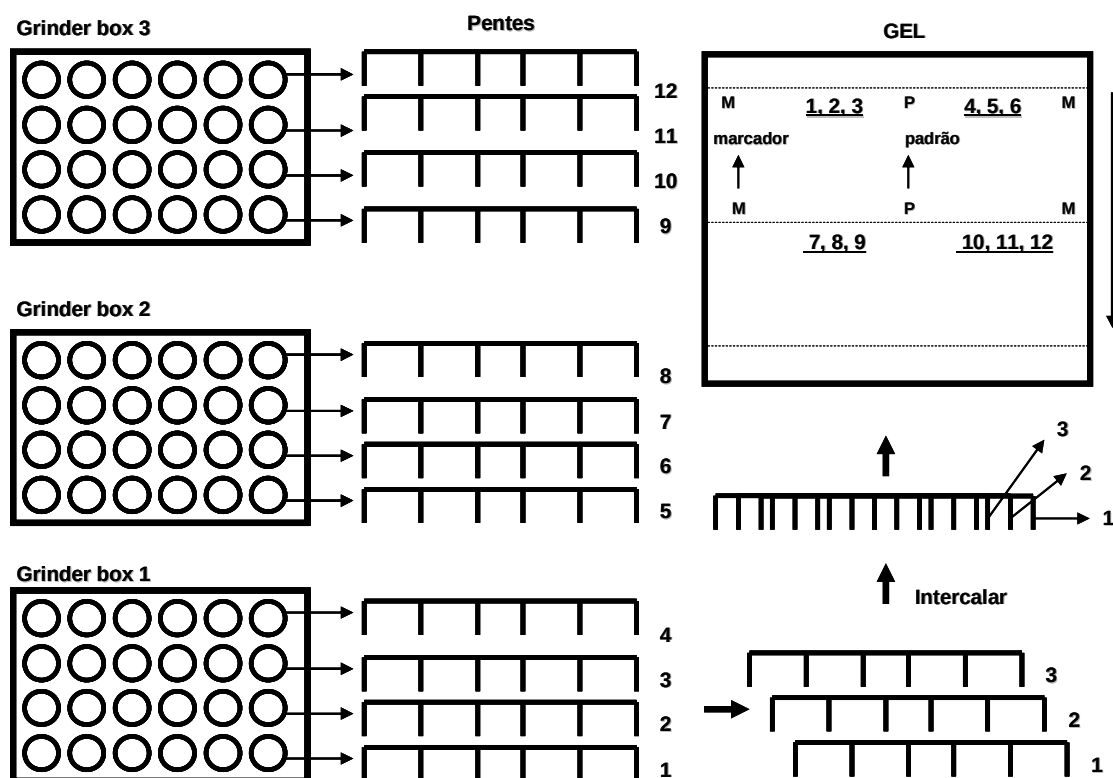


Figura 8. Esquema de absorção das amostras por pentes de papel absorvente e posição destes no gel.

Retornaram-se as fatias do gel novamente na bandeja, posicionou a bandeja com o gel na cuba de eletroforese na direção correta da corrida (negativo para o positivo) e conectou esta numa fonte de força com potência de 18 watts (Figura 9D).

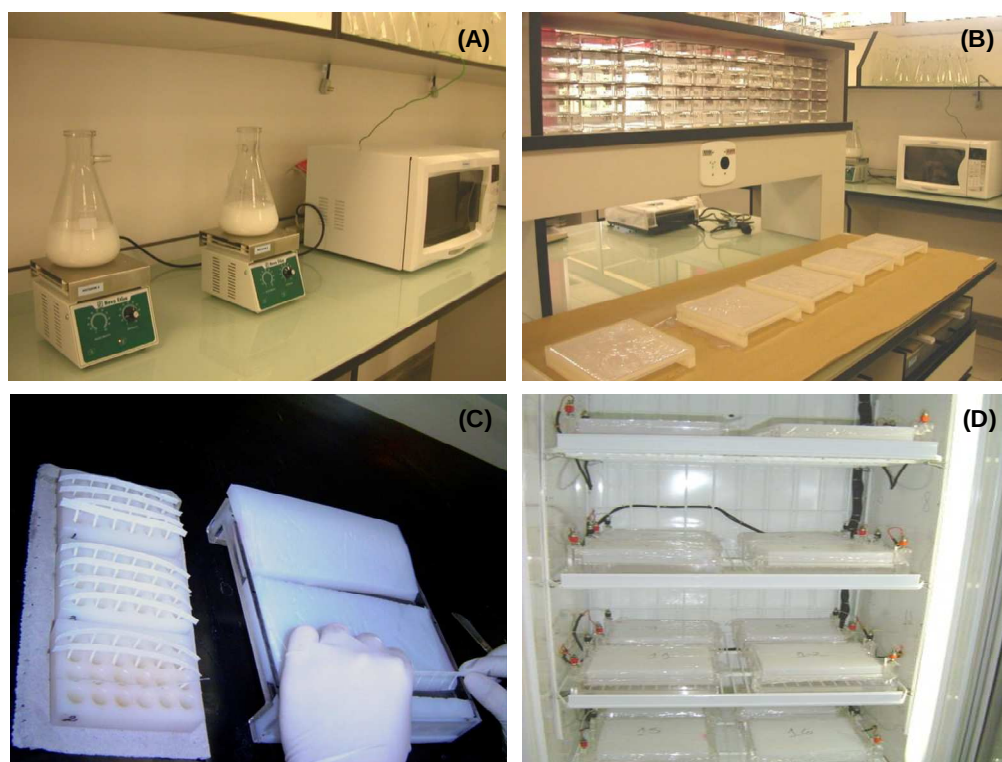


Figura 9. Sequência da eletroforese: (A) preparo do gel; (B) polimerização na bandeja de acrílico; (C) carregando o gel com as amostras; (D) eletroforese a 4°C.

3.12.7 Fatiamento do gel

Depois de finalizada a corrida no gel, a fonte de força foi desligada, quando visualizou-se o marcador aproximadamente no centro do gel. O gel foi removido da cuba, cortado um pequeno pedaço na lateral superior esquerda próximo ao ânodo em diagonal e outra na fatia inferior próximo ao cátodo (Figura 10) e retirados os wicks do gel. Este procedimento é para indicar o início do carregamento do gel.

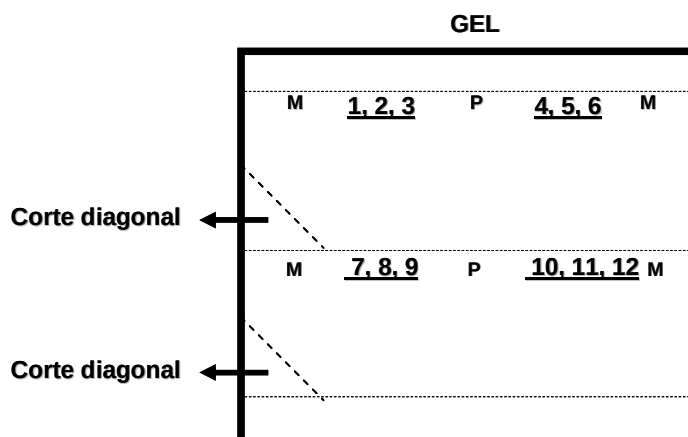


Figura 10. Corte diagonal do gel para indicar a posição das amostras.

Fatiou a metade superior e inferior, sobre uma placa de acrílico, com a metade superior para a esquerda e a inferior para a direita, conforme Figura 11.

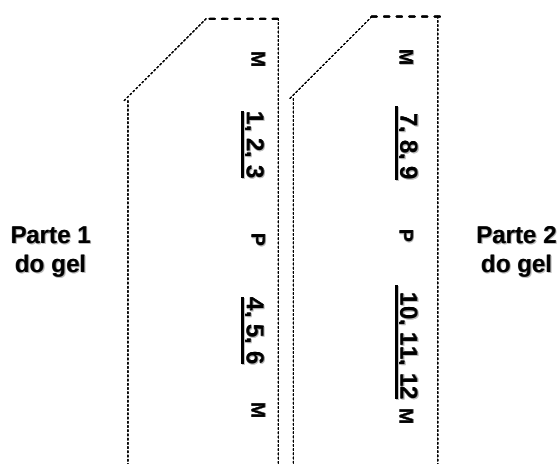


Figura 11. Posição do gel para retirada das fatias.

Utilizou-se 6 espaçadores sobrepostos do lado direito e 6 do lado esquerdo da placa, com espessura aproximada de 1,25mm, sustentados por um parafuso (Figura 12A). Posicionou um fio de nylon nos lados esquerdo e direito da placa e cortou o gel lentamente, retirando uma fatia de 1,25 mm, perfazendo um total de 5 fatias. Cada fatia foi depositada na caixa de revelação correspondente a enzima (Figura 12B).

3.12.8 Revelação do gel

Foram utilizados os seguintes sistemas isoenzimáticos:

- 1) MDH/ADH – Malato desidrogenase e álcool desidrogenase;
- 2) IDH/PGM – Fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase;
- 3) IDH/PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase;
- 4) ACP – Fosfatase ácida;
- 5) PHI/PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase e Isomerase fosfohexose.

Para cada fatia do gel, foram misturados os reagentes correspondentes a cada enzima relacionados na Tabela 6. As caixas com as fatias (Figura 12C) foram incubadas à temperatura de 36 – 40°C por no mínimo 2 horas.

Tabela 6. Protocolo para revelação das enzimas, calculado por fatia de gel.

Reagentes	Isoenzimas				
	MDH/ADH	IDH/PGM	IDH/PGD	ACP	PHI/PGD
6 ácido fosfogluconico (6-PGA)	-	-	0,06 g	-	0,06 g
Ácido DL málico	0,38 g	-	-	-	-
Álcool Etílico - 95%	0,75 mL	-	-	-	-
Ácido α -naftil fosfato (N7000)	-	-	-	0,20 g	-
Fast Blue B salt (D-9805)	-	-	-	0,08 g	-
Frutose 6 fosfato (F6P)	-	-	-	-	0,15 g
Glicose 6-fosfato desidrogenase	-	100 und	-	-	200 und
H ₂ O destilada	-	-	-	100 mL	-
Ácido isocítrico	-	0,20 g	0,20 g	-	-
MgCl ₂	-	0,20 g	0,20 g	-	0,20 g
Thiazolyl B Tetrazolium Bromide (MTT)	0,02 g	0,03 g	0,03 g	-	0,03 g
Nicotinamida adenina (NAD)	0,03 g	0,04 g	-	-	-
Nicotinamida adenina dinucl. fosfato	-	0,02 g	0,02 g	-	0,02 g
Fenazina Metasulfato (PMS)	0,008 g	0,01 g	0,1 g	-	0,01 g
Tris HCl 0,05M pH = 8,0	-	-	75 mL	-	75 mL
Tris HCl 0,1M pH = 8,5	-	80 mL	-	-	-
Tris HCl 0,1M pH = 9,1	75 mL	-	-	-	-

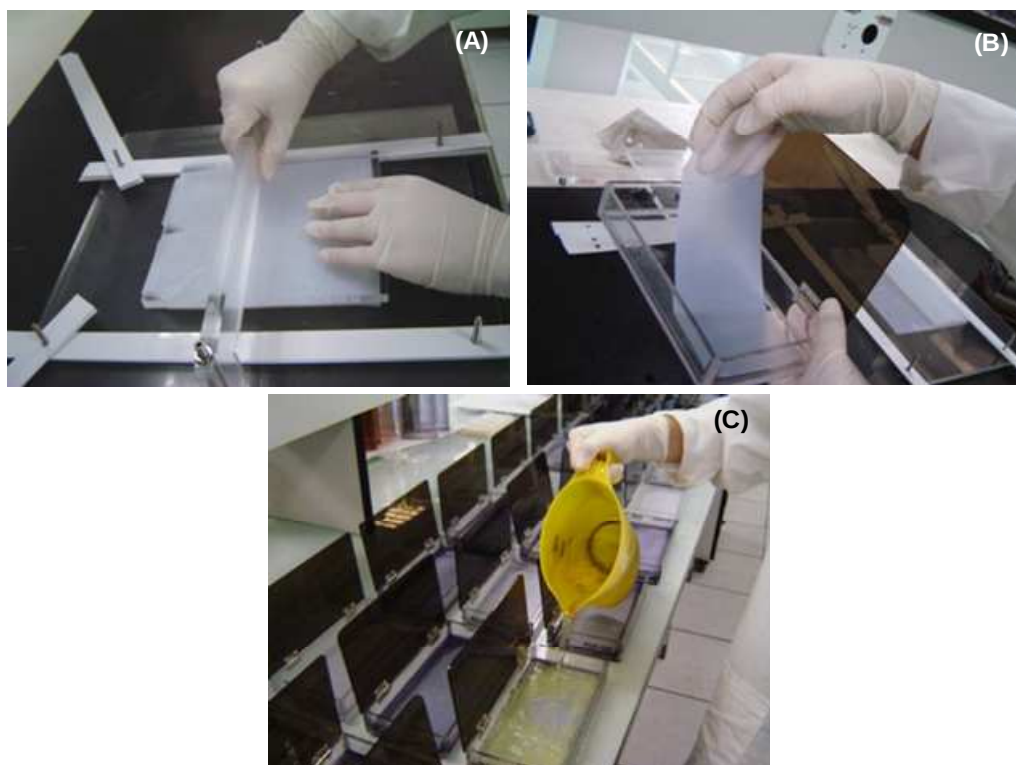


Figura 12. Sequência da revelação do gel: (A) fatiamento do gel; (B) cada fatia na caixa de revelação correspondente; (C) distribuição da solução revelação.

3.12.9 Vizualização dos géis de acordo com a intensidade das bandas

Realizou-se a leitura visual da intensidade das bandas de cada fragmento do coleóptilo. Comparações foram feitas entre o controle (solo não inoculado) com os solos inoculados com os fungos conforme exemplo da Figura 13.

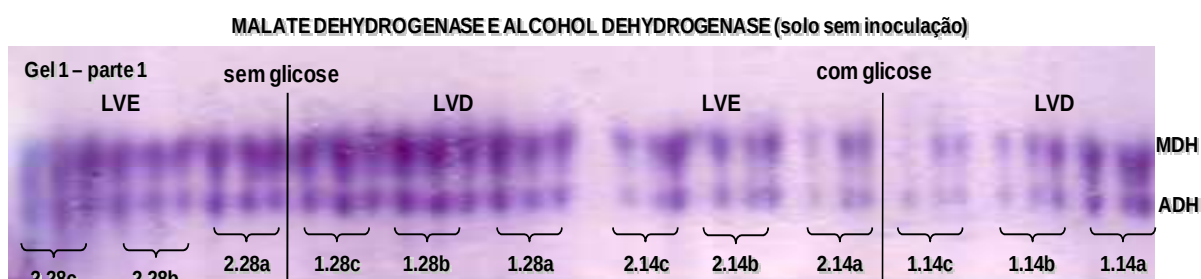


Figura 13. Exemplo da intensidade das bandas dos coleóptilos das sementes germinadas no solo sem inoculação de fungos.

3.13 Análise estatística

Todas as determinações foram feitas com três repetições. Os dados obtidos das atividades de amilase e desidrogenase, da inoculação dos fungos, presença e ausência de glicose, desenvolvimento dos coleóptilos, raízes, peso das plântulas de milho, foram submetidos à análise de variância (Teste F), que seguiu o delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial (4 x 2) separadamente para cada solo. Quando o resultado da análise de variância foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os conteúdos de carboidratos totais obtidos ao longo dos períodos de incubação foram submetidos à análise de regressão polinomial.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Crescimento dos fungos em meio de cultura

O crescimento radial e a produção de esporos dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* sp., diferiram na velocidade e na dependência de glicose no meio de cultura. O crescimento radial aumentou linearmente e atingiu o máximo em 7-8 dias. Porém, enquanto o crescimento de *A. flavus* e *F. verticillioides* foram limitados pelo diâmetro da placa, *Penicillium* sp., apresentou crescimento radial de 27 mm e a seguir uma fase estacionária (Figura 14).

Estes resultados confirmam os estudos de TRINCI (1969), que embora com outros fungos, menor velocidade de crescimento radial de *P. chrysogenum* foi observada em relação a *A. nidulans* e *Mucor hiemalis*. A maioria dos fungos utiliza glicose que ocupa posição central no metabolismo (CARLILE & WATKINSON, 1996). Essa dependência pela glicose foi observada no presente estudo para os fungos *A. flavus* e *Penicillium* sp., que tiveram seu crescimento restringido 44 e 21%, respectivamente, mas não para *F. verticillioides*.

O número de esporos foi aumentado de 1,2 (*F. verticillioides*) e 8,2 vezes (*A. flavus*), porém foi reduzido de 3,5 vezes (*Penicillium* sp.) quando houve comparação dos cultivos na presença e ausência de glicose (Figura 15).

A produção de esporos pode ocorrer na fase de diminuição da velocidade de crescimento vegetativo para um valor baixo ou para zero devido à falta de nutrientes ou pode resultar no acúmulo de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo fúngico (CARLILI & WATKINSON, 1996).

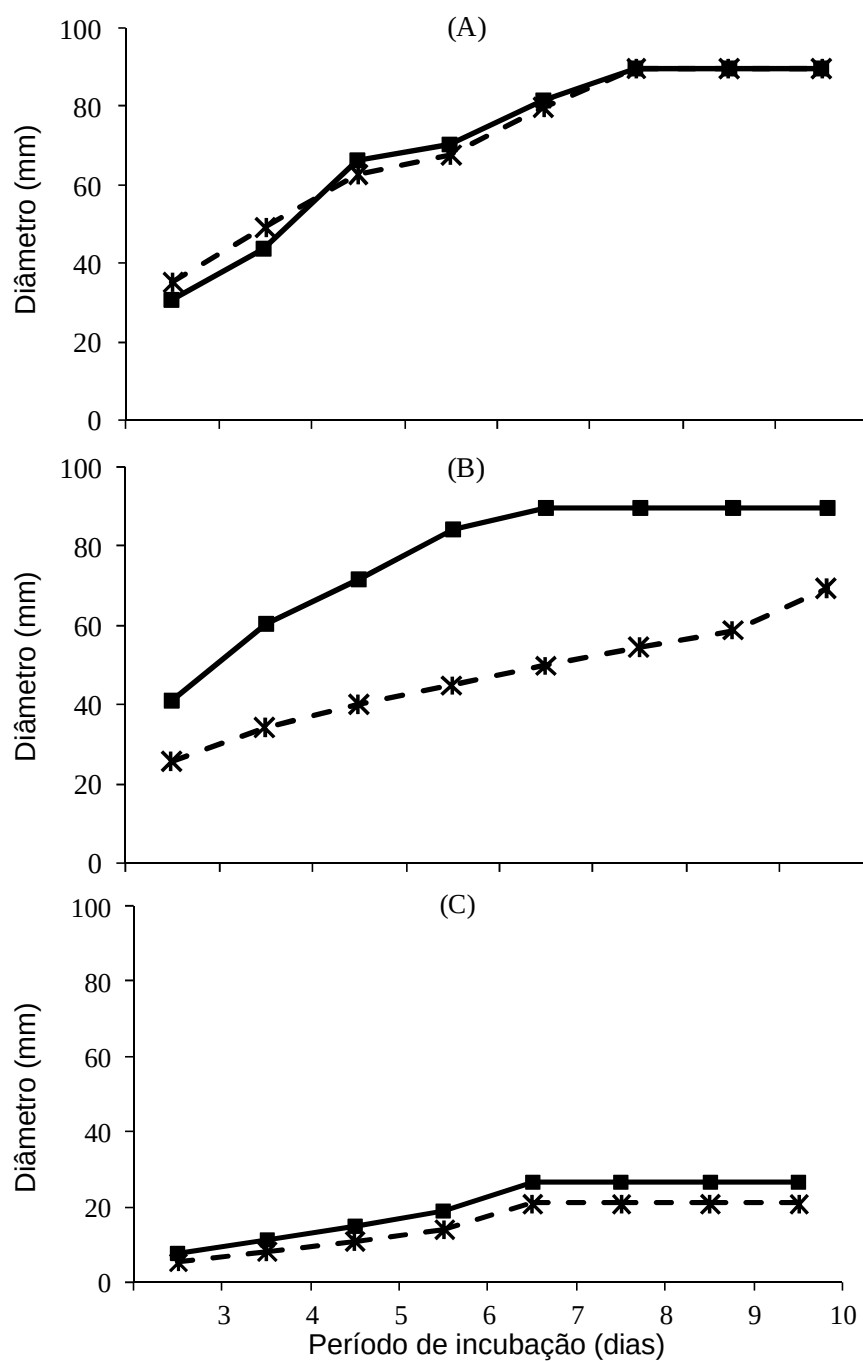


Figura 14. Crescimento radial das colônias dos fungos *Fusarium verticillioides* (A), *Aspergillus flavus* (B) e *Penicillium* sp. (C) em meio de cultura adicionado (—■—) e não adicionado de glicose (— — * —)

Nenhuma dessas condições deve ter provocado a diminuição do número de esporos por *A. flavus* e *F. verticillioides* em que a velocidade de crescimento foi limitada pelo tamanho da placa, mas sim pela limitação do conteúdo de nutrientes. Isso explica a pequena redução do número de esporos por *F. verticillioides* (1,2 vezes) quando comparada com *A. flavus* (8,2 vezes) porque o crescimento de *F. verticillioides*, não dependeu da adição de glicose no meio de cultura.

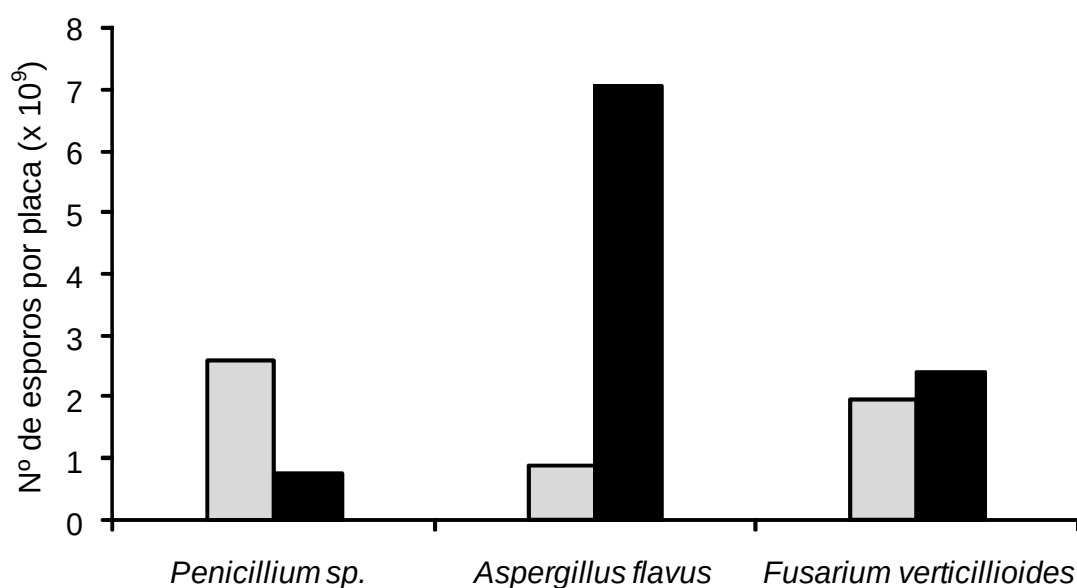


Figura 15. Produção de esporos pelos fungos crescidos em meio de cultura, com (■) e sem glicose (□).

Porém, a ausência de glicose estimulou a produção de esporos por *Penicillium sp.*, possivelmente em decorrência da ausência de nutriente. Conforme CALVO et al. (2002), o crescimento e a produção de esporos em *A. flavus* são estimulados em meio de cultura contendo açúcares simples como glicose, frutose, sacarose e sorbitol como fonte única de carbono porém, as condições de crescimento do *Penicillium sp.*, empregadas por este autor, foram diferentes das utilizadas neste trabalho.

4.2 Crescimento dos fungos no solo

A quantidade de carboidratos totais residuais encontrada após crescimento dos fungos no solo pelo período de até 21 dias, foi em sua maioria decrescente (Figura 16).

Ficou evidenciado que: a) na maioria das respostas, a redução dos teores de carboidratos totais se ajustou significativamente às equações de 1º e 2º grau (Tabela 6); b) porém, no solo não inoculado ou inoculado com *F. verticillioides* as respostas não foram significativas (Tabela 7); c) o solo LVef, considerado mais rico, apresentou maior quantidade de carboidratos totais que o LVd (Figura 16 - C, D); d) como era esperado, a adição de glicose aumentou a quantidade de carboidratos totais (Figura 16 - B, D); e) o consumo de carboidratos ajustado às equações de 1º grau foi observado quando o solo foi adicionado de glicose; f) o consumo de carboidratos variou com os diferentes fungos: *Penicillium* sp. (consumiu 20 a 83% do total de carboidratos), *A. flavus* (18 a 79%), *F. verticillioides* (0 a 85%) e no solo não inoculado (16 a 69%) (Figura 16).

No solo LVef inoculado com *F. verticillioides*, não houve variação do consumo de carboidratos totais, o que está de acordo com a ausência do efeito da glicose no crescimento desse fungo em meio de cultura. Nessa circunstância, o consumo de carboidratos totais observado no solo LVd com glicose e inoculado por *F. verticillioides*, pode ser atribuído aos microrganismos presentes no solo. Analisando-se as quantidades residuais nos solos LVd e LVef adicionados de glicose e inoculados com *A. flavus* e *Penicillium* sp., o consumo de carboidratos totais foi mais pronunciado do que nos solos LVd e LVef sem glicose. Esse resultado sugere que a presença de glicose pode ter estimulado o crescimento de *A. flavus* e *Penicillium* sp. Quando foi adicionada glicose, houve maior consumo de carboidratos, principalmente no solo inoculado com *A. flavus* e *Penicillium* sp.

Tabela 7. Equações referentes aos teores de carboidratos totais residuais (μg), após crescimento dos fungos inoculados em solos, adicionados não e não adicionados de glicose.

Glicose	Inoculação	Grau	Equação	R ²	F ⁽¹⁾
Latossolo Vermelho distrófico					
Ausente	Sem inoculação	1°	y = 4.475 - 76,1x	0,53	12,03**
		2°	y = 4.959 – 291,1x + 10,2x ²	0,86	7,35**
	A. flavus	1°	y = 4.370 - 24,0x	0,01	1,19 ^{ns}
		2°	y = 5933 - 718,4x + 32,8x ²	0,91	76,71**
	F. verticillioides	1°	y = 4.272 – 76,1x	0,24	12,03**
		2°	y = 5.213 – 494,2x + 19,7x ²	0,80	27,81**
	Pennicilium sp.	1°	y = 4.904 – 136,3x	0,44	38,57**
		2°	y = 6.080 – 659,5x + 24,7x ²	0,94	43,53**
Presente	Sem inoculação	1°	y = 16.072 – 648,8x	0,62	51,91**
		2°	y = 16.648 – 905,3x + 12,12x ²	0,64	0,62 ^{ns}
	A. flavus	1°	y = 9.412 – 404,9x	0,44	20,22**
		2°	y = 12.413 – 1.739x + 63,0x ²	0,81	16,83**
	F. verticillioides	1°	y = 12.090 – 463,1x	0,89	26,45**
		2°	y = 13.403 – 1.046,8x + 27,6x ²	0,99	3,22 ^{ns}
	Pennicilium sp.	1°	y = 11.636 – 480,9 x	0,81	28,52**
		2°	y = 13.272,5 – 1.208x + 34,40x ²	0,96	5,00**
Latossolo Vermelho eutroférico					
Ausente	Sem inoculação	1°	y = 13.151 – 66,88x	0,19	1,17 ^{ns}
		2°	y = 13.877 – 389,9x + 15,26x ²	0,53	2,08 ^{ns}
	A. flavus	1°	y = 12.826 – 145,5x	0,24	5,52*
		2°	y = 14.882 – 1.059x + 43,18x ²	0,98	16,69**
	F. verticillioides	1°	y = 14.083 – 43,47x	0,07	0,48 ^{ns}
		2°	y = 14.543 – 248,3x + 9,68x ²	0,19	0,84 ^{ns}
	Pennicilium sp.	1°	y = 13.311 – 157,5x	0,44	6,47*
		2°	y = 14.676 – 764,3x + 28,67x ²	0,94	7,36**
Presente	Sem inoculação	1°	y = 22.985 – 272,6x	0,57	2,04 ^{ns}
		2°	y = 21.400 + 432,1x – 33,29x ²	0,86	1,05 ^{ns}
	A. flavus	1°	y = 21.555 – 711,4x	0,84	13,90**
		2°	y = 21.287 – 592,1x – 5,64x ²	0,85	0,03 ^{ns}
	F. verticillioides	1°	y = 20.920 + 118,3x	0,08	0,38 ^{ns}
		2°	y = 24.076 – 1.284,8x + 66,29x ²	0,92	4,14 ^{ns}
	Pennicilium sp.	1°	y = 22.878 – 915,2x	0,94	23,01**
		2°	y = 22.179 – 604,5x – 14,68x ²	0,95	0,20 ^{ns}

Teste F: ** e * = significativos a 1 e 5%, respectivamente, ns = não significativo a 5% de probabilidade. R² = coeficiente de determinação da equação ajustada; Y = teor de carboidratos totais do solo (mg g^{-1} solo seco); X = período de incubação (dias).

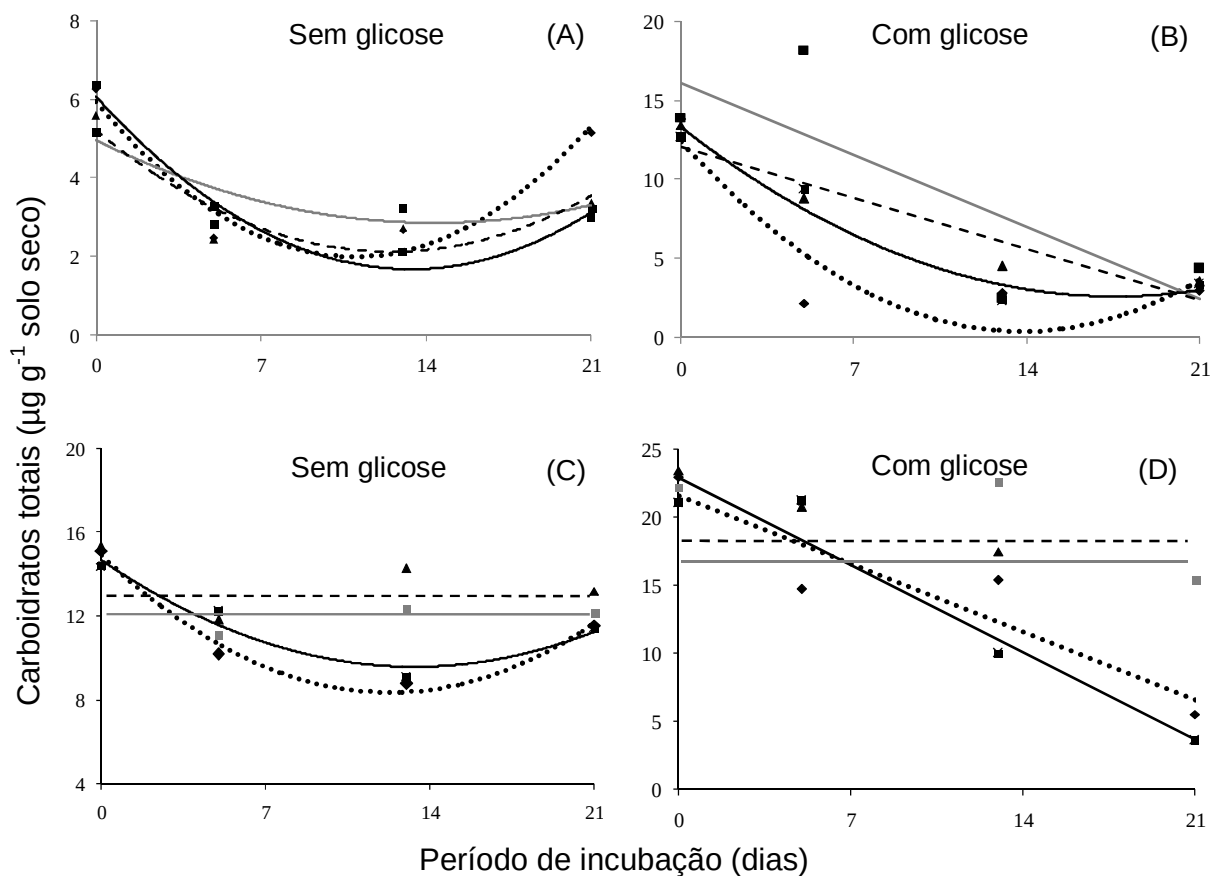


Figura 16. Carboidratos totais residuais no Latossolo Vermelho distrófico (A e B) e Latossolo Vermelho eutrófico (C e D), inoculados com *Aspergillus flavus* (···◆···), *Fusarium verticillioides* (- -▲- -), *Penicillium* sp. (—■—) e não inoculados (—□—).

Exceto no solo inoculado com *F. verticillioides*, nos demais solos, a atividade da desidrogenase aumentou em média de 1,5 a 1,8 vez ($p < 0,05$) nos solos com glicose em relação aos sem glicose. Verificou-se que a atividade da desidrogenase foi 1,7 a 2,0 vezes maior no solo LVEf em relação ao LVd (Figura 17).

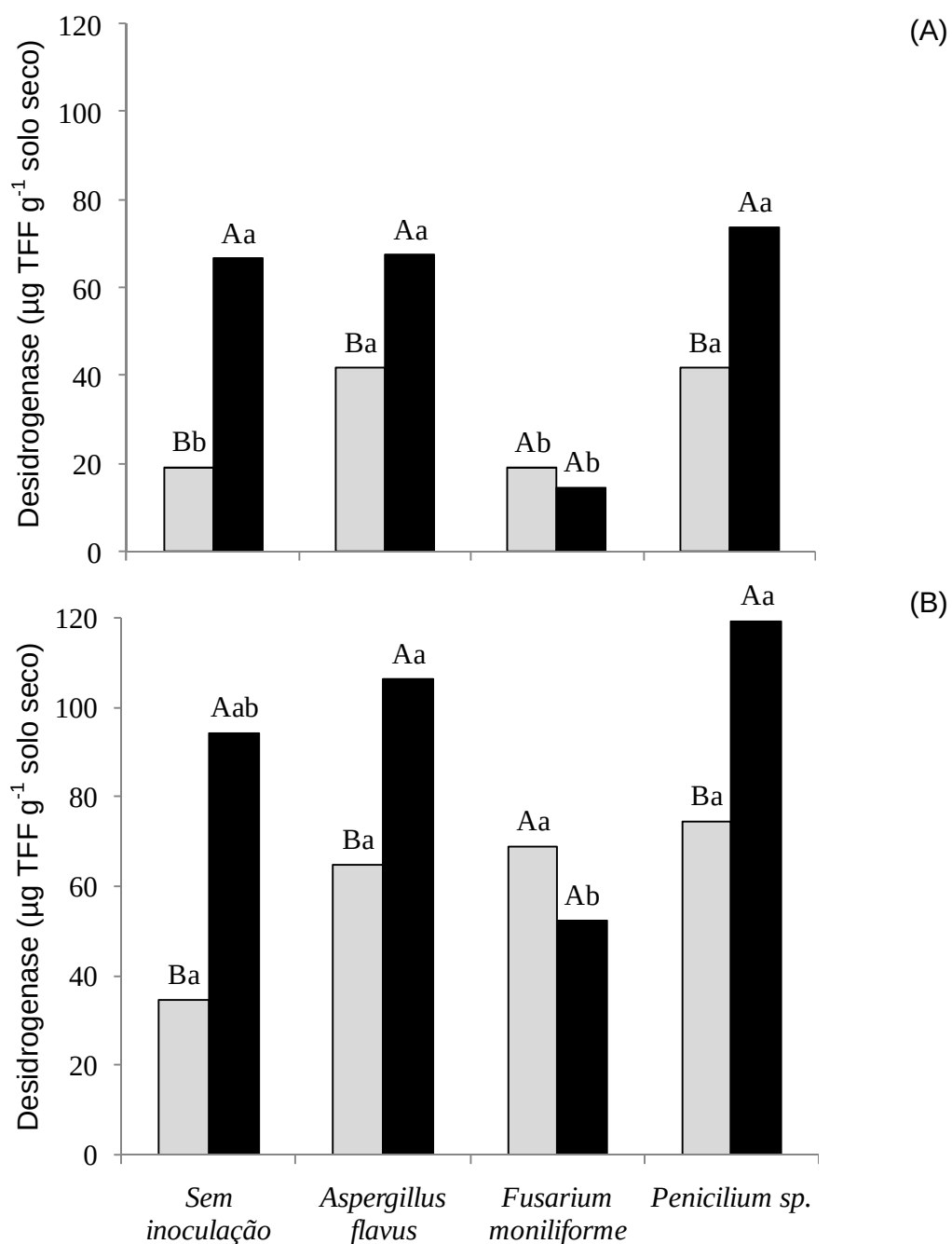


Figura 17. Atividade da desidrogenase observada no Latossolo Vermelho distrófico (A) e Latossolo Vermelho eutrófico (B), acrescido (■) e não acrescido (□) de glicose. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas (efeito com e sem glicose) e minúsculas (comparação de fungos), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

No solo LVd não adicionado de glicose e inoculado com *A. flavus* e *Penicillium sp.*, a atividade da desidrogenase foi maior do que nos outros solos. A desidrogenase é uma indicação do metabolismo oxidativo (BUZZINARO et al., 2009), de natureza intracelular e ligada às células viáveis. O aumento da atividade da desidrogenase foi relacionado ao crescimento da população microbiana do solo (RALTE et al., 2005; GRÉGGIO & NAHAS, 2007). Portanto, pode se depreender que a maior atividade da desidrogenase foi decorrente do crescimento dos microrganismos e principalmente dos fungos inoculados no solo. A atividade da enzima foi estimulada em todos os solos adicionados de glicose quando se comparou com o solo inoculado com *F. verticillioides*. Esse efeito foi constatado por CASIDA (1977) que verificou aumento da atividade no solo, adicionado por glicose quando comparado com o controle.

A mesma tendência foi observada com relação à atividade da amilase, verificando-se aumentos de 1,3 a 1,5 vez por efeito da adição de glicose no solo e de 1,3 a 1,4 vez quando se comparou o solo LVEf com o LVd, respectivamente. Porém, o estímulo da atividade da amilase devido à adição de glicose, não foi observado em todos os solos (Figura 18).

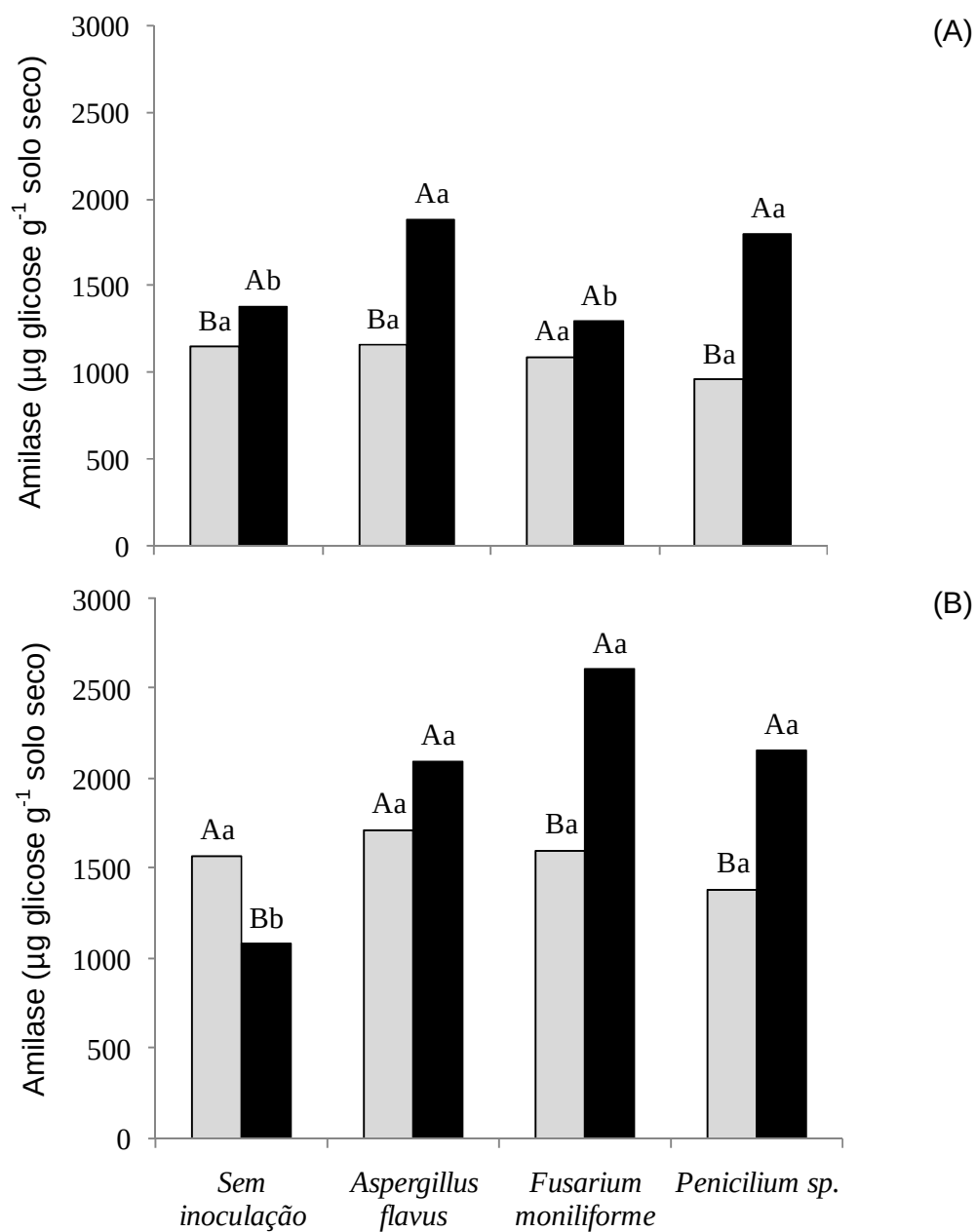


Figura 18. Atividade da amilase observada no Latossolo Vermelho distrófico (A) e Latossolo Vermelho eutroférico (B), acrescido (■) e não acrescido de glicose (□). Médias seguidas de mesma letra maiúsculas (efeito com e sem glicose) e minúsculas (comparação de fungos), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Não se constataram diferenças na atividade da amilase entre os solos sem glicose e inoculados com os não inoculados. Com adição de glicose, a atividade da amilase aumentou significativamente no solo LVd inoculado com *A. flavus* e *Penicillium* sp., em relação aos demais tratamentos e no solo LVef inoculado em comparação ao solo não inoculado. A presença de fungos amilolíticos no solo foi confirmada por SANOMYIA & NAHAS (2003). Os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium* sp., produziram amilase em diferentes meios de cultura (DOMINGUES & PERALTA, 1993; FIGUEIRA & HIROOKA, 2000). Na presença de glicose, a atividade da amilase do meio de cultura inoculado com *A. fumigatus* foi bastante estimulada quando comparada com o controle (DOMINGUES & PERALTA, 1993). Portanto, estes resultados explicam o efeito obtido neste trabalho de aumento da atividade da amilase no solo adicionado de glicose.

4.3 Características das plântulas

4.3.1 Altura dos coleóptilos

A altura dos coleóptilos de milho, no período de 21 dias do ensaio, não variou no solo Latossolo Vermelho distrófico (LVd) sem adição de glicose, porém, de modo diferente, foi crescente na presença de glicose, ajustando-se a uma equação de 1º grau (Figura 19A). Respostas diferentes foram obtidas no Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) tendo a altura dos coleóptilos diminuída durante o período de incubação conforme equações de 1º (com glicose) ou 2º grau (sem glicose) (Figura 19B).

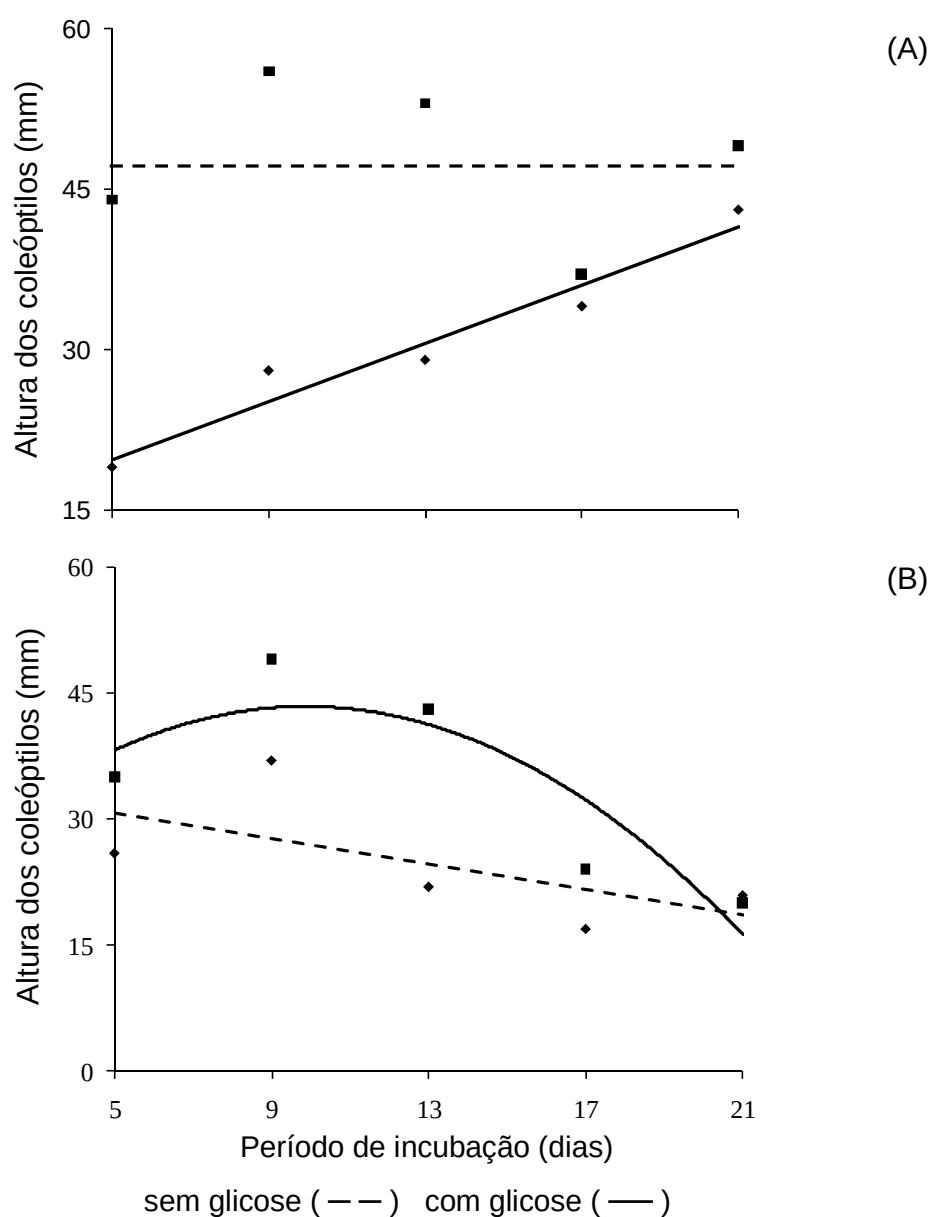


Figura 19. Altura dos coleóptilos de milho obtidos em solos com e sem adição de glicose.

Solo	Glicose	Teste F	R ²	Equação
LVd (A)	Sem	2,18 ^{ns}	-	y = 47,8
	Com	83,15**	0,94	y = 1,35x + 13,1
LVef (B)	Sem	32,59**	0,79	y = -0,2188x ² + 4,3125x + 22,1
	Com	15,24**	0,39	y = -0,75x + 34,4

Tendências opostas foram observadas na altura dos coleóptilos nos dois solos inoculados com os fungos: em geral, enquanto no solo LVef houve decréscimo, no LVd houve aumento da altura (Figura 20). Em ambos os solos não inoculados, o crescimento dos coleóptilos não foi afetado ($p>0,05$). No solo LVd inoculado com os fungos *F. verticillioides* e *Penicillium* sp., constatou-se estímulo do desenvolvimento dos coleóptilos durante todo o período de incubação e inibição por *A. flavus* (Figura 20A). Nos solos LVef, o desenvolvimento dos coleótilos foi inibido principalmente nos períodos finais do ensaio (Figura 20B). Provavelmente essa resposta decorreu da influência da glicose no crescimento dos fungos (BLAGODATSKAYA et al., 2009), causando inibição da altura dos coleóptilos.

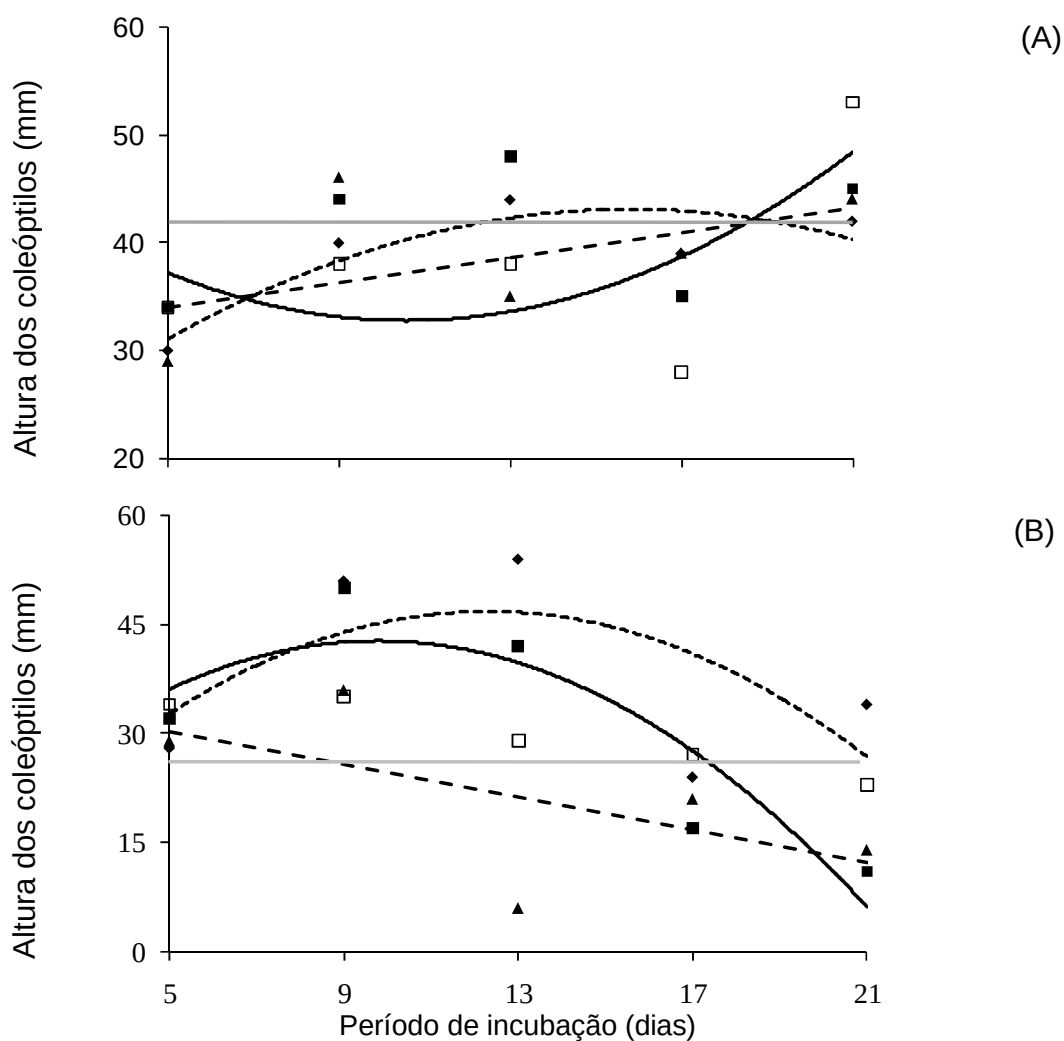


Figura 20. Altura dos coleóptilos de milho obtidos em solos inoculados com fungos e não inoculados.

Solo	Tratamento	Teste F	R ²	Equação
LVd (A)	<i>A. flavus</i> (···)	5,94**	0,78	$y = -0,1027x^2 + 3,2446x + 17,5$
	<i>F. verticillioides</i> (- - -)	8,32**	0,28	$y = 0,575x + 31,1$
	<i>Penicillium</i> sp. (—)	2,93 ^{ns}	-	$y = 41,2$
	Sem inoculação (—)	9,98**	0,44	$y = 0,1429x^2 - 3,0143x + 48,7$
LVef (B)	<i>A. flavus</i> (···)	20,46**	0,37	$y = -0,2634x^2 + 6,4732x + 7,0$
	<i>F. verticillioides</i> (- - -)	16,42**	0,36	$y = -1,125x + 35,8$
	<i>Penicillium</i> sp. (—)	23,67**	0,80	$y = -0,2902x^2 + 5,6696x + 15,0$
	Sem inoculação (—)	6,90 ^{ns}	-	$y = 29,6$

O tamanho dos coleóptilos foi 1,3 a 2,3 vezes menor nos solos adicionados com glicose e inoculados com os fungos em relação aos solos sem glicose (Tabela 8). O efeito mais restritivo ocorreu no solo inoculado com *Fusarium verticillioides*. Nos solos não inoculados, a altura dos coleóptilos foi semelhante, independentemente da adição de glicose.

Tabela 8. Efeito da inoculação de fungos e adição de glicose no desenvolvimento dos coleóptilos de milho no solo LVef.

Glicose	Controle	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	F ⁽¹⁾
Sem	28Ab	30Ab	44Aa	39Aa	11,61**
Com	32Aa	13Bc	33Ba	21Bb	17,95**
F ⁽¹⁾	1,62ns	30,28**	12,14**	32,17**	-

(1): ns = não significativo (5%), * e ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.3.2 Comprimento das raízes

Decréscimo no comprimento das raízes foi observado em ambos os solos não adicionados de glicose (Figura 21 A e B). Entretanto, enquanto no solo LVd adicionado de glicose, foi constatado aumento do tamanho das raízes, no LVef ocorreu diminuição.

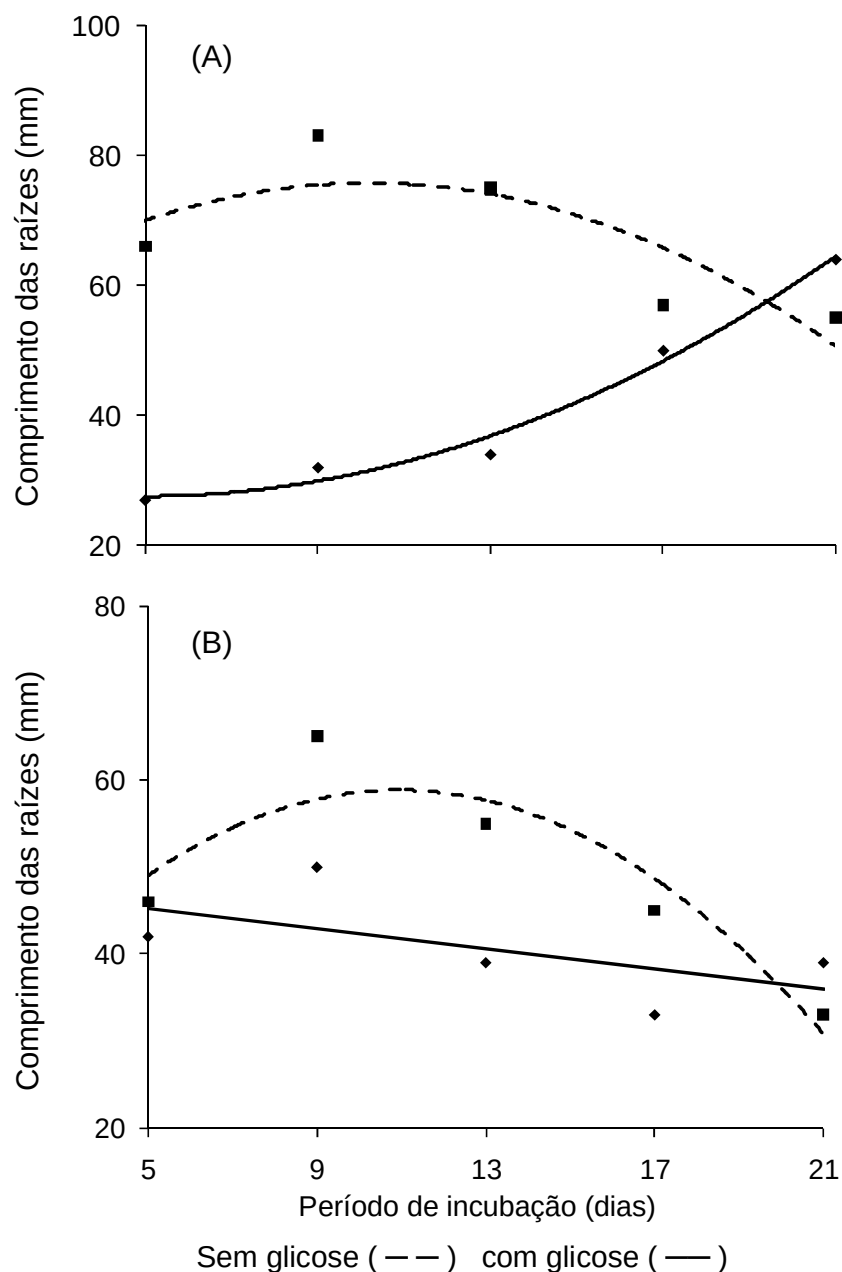


Figura 21. Crescimento das raízes de milho nos solos adicionados e não adicionados de glicose.

Solo	Glicose	Teste F	R ²	Equação
LVd (A)	Sem	11,68**	0,70	$y = -0,2143x^2 + 4,3714x + 53,4$
	Com	4,73*	0,98	$y = 0,1429x^2 - 1,4143x + 31,1$
LVef (B)	Sem	27,11**	0,85	$y = -0,2768x^2 + 6,0464x + 25,8$
	Com	5,42**	0,36	$y = -0,575x + 48,1$

Na Figura 22, os resultados entre fungos e dias de incubação evidenciaram dados não significativos para comprimento das raízes no solo sem inoculação e na presença do fungo *F. verticillioides* decrescente no desenvolvimento das raízes. Os fungos *A. flavus* e *Penicillium* sp., inibiram o desenvolvimento das raízes após os 13 dias de incubação. BACON et al. (1994) relataram, também, que *F. verticillioides* pode inibir o desenvolvimento das raízes de plântulas de milho. CARVALHO (1992) constatou redução na germinação de sementes de milho infectadas por *F. verticillioides*.

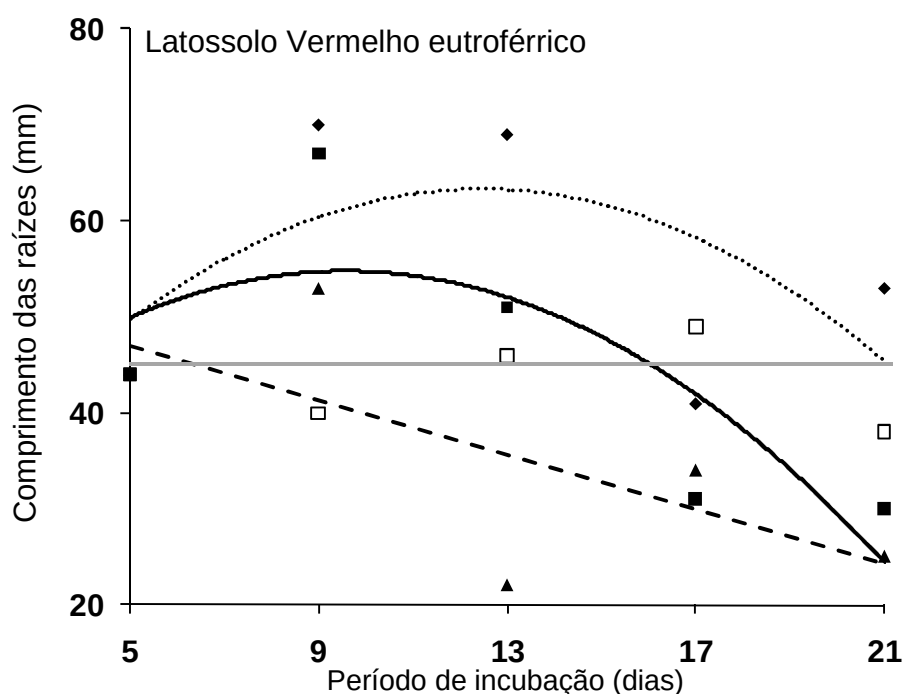


Figura 22. Crescimento das raízes de milho nos solos inoculados com fungos e não inoculados.

Solo	Tratamento	Teste F	R ²	Equação
LVef	<i>A. flavus</i> (···)	11,17**	0,31	$y = -0,2455x^2 + 6,1089x + 25,3$
	<i>F. verticillioides</i> (- - -)	16,95**	0,48	$y = -1,425x + 54,1$
	<i>Penicillium</i> sp. (—)	10,36**	0,44	$y = -1,6x + 65,4$
	Sem inoculação (—)	0,09 ^{ns}	-	$y = 43,4$

4.3.3 Massa de matéria seca

Na interação entre glicose e dias de incubação (Figura 23), os solos sem adição de glicose apresentaram dados não significativos para massa de matéria seca, enquanto os solos com adição de glicose demonstrou valores crescentes durante todo período de incubação.

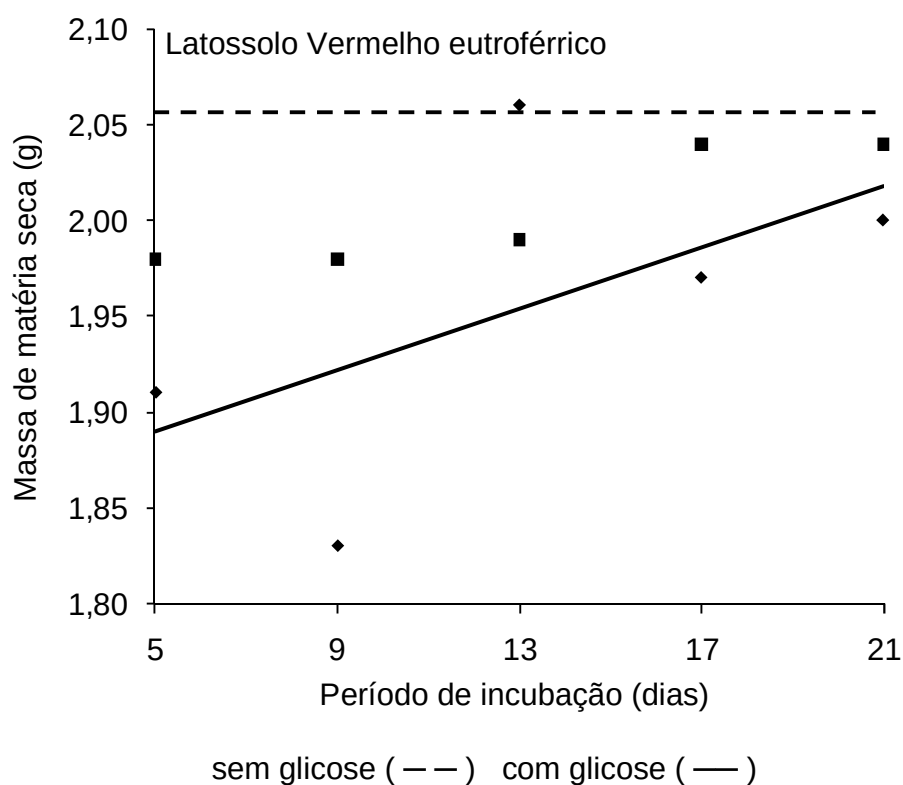


Figura 23. Matéria seca das plântulas de milho desenvolvidas em solos adicionados e não adicionados de glicose.

Solo	Glicose	Teste F	R ²	Equação
LVef	Sem	2,33 ^{ns}	-	y = 2,0
	Com	8,58**	0,33	y = 0,008x + 1,9

A inoculação do solo com *Fusarium verticillioides* acrescido de glicose proporcionou a menor massa de matéria seca das plântulas de milho que se desenvolveram no solo LVef (Tabela 9).

Tabela 9. Massa (g) de matéria seca de milho crescido no LVef, acrescido ou não de glicose e inoculado com fungos.

Glicose	Controle	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	F ⁽¹⁾
Sem	2,04Aa	2,03Aa	1,93Aa	2,04Aa	2,87ns
Com	2,04Aa	1,85Bb	1,97Aa	1,96Aab	6,05**
F ⁽¹⁾	0,01ns	16,01**	0,93ns	3,23ns	-

(1): ns = não significativo (5%), * e ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.4 Análise isoenzimática dos coleóptilos

A interação que ocorre entre plantas e microrganismos do solo é importante. O mecanismo pelo qual os fungos atuam no crescimento das plantas é algo ainda não entendido completamente, mas inclui de forma direta a habilidade de produzir alguns tipos de hormônios como AIA (ácido indolacético), giberelina, citocinina e etileno, bem como de alterar a concentração desses hormônios na planta que eles estão em contato (VINALE, 2008). Por outro lado, as plantas também liberam substâncias que podem estimular os microrganismos como mucilagens, exsudatos e lisados que contêm aminoácidos, proteínas, açúcares, carboidratos complexos, álcoois, vitaminas e hormônios (KLUEPFEL, 1993) e também produzir substâncias antimicrobianas, através de seu metabolismo secundário em resposta a estresses físicos, químicos e biológicos (como a presença de patógenos) (MAZARO et al., 2008). A interação entre esses fatores pode afetar os atributos fisiológicos e isoenzimáticos das plantas.

Observou-se que o número de bandas das isoenzimas dos solos não inoculados foram alteradas nos solos inoculados com os fungos. Algumas evidências podem ser constatadas: a) exceto no solo inoculado com *F. verticillioides*, o número de alterações das bandas no solo LVd não adicionado de glicose foi maior do que no com glicose (Tabela 10); b) exceto no solo inoculado com *Penicillium* sp., o número de alterações das bandas no solo LVef não adicionado de glicose foi menor do que com glicose (Tabela 11); c) o número total de alterações nos dois solos decresceu na seguinte ordem: *A. flavus* > *Penicillium* sp. > *F. verticillioides*; d) as alterações foram constatadas em todos os períodos de incubação dos fungos; e) o número total de alterações das isoenzimas decresceu na seguinte ordem: 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGD) > 6-fosfogluconato desidrogenase e isomerase fosfohexose (PHI/PGD) > malato desidrogenase e álcool desidrogenase (MDH/ADH) > fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGM) > fosfatase ácida (ACP). As alterações causadas por *A. flavus* seguiram a mesma seqüência geral. As causadas por *F. verticillioides*: desidrogenase e álcool desidrogenase (MDH/ADH) > 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGD) > 6-fosfogluconato desidrogenase e isomerase fosfohexose (PHI/PGD) > fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGM) > fosfatase ácida (ACP) e por *Penicillium* sp.: 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGD) > fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGM) > malato desidrogenase e álcool desidrogenase (MDH/ADH) > 6-fosfogluconato desidrogenase e isomerase fosfohexose (PHI/PGD) > fosfatase ácida (ACP).

Vários autores têm utilizado técnicas que mostram alterações nos padrões de isoenzimas de plantas em ensaios de genética (SALINAS et al., 1982) ou sob o efeito de fatores do ambiente (MALONE et al., 2007). Variações nas condições ambientais podem influenciar os genes das plantas alterando a expressão gênica e conseqüentemente, o padrão isoenzimático (RAMÍREZ et al., 1991).

SILVA et al. (2000) mostraram que sementes de milho infectadas com os fungos *A.flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* sp., tiveram alterações nos padrões

eletroforéticos das isoenzimas malato – desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato – oxalacetato – transaminase. Da mesma forma, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que como conseqüências do desenvolvimento desses fungos inoculados em diferentes solos, alteraram o padrão das isoenzimas malato desidrogenase e álcool desidrogenase (MDH/ADH), 6-fosfogluconato desidrogenase e isomerase fosfohexose (PHI/PGD), 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGD), fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGM) e fosfatase ácida (ACP) dos coleóptilos de sementes de milho. Enquanto a fosfatase ácida (ACP) foi a que menos apresentou alteração entre as isoenzimas estudadas, a isoenzimas 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase (IDH/PGD) foram as mais alteradas.

Tabela 10. Isoenzimas dos coleóptilos de milho obtidos após germinação das sementes no solo LVd inoculado com fungos e não inoculado.

Latossolo Vermelho distrófico (LVd)										
.....sem glicose.....						com glicose.....				
Período de incubação	MDH ADH	IDH PGM	IDH PGD	ACP	PHI PGD	MDH ADH	IDH PGM	IDH PGD	ACP	PHI PGD
SOLO SEM INOCULAÇÃO										
5	3	1	1	3	1	4	1	2	3	3
9	4	1	2	4	2	4	1	1	4	1
13	3	1	1	3	1	4	3	3	4	3
17	3	2	2	4	2	4	2	2	4	3
21	2	1	1	3	1	3	1	2	3	1
SOLO COM <i>Fusarium verticillioides</i>										
5	1	1	1	4	1	1	2	2	4	2
9	4	1	1	4	1	4	3	4	4	4
13	1	2	2	4	1	3	3	4	4	3
17	4	2	2	3	1	4	1	3	3	1
21	1	1	1	3	1	1	1	1	4	1
SOLO COM <i>Aspergillus flavus</i>										
5	4	2	3	4	2	4	4	4	4	4
9	2	1	1	4	1	2	3	3	4	3
13	4	2	2	4	2	4	3	4	4	3
17	3	3	1	4	1	3	2	2	4	1
21	4	1	2	4	2	4	1	2	4	2
SOLO COM <i>Penicillium</i> sp.										
5	2	2	2	4	1	3	3	3	4	3
9	4	2	1	4	2	4	3	2	4	4
13	2	1	1	4	2	2	3	2	4	3
17	4	4	1	4	1	4	4	1	4	2
21	3	1	1	4	2	3	1	1	4	2

Intensidade das bandas: (1) fraca, (2) média, (3) forte e (4) muito forte

MDH/ADH Malato desidrogenase e álcool desidrogenase

IDH/PGM – Fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase

ACP – Fosfatase ácida

IDH/PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase

PHI/PGD, 6-fosfogluconato desidrogenase e Isomerase fosfohexose

Resultados em amarelo significam mesmo padrão de bandas dos coleóptilos desenvolvidos no solo sem inoculação; resultados em branco significam padrão de bandas alterados.

Tabela 11. Isoenzimas dos coleóptilos de milho obtidos após germinação das sementes no solo LVef, inoculado com fungos e não inoculado.

Latossolo Vermelho eutroférico (LVef)										
.....sem glicose.....						com glicose.....				
Período de incubação	MDH ADH	IDH PGM	IDH PGD	ACP	PHI PGD	MDH ADH	IDH PGM	IDH PGD	ACP	PHI PGD
SOLO SEM INOCULAÇÃO										
5	4	1	1	4	2	4	1	2	4	3
9	4	1	2	4	2	4	1	3	4	2
13	4	2	2	3	2	4	3	3	4	3
17	3	3	2	4	3	4	2	2	4	3
21	3	2	3	3	2	3	2	3	3	2
SOLO COM <i>Fusarium verticillioides</i>										
5	1	1	2	4	1	1	1	1	4	1
9	4	1	1	4	2	4	3	4	4	4
13	2	2	4	4	2	1	1	1	1	1
17	4	3	4	4	2	4	3	4	3	4
21	1	1	1	4	2	1	3	3	4	2
SOLO COM <i>Aspergillus flavus</i>										
5	4	3	3	4	2	4	4	4	4	4
9	2	1	1	4	1	2	2	1	4	2
13	4	2	2	4	2	4	3	4	4	2
17	3	3	3	4	1	3	1	2	4	2
21	4	1	2	4	2	4	1	2	4	2
SOLO COM <i>Penicillium</i> sp.										
5	2	2	2	4	1	3	3	3	4	3
9	4	1	1	4	2	4	3	2	4	4
13	2	1	1	4	2	2	3	2	4	3
17	4	4	3	4	3	4	4	3	4	4
21	3	2	1	4	3	3	2	1	4	3

Intensidade das bandas: (1) fraca, (2) média, (3) forte e (4) muito forte

MDH/ADH Malato desidrogenase e álcool desidrogenase

IDH/PGM – Fosfoglucomutase e isocitrato desidrogenase

ACP – Fosfatase ácida

IDH/PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase

PHI/PGD, 6-fosfogluconato desidrogenase e Isomerase fosfohexose

Resultados em amarelo significam mesmo padrão de bandas dos coleóptilos desenvolvidos no solo sem inoculação; resultados em branco significam padrão de bandas alterados.

As alterações na expressão das enzimas verificadas neste trabalho estão coerentes com os resultados obtidos com as medidas fisiológicas das plantas, embora não tenha sido possível relacionar os diversos fatores estudados (tipo de solo, adição ou não de glicose) com os resultados das determinações da isoenzimas. Nos solos adicionados de glicose, a altura dos coleóptilos, o comprimento das raízes e a massa seca das plântulas de milho diminuíram no solo LVef ou foram inibidas no solo LVd. Igualmente, nos solos inoculados com os fungos, essas medidas foram diminuídas no solo LVef ou aumentaram no solo LVd não atingiram os valores obtidos nos solos não inoculados e estas respostas refletiram na avaliação das bandas das isoenzimas.

5. CONCLUSÕES

A adição de glicose no meio de cultura aumentou a velocidade de crescimento de *A. flavus* e *Penicillium* sp., mas não de *F. verticillioides*.

Os carboidratos totais foram reduzidos nos solos por efeito da inoculação dos fungos *A. flavus* e *Penicillium* sp. ou da adição de glicose.

A atividade da desidrogenase aumentou nos solos inoculados com *A. flavus* e *Penicillium* sp., e adicionados de glicose em relação ao controle.

Maior atividade da amilase foi observada no solo LVd com glicose e inoculado com *A. flavus* e *Penicillium* sp. em relação ao controle.

A altura dos coleóptilos, o comprimento das raízes e a massa seca das plântulas de milho obtidos nos solos adicionados de glicose e/ou inoculados com os fungos foram diminuídas.

A expressão genética das sementes de milho foi alterada devido à provável infecção com os fungos inoculados no solo.

6. REFERÊNCIAS

ADENIRAN, A. H.; ABIOSE, S. H. Amylolytic potentiality of fungi isolated from some Nigerian agricultural wastes. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.667–672m, 2009.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1988. 574p.

AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PADOVANNI, C. R.; SOUZA, N. L. Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. **Summa Phytopathol**, v.35, p.20–25, 2009.

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, p.373–380, 1989.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. APS Press, 1998.

BACON, C. W.; HINTON, D. M.; RICHARDSON, M. D. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, v.78, p.302–305. 1994.

BEYER, M.; RODING, S.; LUDEWING, A.; VERREET, J. A. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.92–97, 2004.

BLAGODATSKAYA E.; BLAGODATSKY S.; DORODNIKOV M.; KUZYAKOV, Y. Elevated atmospheric CO₂ increases microbial growth rates in soil: results of three CO₂ enrichment experiments. **Global Change Biology**, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 365 p. 1992.

BUZINARO, T. N.; BARBOSA, J. C.; NAHAS E. Atividade Microbiana do solo em pomar de laranja em resposta ao cultivo de adubos verdes. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.31, p.408–414, 2009.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p.447–459, 2002.

CARLILI, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London, Accademic. 486p, 1996.

CARVALHO, M. L. M. **Refrigeração e qualidade de sementes de milho armazenadas em pilhas com diferentes embalagens**. Piracicaba. 98f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1992.

CASIDA, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v.98, p.371–376, 1964.

CASIDA L E. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. **Applied and Environmental Microbiology** 34, p.630–636, 1977.

CHANDA, A.; ROZE, L. V.; PASTOR, A.; FRAME, M. K.; LINZ, J. E. Purification of a vesicle-vacuole fraction functionally linked to aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Microbiological Methods**, v.78, p.28–33, 2009.

COELHO, A. M.; CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Desafios para obtenção de altas produtividades**. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.20, 2004.

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

COUTO, L.; RESENDE, M. & ALBUQUERQUE, P. E. P. Importância do milho irrigado. In: RESENDE, M.; ALBUQUERQUE, P. E. P. & COUTO, L., eds. A cultura do milho irrigado. Brasília, **Embrapa Informação Tecnológica**, p.17–30, 2003.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. Cultivares de milho disponíveis no mercado de sementes brasileiro na safra 06/07. Disponível em: www.cnpqgl.embrapa.br/nova. Acesso em: 06 jan. 2010.

DAYNES, C. M.; MCGEE, P. A.; MIDGLEY, D. J. Utilisation of plant cell-wall polysaccharides and organic phosphorus substrates by isolates of *Aspergillus* and *Penicillium* isolated from soil. **Fungal Ecology**, v.1, p.94–98, 2008.

DOMINGUES, C. M.; PERALTA, R. M. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus* fresenius). **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.39, p.681–685, 1993.

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

FELIX, A. A. A. **Identificação e desenvolvimento de técnica alternativa de controle de fungos em sementes utilizadas no artesanato**. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.461–467, 2000.

GIORNI, P.; MAGAN, N.; BATTILANI, P. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p.213–218, 2009.

GRÉGGIO, T. C.; NAHAS, E. Atividade enzimática do solo sob dois fragmentos florestais. **Científica**, Jaboticabal, v.35, p.179–187, 2007.

GRODNITSKAYA, I. D.; SOROKIN, N. D. Evaluation of the state of soil microbial communities in two types of Siberian forest ecosystems. *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya*, v.34, p.676–681, 2007.

HE, J.; BOLAND, G. J.; ZHOU, T. Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1805–1817, 2009.

IBGE: Instituto de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 03 dez 2009.

JAHANGEER, S.; KHAN, N.; JAHANGEER, S.; SOHAIL, M.; SHAHZAD, S.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, v.37, p.739–748, 2005.

KLUEPFEL, D. A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.31, p.441–472, 1993.

LAUGHLIN, R. J.; STEVENS, R. J. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.1540–1548, 2002.

LIN, X. G.; YIN, R.; ZHANG, H. Y.; HUANG, J. F.; CHEN, R. R.; CAO, Z. H. Changes of soil microbiological properties caused by land use changing from rice-wheat rotation to vegetable cultivation. **Environ Geochem Health**, v.26, p.119–128, 2004.

LONGA, C. M. O. **Ocorrência, patogenicidade e controle alternativo de *Rhizoctonia solani* Kuhn em Boa-Noite (*Catharanthus roseus* G. Don.) pelo uso de *Trichoderma* spp. e composto orgânico**. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, M. A. S.; LETÍCIA NOEMI ARIAS, L. N.; MENEGHELLO, G. E.; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.77–85, 2007.

MANCINI, S. A.; ULRICH, A. C.; ELSNER, M.; LACRAMPE, C. G.; SLEEP, B.; EDWARDS, E.; SHERWOOD, L. B. Elucidating mechanisms of benzene biodegradation in subsurface environments using carbon and hydrogen isotope analysis. **Denver Annual Meeting** (November 7–10), nº74–9, 2004.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.1824–1829, 2008.

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

OLIVEIRA, I. P.; THUNG, M. D.; SOUZA, C. M. R.; SANTOS, R. S. M. Atividade da fosfatase ácida no feijoeiro e sua correlação com parâmetros de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, p.43–49, 1999.

OLSSON, G.; POTT, B. M.; LARSSON, L.; HOLST, O.; KARLSSON, H. T. Microbial desulfurization of coal by *Thiobacillus ferrooxidans* and thermophilic archaea. **Fuel Processing Technology**, v.40, p.277–282, 1994.

OMAR, S. A.; ABD-ALLA, M. H. Physiological aspects of fungi isolated from root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). **Microbiological Research**, v.154, p.339–347, 2000.

PANAGIOTOU, G.; PACHIDOU, F.; PETROUTSOS, D.; OLSSON, L.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fermentation characteristics of *Fusarium oxysporum* grown on acetate. **Bioresource Technology**, v.99, p.7397–7401, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHANG, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PERSSON H. The effect of fertilization and irrigation on the vegetation dynamics of a pine-heath ecosystem. **Plant Ecology**. v.46, p.181–192, 1980.

RALTE, V.; PANDEY, H. N.; BARIK, S. K.; TRIPATHI, R. S.; PRABHU, S. D. Changes in microbial biomass and activity in relation to shifting cultivation and horticultural practices in subtropical evergreen forest ecosystem of north-east India. **Acta Oecologica**, v.28, p.163–172, 2005.

RAMIREZ, H.; CALDERON, A.; ROCCA, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. p.825–856. In W. Rocca & L. Mroginski. Cultivo de tejidos en la agricultura. **Fundamentos y aplicaciones**. CIAT, Cali. 885p, 1991.

SALINAS, R. M.; CERDA, A. A.; FERNANDEZ, F. G. Efecto del boro sobre la composicion mineral de guisante y pimiento. **Anales de Edafologia y Agrobiologia**, v.41, p.991–1001, 1982.

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, p.835–842, 2003.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. **Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 17p.

SILVA, V. R.; REINERT, D. J.; REICHERT, J. M. Densidade do solo, atributos químicos e sistema radicular do milho afetados pelo pastejo e manejo do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.191–199, 2000.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. New York, John Wiley & Sons, 1986. 379p.

TRINCI, A. P. J. A kinetic study of the mode of growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. **Journal of General Microbiology** 57, 1–24, 1969.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Microbial counts of dark red latosol samples stored at different temperatures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.159–163, 1998.

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

WAKELINA, S. A.; WARRENB, R. A.; KONGC, L.; HARVEYB, P. R. Management factors affecting size and structure of soil *Fusarium* communities under irrigated maize in Australia. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.201–209, 2008.