



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

PATRÍCIA BOMBONATI CHALITA

DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
ISOLADAS DE RAÍZES DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K)  
EM TRÊS MUNICÍPIOS DE RORAIMA

Boa Vista, RR

2016

PATRÍCIA BOMBONATI CHALITA

DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
ISOLADAS DE RAÍZES DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K)  
EM TRÊS MUNICÍPIOS DE RORAIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração, Bioprospecção.

Orientadora: Profa. Dra. Krisle da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital

Boa Vista, RR

2016



## **Dedicação**

A minha amada avó Olga Barreto Bombonati, in memória, e minha mãe Célia Maria Bombonati, pelo exemplo de luta, de dedicação, de honestidade, de humildade, pela paciência, incentivo, carinho, amor e por sempre acreditar em mim nos momentos em que até eu duvidei.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, por me conceder força, sabedoria, saúde, paz e momentos de alegria, pela família e por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

A minha família, Ligia, Rogério e Sophia por acreditarem em mim na realização desse sonho e em especial a minha mãe, Célia Maria Bombonati, pela força, pela companhia nos fins de semanas e até altas horas no laboratório e por sempre acreditar em mim.

A minha orientadora, Dra. Krisle da Silva, pela confiança depositada a mim na elaboração desse trabalho, pela orientação, colaboração, puxões de orelha e sugestões muito oportunas de extrema sabedoria e pelo exemplo de competência. Sou grata pela oportunidade de ter sido sua orientada. Obrigada.

À Universidade Federal de Roraima e ao Programa de Pós-Graduação de Recursos Naturais pela concepção do curso.

A todos os professores do curso, pelos ensinamentos transmitidos.

À CAPES, pela bolsa de estudos, que me permitiu o privilégio de dedicar-me integralmente à pesquisa que agora concluo e marca o início de uma nova etapa em minha vida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por toda logística disponibilizada para realização dos trabalhos, incluindo todos os funcionários, que são peças-chave para o nosso desempenho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa, Brenda, Dilacy, Josimar e Keila pelas brincadeiras, auxílio e convivência durante esses anos, em especial para a técnica em laboratório, Eliane do Nascimento Cunha Farias, pela grande ajuda nas análises, conselhos e vários puxões de orelhas quando necessário e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas de turma e amigos em especial Ângela, Gabrielle, Margarita e Maryory que dividiram todos os momentos, alegres, angustiantes, cansativos, por tudo que juntas vivemos, passamos e que ficarão gravados para sempre em minha memória e pela eterna amizade.

A todos que embora não citados, que contribuíram de alguma forma, para o sucesso desse trabalho.

Muito obrigada!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), Lecythidaceae, é uma espécie nativa de potencial interesse para sistemas agroflorestais (SAF's) na Amazônia. Uma das dificuldades da propagação da castanheira é seu processo germinativo desuniforme, que constitui um problema no estabelecimento de mudas para cultivos. Pouco se sabe sobre os micro-organismos benéficos associados às raízes de castanheira-do-Brasil, sendo que o uso de micro-organismos promotores do crescimento vegetal pode ser uma biotecnologia positiva para a produção de mudas de qualidade. O objetivo desse trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil cultivadas e nativas e avaliar a presença de características para promoção do crescimento vegetal. Foram isoladas 303 bactérias de raízes de castanheiras em Roraima, sendo 81 oriundas da área de monocultivo de castanheira, 154 de SAF e 68 de área de floresta nativa. As bactérias foram isoladas utilizando meios semissólidos NFB, LGI, JMV e DYG'S. A caracterização fenotípica dos isolados foi avaliada através das análises de proteína totais por SDS-PAGE, solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido, solubilização de fosfato de alumínio em meio líquido e produção de ácido indol acético. Baseado nos perfis de proteínas (SDS-PAGE) foi estimado o índice de diversidade de Shannon e análise de rarefação. A caracterização genotípica foi realizada através da avaliação da presença ou ausência do gene *nifH* e pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA. Das 303 bactérias foram obtidas o perfil proteico de 290. Através da análise dos perfis proteicos foram gerados quatro dendrogramas referentes a cada meio de isolamento, JMV, LGI, DYG'S e NFB. A partir desses dendrogramas, foi realizada uma seleção de bactérias a partir de grupos formados a 80% de similaridade em cada meio de isolamento, sendo selecionadas 100 bactérias. Na avaliação da diversidade em cada ambiente, os índices de diversidade foram similares para as três localidades de onde foram isoladas as bactérias. Das 100 bactérias avaliadas quanto a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido, observou-se que 69% apresentaram esta característica e 90% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de alumínio em meio líquido. Setenta bactérias sintetizaram ácido indol acético, onde 44 sintetizaram em meio sem triptofano, 61 em meio com triptofano e 35 apresentaram nos dois meios. Das 100 bactérias submetidas à amplificação da região do gene *nifH* apenas 18 apresentaram bandas específica de amplificação correspondente do gene *nifH*, sendo oito isoladas em meio semisseletivo para *Azospirillum* sp. (NFB e LGI), e 10 isoladas de meio não seletivo (DYG'S). Entre as bactérias avaliadas, 24 se destacaram para futuros testes de inoculação na produção de mudas, por apresentarem no mínimo duas ou mais características de promoção do crescimento vegetal. Através da análise do gene 16S rRNA, as sequências de nucleotídeos obtidas resultaram na distribuição das bactérias em 18 gêneros distintos. Foram detectadas sequências de gêneros pertencentes às classes  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria. Estes resultados indicam uma elevada diversidade de gêneros de bactérias endofíticas promotoras do crescimento presentes em raízes de castanheira-do-Brasil. Trata-se do primeiro trabalho de caracterização de bactérias endofíticas promotoras de crescimento em raízes de castanheira-do-Brasil.

Palavras chaves: Fixação biológica de nitrogênio. Solubilização de fosfatos. Ácido indol acético. *nifH*. 16S rRNA.

## ABSTRACT

The Brazilian nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K), Lecythidaceae, is a native species of potential interest for agroforestry systems (SAF's) in the Amazon. One of the difficulties in spread Brazilian nut is its unregular germination process, which is a problem in the establishment of seedling for crops. Little is known about the beneficial microorganisms associated with the roots of Brazilian nut tree, and the use of plant growth promoting microorganisms can be a positive biotechnology for the seedlings quality production. Therefore, this study aimed to characterize phenotypic and genotypically bacteria isolated from roots of the Brazil nut tree cultivated and native and evaluate the presence of features able to promote the plant growth. A total of 303 bacteria were isolated from roots of Brazilian nut tree, of these 81 are from a monoculture of nuts, 154 from a SAF and 68 from a native rainforest. The bacteria were isolated by using semisolid media NFB, LGI, JMV and DYG'S. The phenotypic characterization of bacteria was assessed by analysis of total protein by SDS-PAGE, solubilization of calcium phosphate in solid medium, solubilization of aluminium fosfate in liquid medium and production of indoleacetic acid. Based on protein profiles (SDS-PAGE) was estimated the Shannon diversity index and rarefaction analysis. The genotypic characterization was performed through presence or absence of the *nifH* gene and by partial sequencing of 16S rRNA gene. The protein profiles were obtained of 290 bacteria. Through the analysis of protein profiles were generated four dendrograms for each medium of isolation, JMV, LGI, DYG'S and NFB. From these dendrograms, it was realized the selection of bacteria groups formed at 80% similarity in each medium of isolation, being selected 100 bacteria. The Shannon diversity index was similar for the three areas where the bacteria were isolated. Of the 100 bacteria evaluated for calcium phosphate solubilizing capacity, it was observed that 69% presented this feature and 90% of bacteria were able to solubilize aluminum phosphate in liquid medium. A total of 70 bacteria synthesized indole acetic acid, 44 in medium with the absence of tryptophan, 61 with tryptophan and 35 presented in medium with or without tryptophan. Only 18 bacteria presented positive amplification for the *nifH* gene, of these eight were isolated in semi selective media for *Azospirillum* sp. (NFB and LGI), and 10 isolated from non-selective medium (DYG'S). Among the evaluated bacteria, 24 have potencial for future tests of inoculation in the seedlings production. These bacteria presented at least two or more characteristics of plant growth promotion. Through the partial sequencing of 16S rRNA gene, the obtained nucleotide sequences resulted in distribution of the bacteria in 18 different genera. It was detected sequences of genera belong to  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacilli and Actinobacteria class. These results indicate a high diversity of genera of endophytic growth-promoting bacteria present in the roots of Brazilian nut tree. This is the first work of characterization of endophytic growth-promoting bacteria in roots of Brazilian nut tree.

Key words: Biological fixation of nitrogen. Solubilization of phosphates. Índole acetic acid. *nifH*. 16S rRNA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das áreas de coletas de raízes de castanheira-do-Brasil no estado de Roraima.....	31
Figura 2 - Índice de diversidade Shannon (H) de bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima. ....	43
Figura 3 - Curva de rarefação para bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima OTUs (unidades taxonômicas operacionais).....	43
Figura 4 - Halo de solubilização de CaHPO <sub>4</sub> em meio NBRIP modificado; A) isolado ERR 719 oriundo do sistema SAF; B) estirpes tipo e de referência BR 11001 <sup>T</sup> ( <i>A. brasilense</i> ), BR11340 ( <i>Burkholderia</i> sp.), BR11790 <sup>T</sup> ( <i>Herbaspirillum frisingense</i> ) e BR11175 <sup>T</sup> ( <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ). ....	46
Figura 5 - Variação de pH em função da solubilização de fosfato de alumínio por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e de referência. ....	48
Figura 6 - Produtos de amplificação da região do gene <i>nifH</i> de bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil. ....	53
Figura 7 - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 856 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação $\alpha$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. ....	61
Figura 8 - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 739 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação $\beta$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. ....	62
Figura 9 - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 592 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação $\gamma$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. ....	63
Figura 10 - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 564 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação Bacilli e Actinobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos	

ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações,  
sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. .... 64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química e granulométrica do solo no Campo experimental Confiança (Município do Cantá) dentro de um plantio consorciado em sistema agroflorestal (SAF) com 19 anos de implantação.....	31
Tabela 2 - Análise química e granulométrica do solo no Campo experimental Serra da Prata (Município de Mucajaí) onde há um plantio de monocultivo de castanheiras com seis anos de idade .....	32
Tabela 3 - Análise química e granulométrica do solo em áreas de floresta nativa pertencentes ao projeto Kamukai no município de São João da Baliza .....	32
Tabela 4 - Número bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil por sistema de cultivo e meio utilizados para o isolamento. ....	33
Tabela 5 - Meio de isolamento, número de grupos de perfis proteicos formados, origem e total de isolados de bactérias obtidas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima.....	40
Tabela 6 - Bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima selecionadas através do perfil proteicos para caracterização.....	41
Tabela 7 - Índice de solubilização (I.S) de fosfato de cálcio das bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e referência. ....	45
Tabela 8 - Solubilização de fosfato de alumínio em meio NBRIP líquido por bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e de referência. ....	49
Tabela 9 - Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYG'S com a presença de triptofano (100 mg L <sup>-1</sup> ). ....	50
Tabela 10 - Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYG'S sem a presença de triptofano (100 mg L <sup>-1</sup> ). ....	51
Tabela 11 - Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYGs com e sem triptofano. ...	51
Tabela 12 - Bactérias que apresentaram bandas específicas de amplificação pelos iniciadores 19F e 407R correspondente do gene <i>nifH</i> e seus respectivos meios de isolamento. ....	54
Tabela 13 - Bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil com maior potencial para a promoção do crescimento vegetal.....	55

Tabela 14 - Diversidade de gêneros encontrados por área de isolamento das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil. ....	66
Tabela 15 - Diversidade de gêneros encontrados pelo tipo de meio de isolamento em raízes de castanheira-do-Brasil .....	66
Tabela 16 - Diversidade de gêneros das bactérias que melhor se destacaram com maior potencial para o desenvolvimento vegetal.....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K. ....	17
1.2	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal .....	20
1.3	Bactérias Diazotróficas Associativas .....	23
1.4	Caracterização Fenotípica .....	26
1.5	Caracterização Genotípica .....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	Origem das Bactérias .....	30
3.2	Coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Roraima.....	34
3.3	Análises de Proteínas Totais por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	34
3.4	Características de Promoção do Crescimento .....	35
<b>3.4.1</b>	<b>Solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio em meio sólido</b> .....	35
<b>3.4.2</b>	<b>Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio em meio líquido</b> .....	36
<b>3.4.3</b>	<b>Produção de ácido indol acético</b> .....	37
<b>3.4.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	38
3.5	Caracterização Genotípica .....	38
<b>3.5.1</b>	<b>Extração de DNA genômico</b> .....	38
<b>3.5.2</b>	<b>Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA</b> .....	38
<b>3.5.3</b>	<b>Amplificação do gene <i>nifH</i></b> .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1	Análises de Proteínas Totais por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
4.2	Solubilização de Fosfatos de Cálcio e de Alumínio .....	44
<b>4.2.1</b>	<b>Solubilização em meio sólido</b> .....	44
<b>4.2.2</b>	<b>Solubilização em meio líquido</b> .....	47
4.3	Produção de Ácido Indol Acético .....	50
4.4	Amplificação do Gene <i>nifH</i> .....	53
4.5	Bactérias com Potencial em Promover o Crescimento Vegetal.....	54
4.6	Sequenciamento Parcial do Gene 16S rRNA.....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>APÊNDICES</b> .....	81
<b>ANEXOS</b> .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de insumos biológicos em substituição aos insumos químicos tem sido cada vez mais frequente na agricultura. Desse modo é cada vez mais comum o uso de inoculantes contendo bactérias que promovam o crescimento e incrementem a produtividade de plantas, devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e à uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Os micro-organismos são os seres vivos mais primitivos do planeta e ao longo do processo evolucionário adquiriram características e adaptabilidades para coexistências com outros seres vivos, estabelecendo relações diversas em forma e função. Dentre as relações biológicas existentes, destacam-se as interações entre plantas e micro-organismos. Estas relações podem ser positivas, negativas ou neutras. Entre as relações positivas, cabe ressaltar as bactérias promotoras do crescimento vegetal. Os principais mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal são a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, produção de compostos antifúngicos e indução de resistência sistêmica (GALVÃO et al., 2010).

Os micro-organismos que fixam nitrogênio (denominado diazotróficos) podem fazê-lo em três circunstâncias: independentemente de outros organismos, no solo ou na água, são classificados como diazotróficos de vida livre; em associação com plantas, na rizosfera ou dentro das plantas, são os diazotróficos associativos; ou em estreita simbiose, como por exemplo entre rizóbios e plantas leguminosas (DÖBEREINER, 1992). Dentre as bactérias promotoras de crescimento estão às bactérias diazotróficas endofíticas, que podem estimular o crescimento das plantas e induzir a resistência a doenças, além de promoverem a FBN. A FBN é um processo realizado por procariotos, que possuem a enzima nitrogenase capaz de quebrar a tripla ligação do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) convertendo-o em amônio que poderá ser utilizada pela planta e outros organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estima-se que a FBN contribua com a maior parte do N fixado anualmente, cerca de 175 milhões de toneladas, ou seja, 70% do total, tornando o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A sua exploração na produção agrícola representa cerca de 30% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento das culturas. Desta forma, esse processo contribui para o aumento da produção vegetal, recuperação de áreas degradadas, incremento de fertilidade e da matéria orgânica do solo (GALLOWAY et al., 2003).

*Bertholletia excelsa* H.B.K. é a única espécie do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae, conhecida popularmente como castanheira-do-Brasil. É uma planta encontrada no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana, sendo as formações de florestas mais densas encontradas no Brasil (LORENZI, 2002). A castanheira-do-Brasil é o principal produto do extrativismo e de exportação do bioma amazônico, e tem uma grande importância para os povos da região, além de contribuir para a preservação das florestas, tendo seus frutos elevado valor econômico, tanto numa escala local, quanto regional e nacional (AMARAL; BELENTANI; OLIVEIRA, 2013; LOCATELLI et al., 2005).

Desta forma, estudos com espécies arbóreas de importância econômica e social, como a castanheira-do-Brasil, devem ser estimulados. Qualquer tecnologia de exploração eficiente desta cultura pode representar maiores ganhos em produtividade. Pouco se sabe sobre os micro-organismos benéficos associados às raízes de castanheira-do-Brasil. O que se sabe é que a família Lecythidaceae, na qual a castanha faz parte, apresenta ausência de micorrização em várias espécies (MOREIRA; OLIVEIRA; BECKER, 1997), mas há um relato quanto o isolamento de um fungo micorrízico da espécie *Gigaspora* sp. obtido a partir de castanheira-do-Brasil (CHU; KATO, 1992) e recentemente, em Roraima, foram isoladas bactérias presentes em raízes de castanheira-do-Brasil em áreas nativas e cultivadas (COSTA et al., 2014b) e também foram isolados fungos endofíticos do tipo “Dark Septate” (COSTA et al., 2014a). Entretanto, são necessários estudos de caracterização morfológica, genética e funcional destes micro-organismos para que se possa utilizar um ou vários representantes desses grupos de micro-organismos como promotores de crescimento vegetal substituindo a aplicação de fertilizantes químicos em busca de uma agricultura sustentável.

A exploração comercial da castanheira-do-Brasil constitui-se em atividade principalmente extrativista. A intensificação das atividades socioeconômicas, aliada às práticas inadequadas de manejo dos recursos florestais e ao desflorestamento resultante da extração intensa dos recursos madeireiros e das mudanças no uso da terra, para cultivos anuais e pastagens, tem exercido a redução do número de exemplares das espécies nativas, tornando-se necessário à introdução de castanhais cultivados. Uma das maiores dificuldades na propagação da castanheira é o seu lento processo germinativo, ocorrendo normalmente de 12 a 18 meses, contornado, em parte, pela remoção do tegumento lenhoso possibilitando uma germinação de 70% mais rápido após a semeadura em cultivo, porém desuniforme (MÜLLER et al., 1995). Neste contexto, a obtenção e a caracterização de bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal, é de extrema importância para a produção de inoculantes biológicos o que facilitara a produção de mudas para os cultivos e reflorestamentos de *B. excelsa*.



Neste contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar fenotípica e genotípicamente as bactérias endofíticas isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em áreas cultivadas e nativas, bem como avaliar a presença de características desejáveis para promoção do crescimento vegetal.

Este estudo faz parte do projeto financiado pela Embrapa “Pré-melhoramento, ecofisiologia e desenvolvimento de tecnologias para a implantação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em cultivo na Amazônia”. Sendo este um estudo inicial e pioneiro no isolamento e de caracterização morfológica e molecular de bactérias endofíticas diazotróficas e/ou promotoras do crescimento vegetal a partir de raízes de castanheira-do-Brasil. Este servirá de base para estudos futuros de inoculação destas bactérias visando uniformizar o processo de germinação das sementes de castanheira-do-Brasil e a qualidade na produção de mudas.

### 1.1 *Bertholletia excelsa* H.B.K.

A *Bertholletia excelsa*, conhecida como castanheira-do-Brasil, é a única representante do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae com ocorrência em todo o território Amazônico. É uma árvore que pode chegar a 50 m de altura, 2 m de diâmetro a altura do peito e viver 500 anos aproximadamente (FERNANDES, 2007). Seu fruto, conhecido popularmente como ouriço, é um pixídio lenhoso e redondo (diâmetro, 11-15 cm) podendo pesar de 0,5 a 2,5 kg. O ouriço alberga uma média de 10-25 sementes comestíveis, que têm forma angular e estão recobertas de tegumento lenhoso protetor. A castanheira pode formar aglomerações (castanhais) com densidade entre 15-20 indivíduos por hectare (MORI; PRANCE, 1990).

A espécie ocorre nos estados de Roraima, Rondônia, Acre, Amazonas, Pará e na parte norte dos estados de Goiás e Mato Grosso. Habita matas de terra firme, quase sempre em locais de difícil acesso com dispersão natural abrangendo 5° de latitude norte a 14° de latitude sul, onde também se encontram a Venezuela, a Colômbia, o Peru, a Bolívia e as Guianas. No entanto, as formações mais densas ocorrem no Brasil (LORENZI, 2002).

A castanheira desenvolve-se bem em regiões de clima quente e úmido, sendo que as maiores densidades ocorrem em regiões onde predominam os tipos climáticos tropicais chuvosos com a ocorrência de períodos de estiagem definidos. As populações de castanheiras estão situadas em solos argilosos ou argilo-arenosos de textura média a pesada (MÜLLER et al., 1995). Trata-se de uma espécie que se estabelece melhor em locais mais secos, sendo característica de mata de terra firme não inundável (ARAÚJO; OSAQUI; MELO, 2001). No

leste da Amazônia, ocorrem em oxissolos e ultissolos, pobres em nutrientes, porém bem estruturados e drenados, não sendo encontrada em solos excessivamente compactados (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 2000).

A castanheira é a única espécie da família Lecythidaceae com frutos funcionalmente indeiscentes, ou seja, eles não se abrem para liberar as sementes, as quais amadurecem dentro do próprio ouriço (MORI; PRANCE, 1990). A dispersão de fruto é gravitacional, destacando-se a capacidade dos frutos pesados de cair no chão sem quebrar-se a estrutura lenhosa (ZUIDEMA; BOOT, 2002). Na região amazônica, o início do período de chuvas marca o começo do desprendimento de frutos que se prolonga por mais de um semestre, com um pico de quedas que varia entre três a quatro meses. O desprendimento do ouriço é mais frequente depois de fortes chuvas (MORI; PRANCE, 1990).

A grande maioria das espécies florestais serve como fonte de alimento para os animais, estabelecendo, muitas vezes, uma relação de interdependência entre fauna e flora: as plantas são favorecidas pela dispersão e regeneração, e os animais utilizam os frutos e ou sementes produzidas pelas plantas para se alimentarem. Com a castanheira-do-Brasil não é diferente, seu fruto serve de alimento para vários animais que, por sua vez, fazem a dispersão das sementes. A cutia (*Dasyprocta* spp) é o principal dispersor da castanheira-do-Brasil (CYMERYYS et al., 2005). O comportamento destes roedores de armazenar e enterrar as sementes em outro lugar após ficar saciadas é o principal mecanismo de dispersão de sementes da castanheira quando estas não são mais encontradas ou são esquecidas por estes roedores (ZUIDEMA; BOOT, 2002).

A castanheira é uma das espécies mais importantes da Amazônia, uma das mais exploradas pelas comunidades extrativistas e de grande importância econômica para numerosas populações rurais do Brasil (IBGE, 2008), ocupando, desde 1911, lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da Floresta Amazônica. É de uso múltiplo, já que produz dois produtos de grande importância na Região Norte do País: a madeira e a amêndoa, sendo um dos principais produtos de exportação da região. A castanheira-do-Brasil pode ser aplicada de várias maneiras e suas utilizações vão além do uso como alimento, que é ingerido *in natura* ou industrializado. O ouriço pode ser usado como combustível e também na confecção de objetos, mas o maior valor é a amêndoa, alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas podendo ser consumida ou usada para extração de óleo. Do resíduo da extração do óleo, obtém-se a torta ou farelo usado como misturas em farinhas ou rações que é de grande valor na culinária regional. Sua madeira é de ótima qualidade para construção civil e naval, bem como para esteios e obras externas. A madeira é moderadamente pesada, macia ao corte, textura média, grã direita,

superfície sem brilho e lisa ao tato, de boa resistência ao ataque de organismos xilófagos. Pode também ser considerada como boa fonte de celulose. A exploração de exemplares nativos é proibida por lei segundo decreto 1.282, de 19/10/1994, revogado pelo Decreto nº 5.975, de 2006 (BRASIL, 2006), mas o que não impede seu plantio com a finalidade de reflorestamento tanto em plantios puros quanto em sistemas consorciados (LOCATELLI et al., 2005).

As amêndoas da castanheira possuem um alto valor calórico e proteico, além de conter selênio que combate os radicais livres. A extração do fruto é quase que exclusivamente em áreas nativas (CLAY, 1997). A coleta das sementes pode representar até 93% de remoção dos frutos nos castanhais explorados (ZUIDEMA; BOOT, 2002). A comercialização da castanha é feita mundialmente, sendo o Brasil responsável por 40% da exportação do produto que é coletado por extrativistas, em áreas naturais de floresta e é uma fonte de renda para as famílias da região (SOUZA; LORENZI, 2005).

Uma das maiores dificuldades na propagação da castanheira é o processo germinativo desuniforme. São indicados três processos diferentes para a de formação de mudas de castanheira: sementeira de sementes com tegumento; sementeira de sementes com tegumento escarificado (esmerilhado) e sementeira de sementes sem tegumento (LOCATELLI et al., 2005). O processo mais eficiente é o da sementeira de sementes sem tegumento, o qual requer um trabalho mais cuidadoso na retirada de tegumento, mas que possibilita uma germinação de 70% com apenas três meses de sementeira (MÜLLER et al., 1995). Na propagação de *B. excelsa* utiliza-se basicamente a sementeira da amêndoa (desprovida do tegumento lenhoso) em substrato de areia, com posterior repicagem das plântulas para embalagens plásticas, antes da abertura das folhas primárias (MÜLLER, 1982).

Os plantios de castanheira são relativamente jovens, tendo sido iniciados na década de 80, e por ser uma espécie de produção tardia, normalmente dez anos após o plantio, continuam sendo alvo de estudos para definição de sistemas de produção. Desta forma, a castanheira-do-Brasil é produzida, predominantemente, em sistemas de base extrativista, existindo um número reduzido de castanhais de cultivo localizados nos estados do Para, Acre, Rondônia, Amazonas, Amapá, Mato Grosso e Roraima (AMARAL; BELENTANI; OLIVEIRA, 2013).

Devido sua importância para a região norte do Brasil, há a necessidade de estudos com a castanheira-do-Brasil visando a melhoria da produção de mudas. Assim, o uso de micro-organismos promotores do crescimento vegetal pode ser uma alternativa para a produção de mudas de castanheira. Entretanto, esses tipos de trabalho ainda são escassos. Na literatura, foi encontrado apenas um relato de um fungo micorrízico isolado de castanheira-do-Brasil (CHU; KATO, 1992). Nesse trabalho é apenas citado o isolamento do fungo *Gigaspora* sp. em

castanheira-do-Brasil, não havendo relatos do seu uso na produção de mudas. Recentemente, em Roraima, utilizando-se meios semisseletivos e não seletivos para bactérias diazotróficas foram isoladas 303 bactérias presentes em raízes de castanheira-do-Brasil em áreas nativas e cultivadas (COSTA et al., 2014b) e também foram isolados fungos endofíticos tipo “Dark Septate” (COSTA et al., 2014a). No entanto, são necessários estudos de caracterização morfológica e funcional destes micro-organismos.

## 1.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

As bactérias são encontradas em diversos ambientes. As que habitam o interior dos tecidos vegetais (espaços intercelulares e vasos do xilema) são denominadas de endofíticas. O termo endofítico foi originalmente proposto aos micro-organismos capazes de colonizar o interior das raízes, mais tarde tendo sido sugerida sua subdivisão em endofítico obrigatório e endofítico facultativo (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008). Estes termos indicariam, respectivamente, linhagens capazes de colonizar o interior de raízes e partes aéreas, mas incapazes de sobreviver no solo, e linhagens capazes de colonizar o interior das raízes e capazes de sobreviver no solo (BALDANI et al., 1997). Estas bactérias podem ter efeitos negativos (patógenos), neutros ou positivos sobre seu hospedeiro. Os efeitos positivos são aqueles na qual há a promoção do crescimento vegetal, pela fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, produção de antibióticos, indução de resistência sistêmica, produção de sideróforos, entre outros.

Depois do nitrogênio (N), o fósforo (P) é o mais importante nutriente para as plantas, uma vez que esse elemento participa da composição de diversas biomoléculas como a trifosfato de adenosina (ATP), cloroplastos e em processos metabólicos como a fotossíntese, fermentação e o metabolismo celular como um todo (RAVEN; EVERT; EICHHOR, 2007). Associado ao crescimento das plantas, e embora seja abundante nos solos, esse nutriente se encontra pouco disponível devido à sua adsorção a outros metais no solo, como o alumínio e ferro, em solos ácidos, e com o cálcio e magnésio em solos mais alcalinos (ARNOU, 1953). Alguns micro-organismos do solo podem atuar de forma a solubilizar P precipitados com cálcio, ferro e alumínio. Os micro-organismos solubilizadores de P vão atuar sobre o fosfato insolúvel através da atuação de enzimas fosfatases (GYANESHWAR et al., 2002; RODRIGUEZ; GONZALES; SELMAN, 2000), principalmente fosfatases ácidas, liberadas pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, tornando então o P disponível para as plantas (HARA; OLIVEIRA,

2004, 2005; NAUTIYAL, 1999; SILVA et al., 2011a; SILVA FILHO; VIDOR, 2000; SILVA FILHO; NARLOCH; SCARF, 2002).

A solubilização de fosfato inorgânico está relacionada a fatores ambientais, como níveis nutricionais e interação com outros micro-organismos do ambiente. O principal mecanismo de ação na solubilização de P inorgânico são os ácidos orgânicos sintetizados por diversos micro-organismos do solo, atuando através da diminuição do pH, ou como agentes quelantes de elementos que acompanham o íon fosfato, como por exemplo o cálcio, alumínio ou ferro (BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012; FANKEM, et al., 2008; ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1995).

O ácido mais frequentemente observado entre os solubilizadores de fosfato é o ácido glucônico, mas outros ácidos também estão envolvidos na solubilização de fosfato, como ácido láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico e succínico (FANKEM et al., 2008; MARRA et al., 2011, 2012).

A solubilização do fosfato também varia de acordo com a natureza do mineral de fosfato fornecido e a composição do meio que o microrganismo é inoculado. O teste mais comum para avaliar a capacidade de solubilização de P é o teste de formação de halo. Onde bactérias com potencial de solubilização crescem em um meio sólido rico contendo uma única fonte de P insolúvel. Uma vez que uma colônia está em crescimento, o processo de solubilização produz um halo, em que a intensidade da solubilização é proporcional ao tamanho do halo (NAUTIYAL, 1999).

O uso de micro-organismos solubilizadores de fosfatos pode ajudar a aumentar a disponibilidade de P e favorecer o crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas (VESSEY, 2003). Vários estudos têm avaliado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfatos inorgânicos. Dentre os gêneros com esta capacidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Erwinia* (RODRÍGUES; FRAGA, 1999) e *Enterobacter* (WHITELAW, 2000). Trabalhos realizados por Souchie et al. (2005), com mudas de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato, foram benéficas para formação de mudas de angico (*Anadenanthera macrocarpa*), sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e acácia (*Acacia holosericea*).

Outro mecanismo de promoção de crescimento vegetal é a produção de fitormônios. A produção de fitormônios por bactérias endofíticas é relatada por diversos autores, principalmente para a produção de auxinas, citocininas, etileno e giberelinas (GRAY; SMITH, 2005; MOREIRA; ARAÚJO, 2011; PEDRINHO et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2004).

Um dos fitormônios mais estudados são auxinas. A capacidade de sintetizar auxinas é largamente observada em micro-organismos do solo associados a plantas. Estimativas apontam que 80% das bactérias isoladas da rizosfera têm a capacidade de produzir auxinas reguladoras do crescimento vegetal. As auxinas proporcionam o aumento do comprimento da raiz e do número de pelos e raízes laterais. Essas alterações morfológicas se devem tanto pelo estímulo de resposta rápida no aumento na elongação celular quanto pelo estímulo da divisão e diferenciação celular nas plantas (DOBBELAERE; VANDELEYDEN; OKON, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHOR, 2007).

Dada a capacidade de contribuição dos fitormônios, os micro-organismos endofíticos têm o potencial de manipular a fisiologia vegetal e conduzi-la em direção a resultados que favoreçam a sua própria sobrevivência (KIM et al., 2011). Provavelmente, a mais conhecida atividade de hormônio presente durante a associação de planta e micro-organismos envolve a produção do ácido indol acético (COSTACURTA; VANDERLEYDEN, 1995). O ácido indole-3-acético (AIA) controla uma ampla variedade de processos no desenvolvimento e crescimento vegetal e desempenha um papel fundamental na formação e arquitetura das raízes de plantas (ALONI et al., 2006).

Patten e Glick (1996) relatam que um microrganismo pode selecionar uma rota em particular para a biossíntese de AIA, dentre as várias que possui, de acordo com o ambiente. Relata também a existência de mais de uma rota para a síntese de AIA em muitas bactérias, sendo a maioria delas via triptofano. O triptofano é convertido em AIA por várias rotas, como as rotas do ácido indol-3-pirúvico, da triptamina e do ácido indol-3-acetonitrila. Há também bactérias capazes de produzir AIA na ausência do triptofano, seguindo a via metabólica independente de triptofano, mais comum em plantas. Porém, a contribuição dessa via metabólica para a biossíntese de AIA é insignificante e os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos (TSAVKELOVA et al., 2006).

A contribuição deste fitormônio para a promoção do crescimento vegetal já foi demonstrada por *Azospirillum brasilense*, *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes piechaudii*, *Bradyrhizobium* spp., *Comamonas acidovorans*, *Enterobacter* spp., *Rhizobium leguminosarum* dentre outras (VESSEY, 2003).

Experimentos de isolamento de bactérias endofíticas têm revelado grande variabilidade de micro-organismos capazes de produzir grandes quantidades de auxinas “*in vitro*” que, quando inoculados em plantas, promovem o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALIQ; ARSHAD; ZAHIR, 2004).

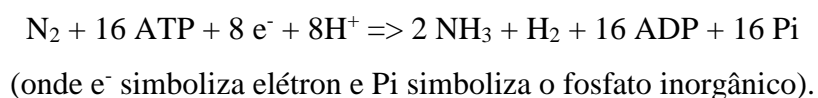
A promoção de crescimento vegetal por micro-organismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos. Além da interação entre o genótipo da planta e a comunidade endofítica promotora de crescimento, outros fatores interagem neste processo, como as comunidades microbianas epifíticas e da rizosfera (PEDRINHO et al., 2010).

A quantidade de ácido-indol-acético produzida pelos micro-organismos depende da espécie que está em estudo. As condições em que os micro-organismos são cultivados (como: presença ou ausência do triptofano para a síntese de AIA, oxigenação, pH, e a fase de crescimento em que se encontra a bactéria), podem influenciar na produção do ácido-indol-acético. O tipo de ambiente e sua vegetação também podem influenciar na produção desse hormônio vegetal, principalmente o ambiente rizosférico, onde o número de micro-organismos é muito maior do que em solos com poucas espécies vegetais, onde a concentração de nutrientes e a competição por colonização de nichos é intensa, podendo atuar na produção desse hormônio no competitivo ambiente rizosférico (PEDRAZA et al., 2004).

### 1.3 Bactérias Diazotróficas Associativas

O nitrogênio é um elemento limitante no crescimento de micro-organismos, plantas e animais, mas precisa ser modificado antes de poder ser utilizado pela maior parte dos organismos vivos. A fixação de nitrogênio é o processo pelo qual o nitrogênio molecular ( $N_2$ ) é reduzido, formando amônia ( $NH_3$ ), tanto por meios físico-químicos quanto por meios biológicos. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem por característica ser um sistema autorregulador, isto é, a fixação cessa uma vez que há suficiente nitrogênio disponível no solo ou para a planta (DÖBEREINER, 1992).

A FBN ocorre graças à enzima nitrogenase, sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica perante a um sistema enzimático apropriado (REIS et al., 2006). A reação catalisada pela nitrogenase pode ser resumida da seguinte forma:



A nitrogenase é uma proteína de molibdênio de ferro que hidrolisa 16 adenosinas trifosfatos (ATP) e transfere oito elétrons por molécula de  $N_2$  fixado, sendo um dos processos

metabólicos que mais demanda energia da célula. Alguns micro-organismos possuem nitrogenase ditas alternativas, onde o molibdênio é trocado por vanádio ou ferro. A nitrogenase é uma enzima relativamente lenta, e para produzir níveis adequados de nitrogênio fixado, o conteúdo enzimático em bactérias diazotróficas é de aproximadamente 10% da proteína celular total. Em função do seu alto custo energético (duas moléculas de ATP para cada elétron transferido para o sítio catalítico), é uma enzima fortemente regulada em muitos organismos. Diversos fatores regulam a expressão e atividade da nitrogenase, como por exemplo, a concentração de oxigênio, disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, nitrogênio, principalmente na forma de amônio, entre outros (REIS et al., 2006).

Os diazotróficos compreendem ampla gama de micro-organismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats, como em água doce ou salgada, no trato intestinal de animais e em todos os tipos de solos terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Döbereiner (1992) a interação entre plantas e os micro-organismos que fixam nitrogênio podem ser classificados em: sistemas de vida livre; sistemas associativos e sistemas simbióticos. No sistema de vida livre, as bactérias não interagem com a planta, ou seja, habitam os microsítios do solo e realizam a fixação do nitrogênio para suprir suas necessidades, independentemente da planta, mas contribuem com o N fixado para o ecossistema como um todo. Nos sistemas associativos, as bactérias colonizam o interior e exterior das raízes, caules e folhas, sem formar estruturas específicas como ocorre nos sistemas simbióticos. Nos sistemas simbióticos ocorrem à formação de estruturas específicas denominadas nódulos na qual ocorrem trocas entre o simbionte (bactéria) e a planta. Tendo uma relação mais íntima entre bactéria e planta, onde se estabelece uma interação genética, bioquímica e fisiológica (MOREIRA et al., 2013).

Os diazotróficos endofíticos e de vida livre não contribuem com o N fixado de forma tão eficiente quanto às simbioses rizóbio e leguminosas, mas estima-se que sua contribuição tanto em sistemas agrícolas como ambientes naturais seja de cerca de 30%. Visto a grande quantidade de gramíneas na agricultura, como milho, trigo, sorgo, etc., trata-se de uma fonte de nitrogênio importante (CHAIRMAN, 1994).

Dentre estas várias bactérias diazotróficas associativas, destacam-se espécies de *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*,



*Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Acetobacter* e a família *Rhizobiaceae*. A maioria tem sido observada em associação com plantas de arroz, milho, sorgo, trigo, soja, feijão, tomate, algodão e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997; BALDANI et al., 2000; BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997; DI CELLO et al., 1997; HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998), sendo que alguns desses micro-organismos são testados quanto a capacidade de produção de vitaminas e fitormônios (REINHOLD-HUREK et al., 2000).

Dentre os diversos gêneros de bactérias diazotróficas associativas, o gênero *Azospirillum* representa um grupo predominante nas associações com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo e gramíneas forrageiras e plantas eudicotiledôneas como palmeiras e fruteiras (BALDANI et al., 2002). Este gênero além da capacidade de fornecer quantidades substanciais de N através da FBN, também produz hormônios que favorecem o desenvolvimento das plantas (HASSAN et al., 1996).

O isolamento das espécies de *Azospirillum* como fixadores de nitrogênio deve-se a introdução de meios semissólidos sem N. O desenvolvimento deste meio foi um fato muito importante para o isolamento de diazotróficos com caráter microaerofílico (pouco oxigênio). No caso de *Azospirillum*, entre outros, o crescimento dependente da fixação de N<sub>2</sub> em regiões do meio de cultura onde a tensão de O<sub>2</sub> está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias e, posteriormente, a película formada vai se deslocando até a superfície do meio, pois aumenta a demanda de oxigênio, graças ao fenômeno de aerotaxia (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

A maioria dos diazotróficos associativos estudados até o momento foram isolados a partir de gramíneas (MOREIRA et al., 2010), e poucos foram realizados com espécies arbóreas. Por exemplo, em estudo no Canadá com *Pinus contorta* var. *latifolia* Engelm. ex S. Watson, foi observada entre os isolados obtidos a predominância de *Bacillus* e *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio (BAL et al., 2012). Já em pesquisa realizada no Brasil, com *Araucaria angustifolia* foi encontrada em amostras de solo e raízes a predominância de diazotróficos pertencentes ao gênero *Burkholderia* (NERONI; CARDOSO, 2007). Em castanheira-do-Brasil, o primeiro relato do isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado por Costa et al. (2014b) através da utilização de meios semissólidos semisseletivos e não seletivos para o isolamento de diazotróficos, no entanto, mais estudos são necessários para a caracterização dessas bactérias.

#### 1.4 Caracterização Fenotípica

A caracterização fenotípica é a primeira etapa do processo de identificação de um procarioto na maioria dos laboratórios de microbiologia (BOONE; CASTENHOLZ, 2001). Estes métodos não envolvem manipulação ou análise direta de moléculas de DNA ou RNA, compreendem apenas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além de suas aplicações biotecnológicas. A morfologia inclui tanto as características celulares (forma, formação de endósporo, flagelos, tipo de parede celular) quanto de colônias (cor, dimensão, forma, etc.). As características fisiológicas e bioquímicas incluem informações de cultivo e adaptabilidade como o crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal e açúcares, condições atmosféricas, crescimento na presença de vários substratos, atividades enzimáticas, produção de metabolitos variados, composição de lipídeos das células, etc. Muitas destas propriedades fenotípicas podem ser utilizadas, não só para determinação da taxonomia das bactérias, mas também para verificar uma provável adaptabilidade ecológica dos diferentes micro-organismos às condições ambientais (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Estas características, que deveriam ser à base de qualquer sistema de classificação, fornecem poucas informações sobre as relações evolutivas entre os micro-organismos e geralmente fornecem apenas 5 a 20% da expressão do genoma taxonômico (HUGENHOLTZ; PACE, 1996).

Análise de proteínas totais através do SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio) para identificação de espécies bacterianas têm proporcionado informações relevantes nos estudos de caracterização e taxonomia. A expressão do genoma microbiano resulta na síntese de aproximadamente 2.000 moléculas de proteínas (JACKMAN, 1985), o que têm fornecido informações relevantes nos estudos de seleção, caracterização e taxonomia. A correlação entre resultados de hibridização DNA:DNA e do perfil eletroforético de proteínas tem sido evidenciada (VANDAMME et al., 1996). Este método permite, principalmente, diferenciar estirpes e espécies (RADEMAKER; BRUIJIN, 1997), sendo considerada uma ferramenta útil para o estudo da diversidade de micro-organismos em geral e tem sido aplicado no estudo de diazotróficos simbióticos (DUPUY et al., 1994; LAJUDIE et al., 1994; MOREIRA et al., 1993).

O método de SDS-PAGE de proteínas totais tem sido amplamente utilizado para investigar a diversidade de diazotróficos. Vários autores (DUPUY et al., 1994; LAJUDIE et al., 1994; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA et al., 2000) que empregaram este método identificaram novas espécies de rizóbio. Além disso, há relatos de identificação de espécies de

*Burkholderia* (SILVA et al., 2012) e a possibilidade da presença de novas espécies entre os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia* (NÓBREGA et al., 2004). Além disso, essa técnica pode ser utilizada para selecionar bactérias distintas quando se tem um número grande de isolados.

Embora os testes fenotípicos forneçam inúmeras informações essenciais à identificação dos micro-organismos, a combinação das informações fenotípicas, genômicas e proteômicas são necessárias para uma descrição e classificação mais precisa das bactérias (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

### 1.5 Caracterização Genotípica

Os métodos genotípicos são aqueles direcionados para moléculas de DNA ou RNA. Atualmente, estes métodos dominam os estudos da taxonomia moderna de bactérias como uma consequência do progresso tecnológico. A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade destes organismos. A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica molecular que a partir da extração do DNA, possibilita a amplificação de sequências de interesse utilizando tanto iniciadores específicos como ao acaso e iniciadores de regiões conservadas do DNA. Essa técnica foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis e a partir dela, mudou-se a forma de análise do DNA em função da produção de múltiplas cópias de sequências específicas, sem a necessidade da técnica de clonagem (ALBERTS et al., 2010).

O sequenciamento de genes que codificam para o RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para estudos de diversidade. Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem influência por mudanças no meio ambiente. Atualmente, o gene 16S rDNA é o mais utilizado para inferir a respeito das relações filogenéticas entre bactérias (MOREIRA et al., 2010).

A FBN é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (“nitrogen fixation”), os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente neste processo (TEIXEIRA, 1997). A descoberta dos genes envolvidos na FBN foi resultado do estudo da genética da fixação de nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* (CANNON; DIXON; POSTGATE, 1976; DIXON; CANNON; KONDOROSI, 1976; DIXON; POSTGATE, 1972; STREICHER; GURNEY; VALENTINE, 1972).

Fragments do gene *nifH* podem ser amplificados a partir de diversos organismos, e sua sequência pode ser usada na identificação taxonômica de organismos fixadores desconhecidos (ZEHR et al., 1995). Segundo esses autores, a amplificação e sequenciamento do gene *nifH* são úteis para analisar o potencial genético de organismos isolados do ambiente em fixar o nitrogênio atmosférico. A presença de regiões conservadas e variáveis nesses genes torna-os alvos adequados ao desenvolvimento de iniciadores para PCR universais ou específicos (SIMONET et al., 1991).

Existem vários trabalhos em que os genes *nif*, principalmente o gene *nifH*, foram utilizados como marcadores no estudo de organismos fixadores de nitrogênio, como *Frankia* spp., rizóbios, *Trichodesmium* spp. e cianobactérias, e para a detecção e estudo da diversidade genética de comunidades de diazotróficos em raízes de arroz (UEDA et al., 1995), em solo de floresta (WIDMER et al., 1999) e no trato digestivo de cupim (OHKUMA et al., 1996). Dessa maneira, os genes *nif* são úteis na detecção molecular de populações de diazotróficos bastante diversas.

## 2 OBJETIVOS

Esta pesquisa se desenvolveu com o fim de atingir os seguintes objetivos:

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e genotípicamente as bactérias endofíticas isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em áreas cultivadas e nativas, bem como avaliar a presença de características desejáveis para promoção do crescimento vegetal.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotipicamente os isolados bacterianos da castanheira-do-Brasil oriundo de áreas cultivadas e nativas presentes em três localidades no estado de Roraima.
- Avaliar características desejáveis quanto à promoção do crescimento vegetal das bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil.
- Caracterizar molecularmente os isolados pela avaliação dos genes *nifH* e gene 16S rRNA.
- Identificar os principais gêneros de bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil em Roraima.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no período de janeiro de 2014 a julho de 2015, no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima, localizado na BR 174 km 8, Distrito Industrial, Boa Vista-RR.

#### 3.1 Origem das Bactérias

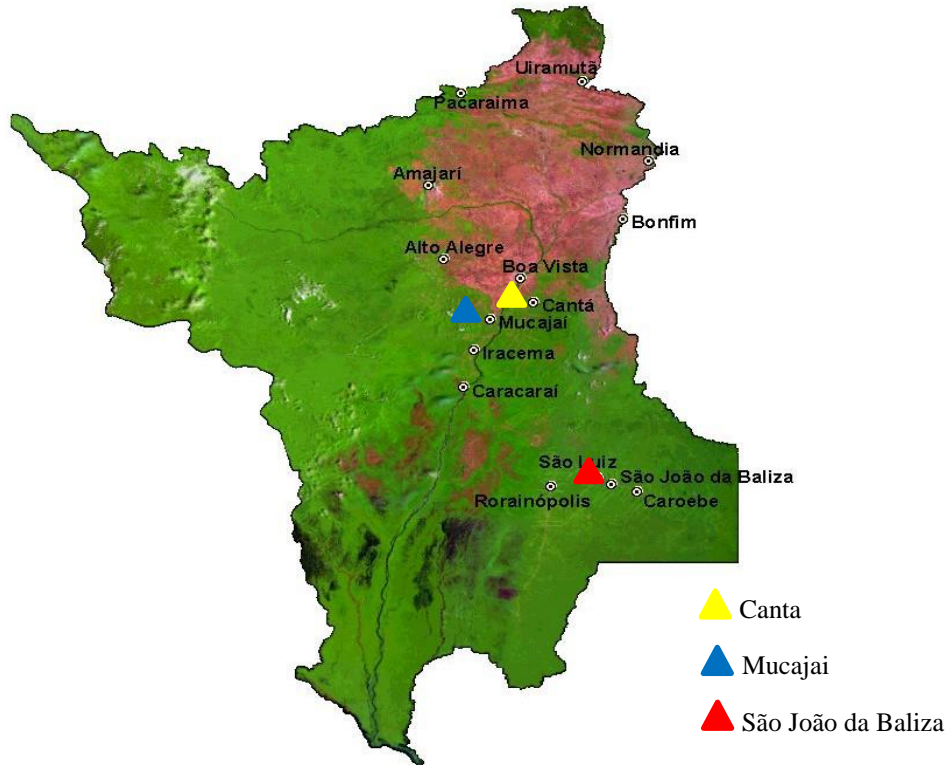
No período de abril a outubro de 2013 foram realizadas coletas de solos e de raízes de castanheira-do-Brasil, em três localidades no Estado de Roraima (Figura 1).

Foi realizada a coleta de raízes de 11 plantas no Campo Experimental Serra da Prata (Município de Mucajaí) onde há um plantio de monocultivo de castanheiras com seis anos de idade (N 02°22'28,2'' e W 060°59'46,8'') (APÊNDICE A). A área apresenta precipitação anual na faixa de 1.840 a 2090 mm.ano<sup>-1</sup> e clima Ami, caracterizado como tropical chuvoso com nítida estação seca, temperatura média anual variando entre 26 a 29 °C e amplitude térmica inferior a 5°C entre as médias do mês mais quente e do mês mais frio. O tipo de solo é o Argissolo Vermelho-Amarelo.

No Campo Experimental Confiança (Município do Cantá) foi realizada a coleta de raízes de 10 plantas (APÊNDICE B a F) dentro de um plantio consorciado em sistema agroflorestal (SAF) com 19 anos de implantação (N 02° 15' 00" e W 60° 39' 54"). Esta área apresenta vegetação de floresta e clima Ami (tropical úmido com pequeno período de seca durante o ano). O solo é classificado como Argissolo Distrófico Vermelho-Amarelo com baixos níveis de fertilidade. Como espécies componentes da área de SAF têm-se: castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), cupiúba (*Goupia glabra*), pupunha (*Bactris gasipaes*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), café (*Coffea canephora*), saman (*Samanea saman*) e andiroba (*Carapa guianensis*).

Em área de floresta nativa foi realizada a coleta de raízes de sete plantas, pertencentes ao projeto Kamukai no município de São João da Baliza (N 02°45'24,9'' e W 060°43'53,2''). O clima da região é do tipo Ami (tropical úmido com pequeno período de seca durante o ano) e Aji (tropical chuvoso sem estação seca). O período caracteristicamente seco está compreendido entre os meses de novembro e março (FEMACT, 1993). O solo predominante na região é o Argissolo Amarelo Distrófico e Latossolo Amarelo Distrófico.

Figura 1 – Localização das áreas de coletas de raízes de castanheira-do-Brasil no estado de Roraima



As escolhas das plantas para coletas das raízes foram estabelecidas para indivíduos arbóreos com no mínimo 10 cm de diâmetro a altura do peito. As amostras de raízes foram coletadas a uma distância mínima de 5 cm e máxima de 2 m distante do caule das plantas, na profundidade de 5-20 cm, o método de escavação foi de acordo com a metodologia descrita por St. John (1980). As raízes coletadas em condições de campo foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima e guardadas em freezer. Também foram coletadas amostras de solo para análise química e granulométrica (Tabelas 1, 2 e 3) de acordo com Embrapa (1997).

Tabela 1 – Análise química e granulométrica do solo no Campo experimental Confiança (Município do Cantá) dentro de um plantio consorciado em sistema agroflorestal (SAF) com 19 anos de implantação

pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	P	V	MO	Argila	Silte	Areia
cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>					mg dm <sup>-3</sup>		%	g dm <sup>-3</sup>	%		
5,9	3,5	0,7	0,2	0,1	5,12	19,33	44,9	41,4	23	8	69

Legenda: V: saturação por bases; MO: teor de matéria orgânica.

Tabela 2 – Análise química e granulométrica do solo no Campo experimental Serra da Prata (Município de Mucajaí) onde há um plantio de monocultivo de castanheiras com seis anos de idade

pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	P	V	MO	Argila	Silte	Areia
	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>					mg dm <sup>-3</sup>	%	g dm <sup>-3</sup>	%		
4,8	1,2	0,4	0,04	1	2,3	3	41	7	28	15	57

Legenda: V: saturação por bases; MO: teor de matéria orgânica.

Tabela 3 – Análise química e granulométrica do solo em áreas de floresta nativa pertencentes ao projeto Kamukai no município de São João da Baliza

pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	P	V	MO	Argila	Silte	Areia
	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>					mg dm <sup>-3</sup>	%	g dm <sup>-3</sup>	%		
4,5	0,33	0,19	0,19	0,82	5,77	1,95	11	23	28	15	57

Legenda: V: saturação por bases; MO: teor de matéria orgânica.

Para o isolamento, as raízes foram previamente lavadas em água potável, para retirada do solo, e cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm, e então desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos e peróxido de hidrogênio a 5% por 1 minuto. Posteriormente, as raízes, foram lavadas três vezes com água deionizada estéril. Em seguida, fragmentos de raízes foram distribuídos em tubos com meios semissólidos isentos de nitrogênio NFB e LGI semisseletivo para *Azospirillum* spp. (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; MAGALHÃES et al., 1983), JMV semisseletivo para *Burkholderia* spp. (ESTRADA DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; ABALLEROMELLADO, 2001) e DYG'S não seletivo (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) com cinco repetições. Em seguida foram mantidos por 10 dias em câmara de crescimento a 28° C. Todas as culturas que apresentaram a formação de película foram isoladas em placa, repicadas em meio de origem sólido, as quais foram incubadas com a mesma temperatura. Três colônias foram transferidas para meios semissólidos para confirmar o crescimento da película. Os meios que não apresentaram a formação de películas foram descartados.

Num total foram isoladas 303 bactérias, sendo 81 oriundas da área de monocultivo de castanheira. O maior número de isolados em seus respectivos meios foram obtidos das coletas realizadas em áreas de SAF, com 154 isolados. Em área de floresta nativa, foi obtido menor número de isolados, 68. O maior número de isolados, 182, foi obtido em meio DYG', seguido pelo meio NFB com 50, LGI com 49 e JMV com 22 isolados (Tabela 4).



Tabela 4 – Número bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil por sistema de cultivo e meio utilizados para o isolamento

Sistema de cultivo	Meios utilizados				Por Área
	DYG'S	NFB	LGI	JMV	
Área de Monocultivo	69	1	3	8	81
SAF	65	39	39	11	154
Área Nativa	48	10	7	3	68
<b>Total de Isolados</b>	<b>182</b>	<b>50</b>	<b>49</b>	<b>22</b>	<b>303</b>

Todas as bactérias obtidas a parti do isolamento, foram caracterizadas morfológicamente no trabalho de COSTA et al. (2014b) sendo avaliadas as seguintes características em meio sólidos: manifestação de crescimento, diâmetro, forma, elevação, borda, e superfície da colônia, produção, transparência e tipo de muco.

No meio DYG'S os isolados caracterizados apresentaram 67% de crescimento muito rápido, 33% rápido. Quanto à forma da colônia 92% apresentaram forma circular e 8% irregular. Os tamanhos iniciais entre as colônias dos 182 isolados neste meio variavam de  $\leq 1$  a 4 mm e o tamanho final variou de 1 a 5 mm. Em relação a elevação da colônia, 8% apresentaram elevação plana e 4% elevada e 88% convexa. As variações quanto à superfície das colônias foram de 97% lisa e 3% rugosa. Já no meio JMV os isolados caracterizados apresentaram 46% de crescimento rápido, 36% intermediário e 18% lento. Quanto à forma da colônia 91% apresentaram forma circular e 9% irregular. Os tamanhos iniciais entre as colônias dos 22 isolados neste meio variavam de  $\leq 1$  a 4 mm e o tamanho final variou de 1 a 5 mm. Em relação a elevação da colônia, 9% apresentaram elevação plana e 31% elevada e 60% convexa. As variações quanto à superfície das colônias foram de 100% lisa. No meio NFB os isolados apresentaram 90% de crescimento rápido e 10% intermediário. Quanto à forma das colônias 100% apresentaram forma circular. Os tamanhos iniciais entre as colônias dos 50 isolados neste meio variavam de  $\leq 1$  a 3 mm e o tamanho final variou de 1 a 4 mm. Já a elevação da colônia, 100% apresentaram elevação convexa. As variações quanto à superfície das colônias foram de 100% lisa. No meio LGI os isolados apresentaram 13% de crescimento rápido, 83% rápido e 4% intermediário. Quanto à forma das colônias 100% apresentaram forma circular. Os tamanhos iniciais entre as colônias dos 49 isolados neste meio variavam de  $\leq 1$  a 4 mm e o tamanho final variou de 1 a 5 mm. A elevação da colônia, 49% apresentaram elevação elevada e 51% convexa. As variações quanto à superfície das colônias foram de 100% lisa.

### 3.2 Coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Roraima

As 303 bactérias obtidas foram armazenadas na coleção de micro-organismos multifuncionais da Embrapa Roraima. Cada isolado foi identificado utilizando a sigla ERR (Embrapa Roraima) seguida de uma numeração sequencial. Para a criopreservação, cada isolado foi cultivado em placas com meio sólido DYG'S (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) e incubados em BOD a 28°C, após o crescimento foi adicionado à superfície do meio três mililitros de meio DYG'S líquido suplementado com solução crioprotetora de glicerina a 20%. Deste, um mililitro foi adicionado em um tubo de criopreservação e armazenado a -80°C. Cada bactéria foi armazenada em duplicata.

As coleções de cultura de micro-organismos apresentam importantes contribuições para preservação da biodiversidade, manutenção e suprimento de cultura autenticadas aos pesquisadores e nas suas trocas de material entre instituições para estudos futuros.

### 3.3 Análises de Proteínas Totais por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após o crescimento das bactérias em seus respectivos meios de cultivo, estas foram repicados em meio NAB sólido (Anexo E) e incubadas por 48 horas a 28° C. As análises de proteínas totais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita pelo laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA Roraima (Anexos A a C). Após as 48 horas de crescimento dos isolados foi feita a raspagem do muco, com auxílio de uma espátula tendo o cuidado para não levar o meio de cultivo, o muco foi transferido para microtubo de 1,5 ml e adicionado 1 ml do tampão da amostra (LAEMMILI, 1970) modificado com solução de SDS a 10% para a solubilização das proteínas. Posteriormente as amostras foram aquecidas em banho-maria a 95° C por 15 min e depois centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e seu sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. Posteriormente, retirou-se 50 µL do sobrenadante a qual foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

Para eletroforese, foi utilizado um gel de sistema descontínuo com concentração de poliacrilamida a 12%, para o gel separador, e a 4%, para o gel de concentração. Para a corrida foi aplicada uma corrente de 300V e 100 mA por 3 horas e 30 minutos. A visualização dos fragmentos foi realizada através da coloração do gel com Coomassie® Brilliant Blue R 250,

SERVA (Lot 120280). Posteriormente, os géis foram postos para descoloração e fixação, em seguida fotografados sob luz branca em fotodocumentador L-PIX<sup>ex</sup> (Loccus Biotecnologia).

Para comparação foram incluídas as estirpes tipo e de referência: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasiliense*), BR11340 (*Burkholderia* sp.), BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*), BR 11192<sup>T</sup> (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), ERR513 (*Bacillus* sp. isolada de raízes de braquiária), ERR530 (*Agrobacterium* sp. isolada de raízes de braquiária), ERR 549 (*Pseudomonas* sp. isolada de raízes de milho), ERR 553 (*Pseudomonas* sp. isolada de raízes de milho), e SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*).

Para a realização desta análise, todas as condições de cultivo foram rigorosamente padronizadas tanto para todos os isolados bacterianos como para as estirpes tipo e de referência.

A normalização, interpolação dos perfis de proteínas, análise numérica e construção do dendrograma de similaridade foi realizado utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson pelo programa Bionumerics 6.5 (Applied Maths).

A partir da análise do dendrograma gerado foi calculado o índice de diversidade de Shannon (SHANNON; WEAVER, 1963) e a curva de rarefação que consiste em calcular o número esperado de espécies em cada amostra para um tamanho de amostra padrão (COLWELL, MAO, CHANG, 2004) utilizando o software EstimateS versão 9.1.0.

A partir dos resultados dos perfis de proteínas totais foram selecionados os isolados que apresentaram diferentes padrões proteicos para a caracterização quanto à capacidade de promoção do crescimento e análise genotípica.

### 3.4 Características de Promoção do Crescimento

Para avaliar as características de promoção do crescimento vegetal nas bactérias foram realizadas as seguintes análises:

#### 3.4.1 Solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio em meio sólido

Foram instalados dois experimentos, um para verificar a capacidade dos isolados de solubilizar fontes inorgânicas insolúveis de fosfatos de CaHPO<sub>4</sub> (P-Ca) e AlPO<sub>4</sub> (P-Al). Foi utilizado o meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) modificado, contendo por litro: 10 g de glicose;

0,25 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $(NH_4)_2SO_4$ . Para a solubilização de fosfato de cálcio foi utilizado 2,6 g de  $CaHPO_4$  e o pH foi ajustado para 7,0. Para a solubilização de fosfato de alumínio foi utilizado 2,36 g de  $AlPO_4$  e o pH do meio ajustado para pH 4,5. Para o meio sólido foi adicionado 10 g de ágar por litro.

Para avaliação da capacidade solubilizadora em placas, as bactérias foram cultivadas em meio DYG'S (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) líquido por 24 horas e a densidade ótica (DO) foi ajustada para 0,5-0,7 em comprimento de onda de 630 nm. Procedeu-se então a inoculação de 10  $\mu$ L de suspensão bacteriana crescida em três pontos equidistantes na placa já contendo os meios com os fosfatos precipitado. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Foram incluídas quatro estirpes padrões e de referência como controles positivos para avaliação da solubilização de fosfatos: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasiliense*), BR11340 (*Burkholderia* sp.), BR11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*), ERR 532 (*Bacillus* sp. isolada de raízes de braquiária). As placas foram incubadas a 28° por 18 dias e a cada seis dias foi medido o diâmetro do halo de solubilização (áreas translúcidas ao redor das colônias), utilizando um paquímetro digital, resultando em três medições. A partir dessas medidas foi obtido o índice de solubilização (IS) para cada bactéria através da fórmula:  $IS = \text{Ø halo (mm)} / \text{Ø colônia (mm)}$  (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como de baixa (IS até 2), média (IS de 3 a 4) e alta ( $IS \geq 5$ ) capacidade de solubilização.

### 3.4.2 Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio em meio líquido

Para verificar a determinação dos isolados em solubilizar P, aproximadamente 1 mg de células cultivada em meio DYGs sólido foram inoculadas em erlernmyer de 125 mL contendo 30 mL de meio líquido NBRIP contendo o fósforo precipitado. Em relação a solubilização de P-Ca foram feitos dois experimentos, um com 1,5 mg de  $CaHPO_4$  e outro com o fosfato de cálcio obtido pela mistura de 1,37 mL de uma solução de  $K_2HPO_4$  a 5% e 1,14 mL de uma solução de  $CaCl_2$  a 10%. Para a solubilização do fosfato de alumínio foi utilizado o  $AlPO_4$ . Ambas as fontes de P ( $AlPO_4$  e  $CaHPO_4$ ) foram correspondentes a 12 mg  $L^{-1}$  de P. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Foram incluídas cinco estirpes padrões e de referência: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasiliense*), BR11340 (*Burkholderia*

sp.), BR11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*), BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*), ERR532 (*Bacillus* sp. isolada de raízes de braquiária).

Para a determinação do fósforo solubilizado, os erlenmeyers contendo os meios inoculados com as bactérias foram incubados a 28°, sob agitação constante de 150 rpm por quatro dias. No final desse período, procedeu-se a determinação do pH e em seguida realizou-se a centrifugação a 10.000 rpm por 5 min, e 5 mL do sobrenadante bacteriano foi transferido para copo descartável de 50 mL onde adicionou-se primeiramente 10 mL da solução de ácido molibdato de amônio diluída (EMBRAPA, 2009), seguido a adição de ±30 mg de ácido ascórbico e levemente homogeneizado. Após uma hora foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro SP 2000 UV, BEL, a 660 nm. A concentração de fósforo solubilizado no meio de cultivo foi estimada usando uma curva padrão preparada anteriormente com 0, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 4.5, 5 e 6 mg L<sup>-1</sup> de P na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### 3.4.3 Produção de ácido indol acético

Para a determinação do ácido indol-3-acético (AIA), as bactérias e as estirpes tipo e de referência *Azospirillum brasilense* BR 11001<sup>T</sup> (RADWAN; MOHAMED; REIS, 2002), *Burkholderia* sp BR11340, *Herbaspirillum frisingense* BR11790<sup>T</sup>, *Herbaspirillum seropedicae* BR11175<sup>T</sup> (BALDANI et al., 1986) e a ERR 532 (*Bacillus* sp. isolada de raízes de braquiária) foram cultivadas em meio DYG'S líquido (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) por 24 horas. Após o crescimento a densidade óptica foi ajustada para 0,6-0,8 a 630 nm. Alíquotas de 500 µl das soluções bacterianas foram inoculadas em 6 mL de meio DYG'S (sem L-triptofano ou suplementadas com 100 mg L<sup>-1</sup> de L-triptofano) com três repetições e incubadas no escuro durante 48 horas a 28°C com agitação constante de 150 rpm. Para quantificar os compostos indólicos produzidos após este período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min, após a centrifugação, retirou-se 3 mL do sobrenadante o qual foi adicionado de 2 mL de reagente Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). Esta mistura foi colocada no escuro durante 20 minutos para desenvolvimento da cor rosa, o qual é indicativo de produção de AIA. A intensidade da coloração foi determinada em espectrofotômetro SP 2000 UV, BEL, a 535 nm. A concentração de AIA foi estimada usando uma curva padrão preparada com 0, 10, 25, 50, 75 e 100 µg AIA mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, cod. I3750).

#### 3.4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente usando programa Sisvar versão 4.3 (FERREIRA, 2008) sendo realizados os testes de distribuição normal dos erros e a análise de variância. O teste de média foi realizado pelo método de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 3.5 Caracterização Genotípica

Para avaliar a caracterização genotípica das bactérias foram realizadas as seguintes análises:

##### 3.5.1 Extração de DNA genômico

Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio estéril contendo 5 mL de meio DYG'S (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986) líquido e levados a incubadora por 24 horas a 28°C a 120 rpm. Posteriormente, 1,0 mL dessa cultura foi utilizada na extração do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo padrão do kit comercial RBC, Bioamérica (cat. YGB300), de acordo com as instruções do fabricante.

##### 3.5.2 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Para amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). Uma alíquota de 1 µL do DNA extraído foi utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) com um volume final de 50 µL por reação. As concentrações dos reagentes, por reação, foram de 0,2 µM de cada iniciador 27F e 1492R; 2,5 µM de cloreto de magnésio; tampão de PCR 10X; 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador ProFlex™ PCR SYSTEM, (LIFE Technologies), onde as condições para a amplificação foram: desnaturação inicial a 94° C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1,5 min) e uma extensão final (72°C por 7 min). O produto amplificado (aproximadamente 1600 pares de base)

foi visualizado através da coloração com Gel Red, em gel de agarose 1% sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador L-PIX<sup>ex</sup>, Locus Biotecnologia. O produto foi então purificado com o kit comercial PCR Purification 250, QIAquick<sup>®</sup> (cat. 28106) e enviado para empresa terceirizada para o sequenciamento parcial utilizando o iniciador 27F. As sequências foram submetidas à ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para verificar a identidade das sequências com as depositadas no GeneBank. As sequências dos isolados mais as sequências das estirpes tipo mais similares foram alinhadas utilizando o ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). A árvore filogenética foi inferida através do método de Neighbor-joining, utilizando o modelo de Kimura 2 (KIMURA, 1980) com 1000 repetições (bootstrap), com uso do programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

### 3.5.3 Amplificação do gene *nifH*

O gene *nifH* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 19F (5'-CCI WTY TAY GGI AAR GGI GG-3') e 407R, (5'-AAI CCR CCR CAI ACI ACR TC-3') que amplificam um fragmento entre 400 e 500 pb de acordo com a metodologia descritas por Ueda et al. (1995). Uma alíquota de 1 µL do DNA extraído foi utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) com um volume final de 50 µL por reação. As concentrações dos reagentes, por reação, foram de 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM de cada iniciador 19F e 407R, 1 U Taq DNA polimerase, 10X PCR Buffer e água ultrapura. As condições da amplificação foram: desnaturação inicial a 95° C durante 3 min, 30 ciclos de desnaturação (94° C por 1 min), anelamento (52° C por 1 min), extensão (72° C por 2 min) e uma extensão final (72° C por 3 min). O produto amplificado foi visualizado através da coloração com Gel Red, em gel de agarose a 1% sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador L-PIX<sup>ex</sup>, Locus Biotecnologia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de cada metodologia aplicada nas avaliações estão descritos nos subtópicos abaixo.

### 4.1 Análises de Proteínas Totais por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Das 303 bactérias isoladas, foram obtidos no total de 290 perfis proteicos. Através da análise dos perfis proteicos foram gerados quatro dendrogramas referentes a cada meio de isolamento, JMV (APÊNDICE G), NFB (APÊNDICE H), LGI, (APÊNDICE I) e DYG'S (APÊNDICE J). A partir desses dendrogramas, foi realizada uma seleção dos grupos formados a 80% de similaridade em cada meio de isolamento utilizado para dar continuidade ao procedimento quanto à capacidade de promoção do crescimento e análise genotípica.

Referente ao meio de isolamento JMV, foram formados quatro grupos, onde dentro desses grupos, cinco bactérias foram selecionadas. No meio NFB, foram formados oito grupos, sendo selecionadas doze bactérias que apresentaram diferentes padrões proteicos entre si. Referente ao meio LGI foram formados oito grupos e posteriormente dez bactérias foram selecionadas. Em relação ao meio DYG'S, foram formados 50 grupos com 80% de similaridade e 73 bactérias selecionadas. A seleção por meio de cultivo no qual as bactérias foram isoladas, foi para se tentar capturar as bactérias mais diferentes através dos perfis de proteínas obtidos. No total foram selecionadas 100 bactérias isoladas de quatro meios de cultivos distintos de duas áreas de cultivo e uma nativa (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Meio de isolamento, número de grupos de perfis proteicos formados, origem e total de isolados de bactérias obtidas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima

Meios de isolamento	Grupos formados 80% de similaridade	Nº de isolados por origem			Total de isolados selecionados
		Nativa	Sistema Agroflorestal	Monocultivo	
DYG'S	50	16	28	29	73
LGI	8	3	6	1	10
NFB	8	2	10	0	12
JMV	4	1	2	2	5
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>22</b>	<b>46</b>	<b>32</b>	<b>100</b>



Tabela 6 – Bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima selecionadas através do perfil proteico para caracterização

Bactérias	Área de Isolamento	Nº total de isolados por Área
ERR 575; ERR 584; ERR 602; ERR 604; ERR 611; ERR 616; ERR 626; ERR 640; ERR 710; ERR 711; ERR 712; ERR 717; ERR 719; ERR 720; ERR 721; ERR 723; ERR 727; ERR 733; ERR 737; ERR 738; ERR 739; ERR 741; ERR 744; ERR 745; ERR 750; ERR 752; ERR 753; ERR 754; ERR 761; ERR 762; ERR 763; ERR 765; ERR 770; ERR 771; ERR 772; ERR 773; ERR 827; ERR 828; ERR 838; ERR 843; ERR 849; ERR 858; ERR 859; ERR 865; ERR 870; ERR 873	SAF	46
ERR 587; ERR 612; ERR 642; ERR 644; ERR 779; ERR 782; ERR 785; ERR 792; ERR 794; ERR 795; ERR 797; ERR 803; ERR 805; ERR 807; ERR 809; ERR 813; ERR 815; ERR 819; ERR 821; ERR 822; ERR 830; ERR 833	Nativa	22
ERR 589; ERR 594; ERR 596; ERR 651; ERR 652; ERR 654; ERR 656; ERR 657; ERR 660; ERR 665; ERR 667; ERR 669; ERR 673; ERR 676; ERR 677; ERR 678; ERR 679; ERR 680; ERR 684; ERR 689; ERR 691; ERR 692; ERR 694; ERR 698; ERR 701; ERR 703; ERR 705; ERR 706; ERR 708; ERR 709; ERR 799; ERR 800;	Monocultivo	32
<b>Total</b>		<b>100</b>

Analisando os dendrogramas de similaridade formados pelo agrupamento de perfis proteicos dos isolados, foi possível verificar uma elevada diversidade entre os isolados obtidos, inferindo-se, assim, uma alta diversidade de bactérias. Nenhum dos 290 perfis apresentaram 100% de similaridade com as estirpes de referência. Nesse contexto, a dissimilaridade dos isolados em relação as estirpes de referência, comprova esta diversidade, possibilitando a provável presença de novas espécies de bactérias endofíticas.

Também foi gerado dendrogramas de similaridade por área de isolamento (monocultivo, sistema agroflorestal e vegetação nativa). Foi formado 32 grupos a 80% de similaridade com as bactérias obtidas na área de sistema agroflorestal (APÊNDICE L), seguido por 25 grupos em área de monocultivo (APÊNDICE M) e 16 grupos em área de floresta nativa (APÊNDICE N). O menor número de grupos obtidos em área nativa pode ser devido ao fato de que em área de vegetação nativa, as castanheiras estão estabelecidas em um ambiente que se encontra em equilíbrio (clímax), devido a comunidade microbiana presente na rizosfera estar atuando na decomposição da matéria orgânica, na mineralização e na fixação de nutrientes influenciando em suas propriedades químicas e físicas e suprimindo a necessidade de nutrientes e do gasto energético, consumindo tudo que se produz, levando a uma menor diversificação de micro-organismos. Alguns estudos têm encontrado menor diversidade de bactérias diazotróficas em

áreas de floresta comparados a outros sistemas de uso do solo (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2011b).

A análise de proteína total por SDS-PAGE permite avaliar a diversidade de bactérias com confiabilidade, rapidez e baixo custo. Em trabalho de Nóbrega et al. (2004), mediante a análises de proteínas totais por SDS-PAGE, verificaram elevada diversidade de bactérias diazotróficas associativas em áreas de reabilitação após mineração de bauxita, incluindo isolados que poderiam representar novas espécies entre os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*. Silva et al. (2012) obtiveram, também mediante a essa técnica, a identificação e a comparação entre isolados de *Burkholderia* sp. obtidos de solos da Amazônia com características de promoção do crescimento vegetal. Segundos Vandamme et al., (1996) a comparação dos padrões de proteína totais em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), é uma técnica extremamente confiável para comparar e agrupar um grande número de estirpes estreitamente relacionadas e que essa técnica possui correlação entre perfis similares com a hibridação de DNA-DNA, que é utilizada para diferenciação entre espécies. Sendo assim, essa técnica constitui um método fenotípico de fácil execução e que pode ser utilizada para a seleção de bactérias de um grande grupo como neste trabalho.

Com o objetivo de avaliar a diversidade em cada ambiente, calculou-se então o índice de diversidade de Shannon através dos grupos proteicos de todas as amostras analisadas juntamente, a 85% de similaridade. As curvas de variação para o índice de Shannon tenderam a atingir a assíntota (Figura 2), isto significa que a coleta de mais bactérias levaria a uma variação pequena no valor do índice. Portanto, foi realizada uma boa estimativa da diversidade de bactérias presentes nas raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima. As curvas com os índices de diversidade foram similares para as três localidades de onde foram isoladas as bactérias. Isto pode ser confirmado pela curva de rarefação (Figura 3), onde as curvas das diferentes áreas se sobrepõem. Apesar das diferenças no número obtido em cada área, o número de bactérias isoladas foi suficiente para avaliar a diversidade.

Figura 2 – Índice de diversidade Shannon (H) de bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima

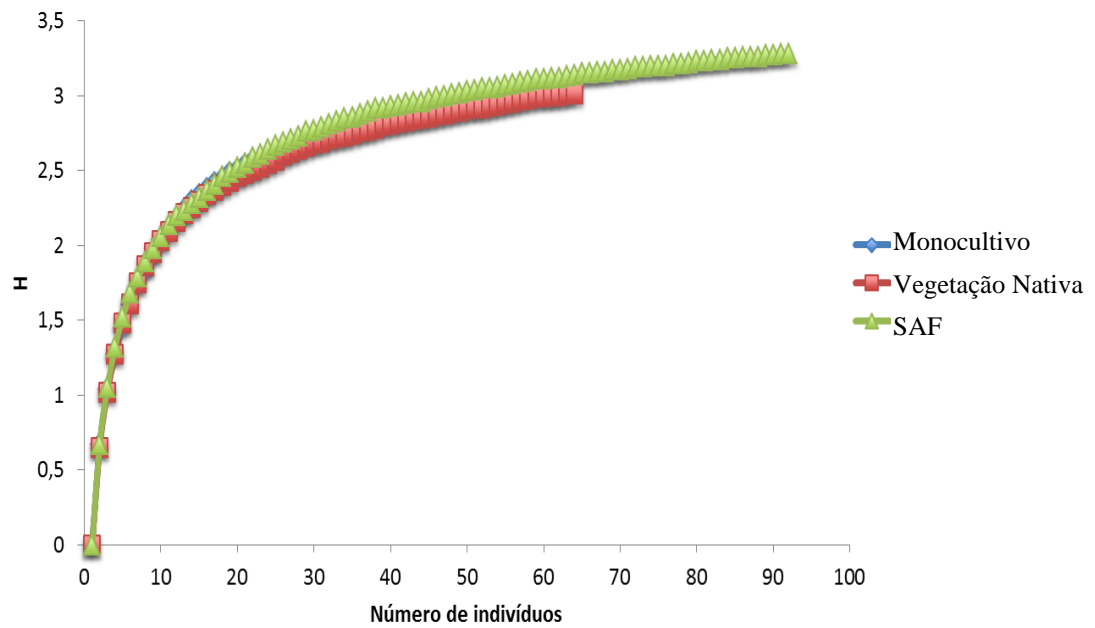
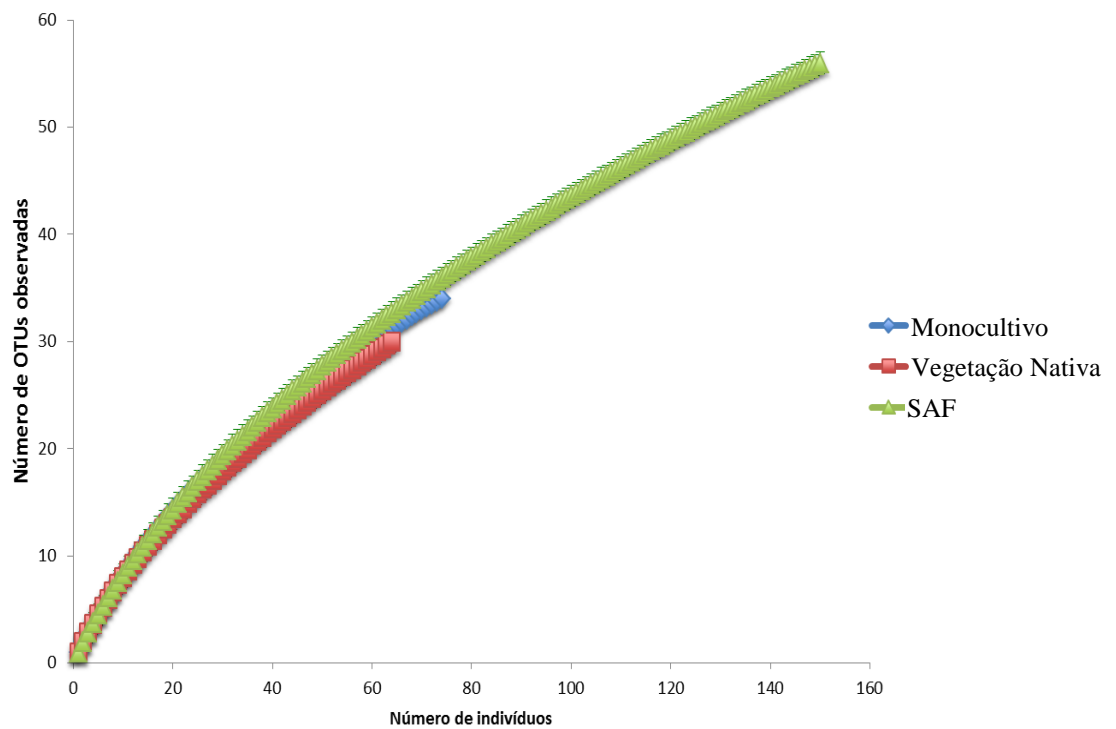


Figura 3 – Curva de rarefação para bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima OTUs (unidades taxonômicas operacionais)



## 4.2 Solubilização de Fosfatos de Cálcio e de Alumínio

Os resultados obtidos sobre a solubilização de fosfato de cálcio e de alumínio em meio sólido e meio líquido apresentou as seguintes discussões abaixo.

### 4.2.1 Solubilização em meio sólido

A solubilização de fosfatos em meio sólido tem sido utilizada por diversos autores para a seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal (HARA; OLIVEIRA, 2004, 2005; MARRA et al., 2011, 2012; NAUTIYAL, 1999; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014; SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2012; SILVA FILHO; NARLOCH; SCARF, 2002; SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

Dos 100 isolados avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, observou-se que 69 (69%) apresentaram esta característica. Entre as estirpes tipo e de referência, quatro apresentaram esta característica, BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*), BR11340 (*Burkholderia* sp.), BR11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*) (Figura 4) e ERR 532 (*Bacillus* sp.). A bactéria ERR 719 foi superior estatisticamente às demais bactérias, seguidas pelas bactérias ERR 587, ERR 692, ERR 779 e ERR 694. Quanto à classificação segundo o índice de solubilização (IS), duas bactérias ERR 719 (Figura 4) e ERR 587 apresentaram alto I.S (> 4), quatro isolados apresentaram médio I.S (3-4) e os restante dos isolados e estirpes tipo de referência apresentaram baixo I.S (até 2) (Tabela 7).

Vários estudos (BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012; FANKEM, et al., 2008; MARRA et al., 2011, 2012; PÉREZ et al., 2007;) evidenciam que a capacidade dos isolados de bactérias do solo solubilizarem o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos. Os principais ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio são o ácido cítrico, oxálico, glucônico, láctico e málico (GUPPY et al., 2005).

Silva et al. (2011a), estudando a ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio e alumínio nas raízes de plantas de pequenas propriedades rurais, presenciaram bactérias solubilizadoras em raízes de várias espécies de plantas arbóreas de importância agrícola em três áreas rurais. Onde das 6040 amostras de raízes analisadas quanto à ocorrência de bactérias solubilizadoras, 294 (6,73%) apresentaram atividade positiva quanto à solubilização de fosfato de cálcio e/ou alumínio. Essas amostras de raízes foram coletadas de áreas de sistemas distintos e mostram uma diversidade com relação à ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfatos

em diferentes espécies de plantas e condições de solos. No entanto, para uma das propriedades não foi evidenciada a presença de solubilizadores de fosfatos de alumínio com a formação do halo característico.

Tabela 7 – Índice de solubilização (I.S) de fosfato de cálcio das bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e referência

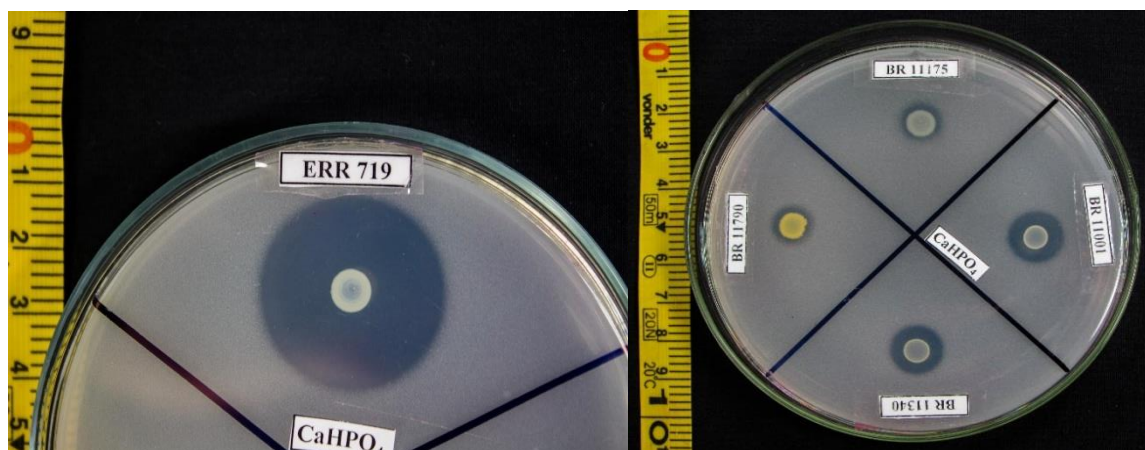
Isolados	I.S*	Classe**	Isolados	I.S	Classe	Isolados	I.S	Classe
ERR 719	5,73 a	Alta	ERR 792	2,01 e	Baixa	ERR 865	1,60 f	Baixa
ERR 587	4,20 b	Alta	ERR 602	2,00 e	Baixa	ERR 741	1,50 g	Baixa
ERR 692	3,73 b	Média	ERR 684	1,99 e	Baixa	ERR 763	1,50 g	Baixa
ERR 779	3,72 b	Média	ERR 711	1,97 e	Baixa	ERR 838	1,48 g	Baixa
ERR 694	3,68 b	Média	ERR 739	1,97 e	Baixa	ERR 612	1,44 g	Baixa
ERR 652	3,33 c	Média	ERR 753	1,95 e	Baixa	ERR 800	1,44 g	Baixa
ERR 594	2,90 c	Baixa	ERR 669	1,93 e	Baixa	ERR 771	1,42 g	Baixa
ERR 676	2,87 c	Baixa	ERR 604	1,93 e	Baixa	ERR 797	1,41 g	Baixa
ERR 654	2,77 d	Baixa	ERR 651	1,92 e	Baixa	ERR 830	1,41 g	Baixa
ERR 532	2,62 d	Baixa	ERR 708	1,90 e	Baixa	ERR 761	1,41 g	Baixa
ERR 596	2,62 d	Baixa	ERR 723	1,90 e	Baixa	ERR 689	1,36 g	Baixa
ERR 733	2,62 d	Baixa	ERR 859	1,88 e	Baixa	ERR 833	1,35 g	Baixa
ERR 589	2,59 d	Baixa	ERR 680	1,86 e	Baixa	ERR 640	1,35 g	Baixa
ERR 712	2,57 d	Baixa	ERR 821	1,85 e	Baixa	ERR 750	1,32 g	Baixa
ERR 720	2,46 d	Baixa	ERR 678	1,83 f	Baixa	ERR 698	1,30 g	Baixa
BR 11001	2,44 d	Baixa	ERR 616	1,82 f	Baixa	ERR 807	1,28 g	Baixa
ERR 626	2,40 d	Baixa	ERR 858	1,80 f	Baixa	BR 11790	1,27 g	Baixa
ERR 752	2,40 d	Baixa	ERR 611	1,79 f	Baixa	ERR 575	1,16 g	Baixa
ERR 745	2,37 d	Baixa	ERR 710	1,78 f	Baixa	ERR 754	1,15 g	Baixa
BR 11340	2,34 d	Baixa	ERR 822	1,75 f	Baixa	ERR 673	1,13 g	Baixa
ERR 765	2,16 e	Baixa	ERR 644	1,74 f	Baixa	ERR 870	1,09 g	Baixa
ERR 795	2,15 e	Baixa	ERR 849	1,72 f	Baixa			
ERR 803	2,14 e	Baixa	ERR 828	1,71 f	Baixa			
ERR 721	2,08 e	Baixa	ERR 703	1,71 f	Baixa			
ERR 677	2,05 e	Baixa	ERR 584	1,70 f	Baixa			
ERR 827	2,03 e	Baixa	ERR 815	1,61 f	Baixa			

Legenda: I.S = Ø HALO (mm) / Ø COLÔNIA (mm). \*\*Classe: baixa (I.S ≤ 2,99), média (I.S 3 a 4) e alta (I.S >4). Coeficiente de variação (%): 15,35%

A capacidade de solubilizar fosfatos de alumínio é de maior interesse para solos tropicais, especificamente para os solos de Roraima, que são caracteristicamente solos de baixa fertilidade natural e com a presença de alumínio (VALE JUNIOR; LEITÃO SOUSA, 2005). Quanto a solubilização de fosfato de alumínio, diferentemente do encontrado em outros trabalhos (HARA; OLIVEIRA, 2005; MARRA et al., 2011, 2012; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014) nenhuma bactéria e nem as estirpes tipo e de referência apresentaram formação de halo ao redor da colônia. Isto pode ter ocorrido devido às diferenças nos meios utilizados e na composição química diferente da fonte de fosfato de alumínio. Alguns trabalhos também têm relatado a

ausência de formação de halo de solubilização em meios contendo fosfato de alumínio (PÉREZ et al., 2007; SILVA et al., 2011a).

Figura 4 – Halo de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  em meio NBRIP modificado; A) isolado ERR 719 oriundo do sistema SAF; B) estirpes tipo e de referência BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*), BR11340 (*Burkholderia* sp.), BR11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*) e BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*)



A solubilização em meio sólido com a formação de halo tem sido amplamente utilizada para selecionar bactérias solubilizadoras de fosfatos. Nestes meios, bactérias com potencial de solubilização crescem em um meio sólido rico em nutrientes e com uma única fonte de P insolúvel. Uma vez que uma colônia está em crescimento, o processo de solubilização produz um halo, em que a intensidade da solubilização é proporcional ao tamanho do halo (NAUTIYAL, 1999). Entretanto a solubilização em meio sólido utilizando fosfatos, é relativamente fraca e pouco confiável como um fator de seleção universal para isolar bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro*, devido alguns desses elementos utilizados apresentarem certa solubilidade em água, como o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  que tem sido amplamente utilizado (BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012). Segundos Bashan, Kamnev e De-Bashan (2012), muitas vezes, bactérias solubilizadoras, podem estar crescendo nesses meios sem produzir um halo visível, mesmo depois de várias transferências para o mesmo meio. Isto significa, que bactérias podem apresentar outros mecanismos de solubilização que não formam um halo visível (BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012; FANKEM, et al., 2008; ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1995). Assim a formação de halo, como um único marcador para solubilizadores, não deve ser utilizada como único teste para solubilizadores, sendo necessária a realização de testes paralelos em meios líquidos para uma análise precisa da quantificação do fosforo liberado.

#### 4.2.2 Solubilização em meio líquido

Quanto à solubilização em meio líquido, para o fosfato de cálcio não foi possível quantificar o fósforo disponível, pois foi verificado uma solubilidade do fosfato de cálcio no meio líquido sem a inoculação de bactérias. Vários trabalhos têm utilizado a determinação de P em meio líquido por bactérias (ESTRADA et al., 2012; FANKEM, et al., 2008; ILLMER; BARBATO; SCHINER, 1995; MARRA et al., 2011, 2012). Em trabalhos realizados por Marra et al. (2011, 2012) foi quantificado o fósforo liberado em meio líquido oriundos de fosfato de cálcio e alumínio, por bactérias isoladas de solos tropicais. Estes autores obtiveram resultados positivos com bactérias solubilizadoras de fosfato de Ca e Al. O meio utilizado pelos autores foi o GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) no qual contém em sua composição extrato de levedura, que contém fósforo e, portanto, se torna inseguro dizer se o P contido no meio na realização da leitura é de origem do extrato de levedura ou da solubilização de fosfato pela bactéria. A fonte de fosfato utilizada pelos autores foi o fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) através da mistura de duas soluções ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{CaCl}_2$ ) que são descritas por Ketznelson e Bose (1959). Após vários testes, foi verificado que o  $\text{CaHPO}_4$  é solúvel nos meios de cultivo após quatro dias de incubação e que também na tentativa de se obter a mesma fonte de P por meio desta mistura de soluções, foi observado que essa fonte de fosfato ( $\text{CaHPO}_4$ ) apresentava uma certa solubilidade em água. Embora a solubilidade do fosfato de cálcio seja considerada baixa,  $0,2 \text{ gL}^{-1}$  (MORITA; ASSUMPCÃO, 1983), impossibilitou a realização dessa análise.

Para a quantificação da solubilização de fosfato de alumínio, foi verificado que o  $\text{AlPO}_4$  não é solúvel no meio de cultivo, mesmo sob agitação durante 96 horas. Assim, das 100 bactérias avaliadas em meio líquido, 90% foram capazes de solubilizar fosfato de alumínio. No entanto, esta capacidade de solubilização foi variável entre as bactérias. Destas, as que mais se destacaram e foram estatisticamente superiores são ERR 587 ( $1,69 \text{ mg L}^{-1}$ ), ERR 589 ( $1,54 \text{ mg L}^{-1}$ ), ERR 612 ( $1,49 \text{ mg L}^{-1}$ ), ERR 733 ( $1,38 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ERR 719 ( $1,23 \text{ mg L}^{-1}$ ), disponibilizando 14,1%, 12,8%, 12,4%, 11,5% e 10,2% do fósforo adicionado ao meio, respectivamente. Entre as estirpes tipo e de referência apresentaram esta característica, BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*), BR 11340 (*Burkholderia* sp.), BR 11790<sup>T</sup> (*Herbaspirillum frisingense*), BR 11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*) e ERR 532 (*Bacillus* sp.), mas com baixa solubilização comparada as bactérias que se destacaram. Das bactérias que se destacaram em meio sólido de fosfato de cálcio, com alto índice de solubilização (ERR 719, ERR 587, ERR 692, ERR 779, ERR 694 e ERR 652), duas se destacaram também na solubilização de fosfato de alumínio em meio líquido a ERR 587 ( $1,69 \text{ mg L}^{-1}$ ) e a ERR 719 ( $1,23 \text{ mg L}^{-1}$ ), portanto, essas bactérias possuem maior potencial

de atuarem de fato como solubilizadoras de fosfato, visto que para seleção de possíveis solubilizadores, é indicado o teste com duas ou três fontes de fósforo (BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012).

Correlacionando-se o pH com a solubilização de fosfato de alumínio (Figura 5), verificou-se que onde houve maior solubilização houve redução do pH (Tabela 8). Para a solubilização de fosfato de cálcio é conhecido na literatura a diminuição do pH do meio através da produção de ácidos orgânicos (PÉREZ et al., 2007; MARRA et al., 2011, 2012; BASHAN; KAMNEV; DE-BASHAN, 2012; FANKEM, et al., 2008). Em trabalho realizado por Illmer, Barbato e Schiner (1995), foi verificado a redução do pH do meio por bactérias e um fungo capazes de solubilizar fosfato de alumínio. Estes autores verificaram que o fungo *Aspergillus niger* produziu ácidos orgânicos (citrato, oxalato e glucônico), já para as bactérias não foi detectada a produção de nenhum ácido orgânico, mas houve redução do pH. Marra et al. (2012), também não detectou a produção de ácidos orgânicos por bactérias solubilizadoras de fosfato de alumínio. Portanto, além da produção de ácidos orgânicos, outros mecanismos devem estar envolvidos na solubilização de fosfato de alumínio. Segundo Bashan, Kamnev e De-Bashan (2012), para o alumínio, a complexação do metal é pela produção de um agente complexante pelo micro-organismo. Este agente atuaria como um quelante do alumínio, solubilizando fosfato não por um processo de dissolução, mas sim por uma substituição, sendo que este tipo de solubilização não forma halos em meios sólidos.

Figura 5 – Variação de pH em função da solubilização de fosfato de alumínio por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e de referência

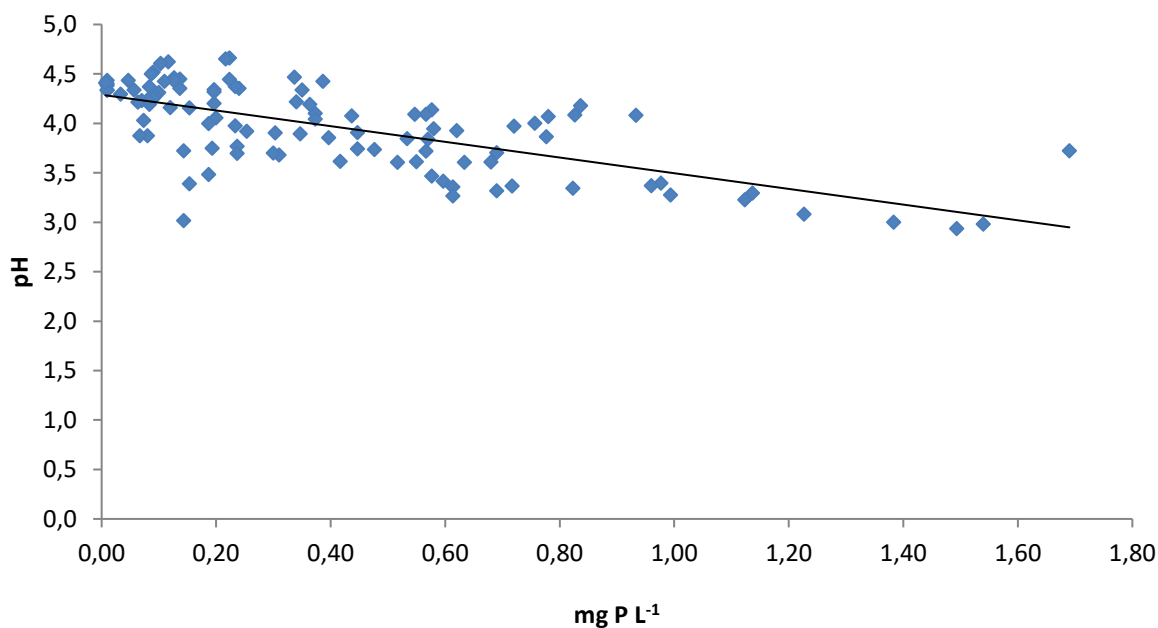




Tabela 8 – Solubilização de fosfato de alumínio em meio NBRIP líquido por bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima e estirpes tipo e de referência

Bactérias	P solúvel mg L <sup>-1</sup>	pH	% de P Solúvel	Bactérias	P solúvel mg L <sup>-1</sup>	pH	% de P Solúvel	Bactérias	P solúvel mg L <sup>-1</sup>	pH	% de P Solúvel	Bactérias	P solúvel mg L <sup>-1</sup>	pH	% de P Solúvel
ERR 587	1,69 a	3,7	14,1%	ERR 652	0,60 d	3,4	5,0%	ERR 689	0,30 e	3,9	2,5%	ERR 651	0,12 f	4,2	1,0%
ERR 589	1,54 a	3,0	12,8%	ERR 711	0,58 d	3,9	4,8%	ERR 805	0,30 e	3,7	2,5%	ERR 870	0,12 f	4,6	1,0%
ERR 612	1,49 a	2,9	12,4%	ERR 720	0,58 d	4,1	4,8%	ERR 677	0,25 e	3,9	2,1%	ERR 795	0,11 f	4,4	0,9%
ERR 733	1,38 a	3,0	11,5%	ERR 838	0,58 d	3,5	4,8%	ERR 828	0,24 e	4,4	2,0%	ERR 761	0,10 f	4,6	0,9%
ERR 719	1,23 b	3,1	10,2%	ERR 739	0,57 d	3,8	4,8%	ERR 640	0,24 e	3,8	2,0%	ERR 656	0,10 f	4,3	0,8%
ERR 584	1,14 b	3,3	9,5%	ERR 642	0,57 d	4,1	4,7%	ERR 698	0,24 e	3,7	2,0%	ERR 750	0,09 f	4,3	0,8%
ERR 712	1,12 b	3,2	9,4%	ERR 771	0,57 d	3,7	4,7%	ERR 779	0,23 e	4,0	1,9%	ERR 807	0,09 f	4,5	0,8%
ERR 723	0,99 c	3,3	8,3%	ERR 815	0,55 d	3,6	4,6%	ERR 799	0,23 e	4,4	1,9%	ERR 859	0,09 f	4,3	0,8%
ERR 833	0,98 c	3,4	8,1%	ERR 785	0,55 d	4,1	4,6%	ERR 809	0,22 e	4,7	1,9%	ERR 770	0,09 f	4,5	0,7%
ERR 727	0,96 c	3,4	8,0%	ERR 684	0,53 d	3,8	4,4%	ERR 813	0,22 e	4,4	1,9%	ERR 665	0,08 f	4,2	0,7%
ERR 773	0,93 c	4,1	7,8%	ERR 667	0,52 d	3,6	4,3%	ERR 738	0,22 e	4,7	1,8%	ERR 737	0,08 f	4,4	0,7%
ERR 753	0,84 c	4,2	7,0%	ERR 680	0,48 e	3,7	4,0%	ERR 800	0,20 f	4,1	1,7%	ERR 822	0,08 f	3,9	0,7%
ERR 765	0,83 c	4,1	6,9%	ERR 745	0,45 e	3,9	3,7%	ERR 706	0,20 f	4,3	1,6%	ERR 843	0,08 f	4,2	0,7%
ERR 827	0,82 c	3,3	6,9%	ERR 763	0,45 e	3,7	3,7%	ERR 772	0,20 f	4,2	1,6%	ERR 703	0,07 f	4,0	0,6%
ERR 721	0,78 c	4,1	6,5%	BR 11790	0,44 e	4,1	3,6%	ERR 858	0,20 f	4,3	1,6%	ERR 616	0,07 f	4,2	0,6%
ERR 694	0,78 c	3,9	6,5%	ERR 532	0,42 e	3,6	3,5%	BR 11001	0,19 f	3,8	1,6%	ERR 644	0,07 f	3,9	0,6%
ERR 752	0,76 c	4,0	6,3%	ERR 741	0,40 e	3,9	3,3%	ERR 657	0,19 f	3,5	1,6%	ERR 660	0,06 f	4,2	0,5%
ERR 678	0,72 d	4,0	6,0%	ERR 717	0,39 e	4,4	3,2%	ERR 744	0,19 f	4,0	1,6%	ERR 679	0,06 f	4,3	0,5%
ERR 594	0,72 d	3,4	6,0%	ERR 710	0,37 e	4,0	3,1%	ERR 692	0,15 f	3,4	1,3%	ERR 654	0,05 f	4,4	0,4%
ERR 602	0,69 d	3,3	5,8%	ERR 762	0,37 e	4,1	3,1%	ERR 830	0,15 f	4,2	1,3%	ERR 754	0,03 f	4,3	0,3%
ERR 821	0,69 d	3,7	5,8%	BR 11175	0,36 e	4,2	3,0%	ERR 575	0,14 f	3,7	1,2%	ERR 611	0,01 f	4,3	0,1%
ERR 708	0,68 d	3,6	5,7%	ERR 819	0,35 e	4,3	2,9%	ERR 673	0,14 f	3,0	1,2%	ERR 691	0,01 f	4,4	0,1%
BR 11340	0,63 d	3,6	5,3%	ERR 792	0,35 e	3,9	2,9%	ERR 782	0,14 f	4,5	1,1%	ERR 701	0,01 f	4,4	0,1%
ERR 604	0,62 d	3,9	5,2%	ERR 794	0,34 e	4,2	2,8%	ERR 849	0,14 f	4,4	1,1%	ERR 705	0,01 f	4,3	0,1%
ERR 596	0,61 d	3,4	5,1%	ERR 797	0,34 e	4,5	2,8%	ERR 803	0,13 f	4,5	1,1%	ERR 873	0,01 f	4,4	0,1%
ERR 626	0,61 d	3,3	5,1%	ERR 669	0,31 e	3,7	2,6%	ERR 865	0,13 f	4,4	1,1%	ERR 676	0,01 f	4,4	0,1%

Legenda: Coeficiente de variação (%): 35.93

Considerando que existem poucas informações sobre bactérias solubilizadoras de fosfato em Roraima, é preciso intensificar os estudos com essas bactérias na região para produção de inoculantes em cultivos agrícolas, para que possam contribuir efetivamente para um melhor aproveitamento do P no solo e de promover o crescimento de plantas como a castanheira-do-Brasil.

#### 4.3 Produção de Ácido Indol Acético

Das 100 bactérias avaliadas quanto a síntese de ácido indol acético (AIA) com adição de triptofano ao meio de cultivo, 61 produziram este fitormônio. As bactérias que mais se destacaram e foram estatisticamente superiores na produção de AIA foram a ERR 596 (184,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 626 (104,61  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 611 (98,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ERR 723 (92,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A BR 11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropediacae*) também se destacou, produzindo 104,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, sendo superior a BR 11001 (*Azospirillum brasilense*) que produziu 10,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 9).

Tabela 9 – Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYG'S com a presença de triptofano (100 mg L<sup>-1</sup>)

Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Estirpes	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
ERR 596	184,47 a	ERR 710	45,83 d	ERR 575	21,21 e	BR 11001	10,36 e
BR 11175 <sup>T</sup>	104,67 b	ERR 644	45,81 d	ERR 694	21,20 e	ERR 660	9,78 e
ERR 626	104,61 b	ERR 584	44,65 d	ERR 773	19,73 e	ERR 797	7,16 e
ERR 611	98,73 b	ERR 589	44,10 d	ERR 705	19,26 e	ERR 799	6,80 e
ERR 723	92,43 b	ERR 717	42,11 d	ERR 612	18,85 e	ERR 654	5,61 e
ERR 692	82,46 c	ERR 657	40,93 d	ERR 678	18,69 e	ERR 665	5,44 e
ERR 680	74,55 c	ERR 770	40,06 d	ERR 587	16,93 e	ERR 785	4,05 e
ERR 640	73,90 c	ERR 782	38,70 d	ERR 676	16,74 e	ERR 800	3,55 e
ERR 703	66,05 c	ERR 761	38,61 d	ERR 745	16,54 e	ERR 651	3,44 e
ERR 604	61,68 c	ERR 689	38,60 d	ERR 739	15,88 e	ERR 795	3,10 e
ERR 719	60,08 c	ERR 859	34,64 d	ERR 762	14,90 e	ERR 691	3,01 e
ERR 727	53,13 d	ERR 827	32,41 d	ERR 822	14,47 e	ERR 709	2,48 e
ERR 706	52,31 d	ERR 721	32,09 d	ERR 753	13,13 e	ERR 701	2,40 e
ERR 752	51,63 d	ERR 708	29,59 d	ERR 821	12,24 e	ERR 679	2,09 e
ERR 677	46,99 d	ERR 772	26,00 e	ERR 594	11,94 e	ERR 667	1,53 e
ERR 779	46,42 d	ERR 750	22,64 e	ERR 794	11,34 e		

Legenda: Coeficiente de variação (%): 49.19

Quanto a síntese de AIA em meio sem adição de triptofano (Tabela 10), as bactérias que se destacaram foram a ERR 712 (38,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 744 (33,77  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 779 (31,61  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 710 (30,96  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ERR 656 (30,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ERR 626 (30,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Das 100 bactérias avaliadas, 35 sintetizaram AIA nos dois meios (Tabela 11). As bactérias que apresentaram maiores aumento na produção de AIA foram ERR 657, BR 11175<sup>T</sup>, ERR 676, ERR 692, ERR 677, ERR 644 e ERR 717, nas quais essas, tiveram aumento na produção de AIA quando acrescido triptofano em 39,94; 94,71; 14,67; 69,88; 39,54; 38,31 e 33,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente.

Tabela 10 – Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYG'S sem a presença de triptofano (100  $\text{mg L}^{-1}$ )

Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bactérias	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bactéria	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
ERR 712	38,28 a	ERR 739	15,43 c	ERR 822	10,80 c	ERR 602	3,47 d
ERR 744	33,77 a	ERR 721	15,35 c	ERR 612	10,76 c	ERR 651	3,06 d
ERR 779	31,61 a	ERR 604	15,18 c	ERR 589	10,23 c	ERR 793	2,73 d
ERR 710	30,96 a	ERR 673	14,85 c	BR 11175 <sup>T</sup>	9,96 c	ERR 794	2,43 d
ERR 656	30,81 a	ERR 763	14,85 c	BR 11001	9,38 c	ERR 676	2,07 d
ERR 626	30,24 a	ERR 587	14,21 c	ERR 717	8,48 c	ERR 709	1,82 d
ERR 827	28,32 b	ERR 684	14,12 c	ERR 644	7,50 d	ERR 691	1,46 d
ERR 652	26,10 b	ERR 752	13,70 c	ERR 677	7,45 d	ERR 701	1,29 d
ERR 762	21,37 b	ERR 705	13,17 c	ERR 694	5,69 d	ERR 657	0,99 d
ERR 584	17,30 c	ERR 692	12,58 c	ERR 654	4,31 d	ERR 667	0,52 d
ERR 680	16,60 c	ERR 727	12,16 c	ERR 660	4,11 d		
ERR 772	15,90 c	ERR 594	10,87 c	ERR 665	3,78 d		

Coefficiente de variação (%): 32.36

Tabela 11 – Produção de ácido indol acético por bactérias isoladas de castanheira-do-Brasil e estirpes tipo e de referência em meio DYGs com e sem triptofano

Bactérias	Diferença entre a produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bactérias	Diferença entre a produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bactérias	Diferença entre a produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
ERR 657	39,94	ERR 694	15,51	ERR 665	1,66
BR 11175	94,71	ERR 626	74,37	ERR 762	6,47
ERR 676	14,67	ERR 667	1,01	ERR 709	0,66
ERR 692	69,88	ERR 584	27,35	ERR 822	3,67
ERR 677	39,54	ERR 660	5,67	ERR 654	1,30
ERR 644	38,31	ERR 721	16,74	ERR 587	2,72
ERR 717	33,63	ERR 691	1,55	ERR 827	4,09
ERR 794	8,91	ERR 701	1,11	ERR 651	0,38
ERR 680	57,95	ERR 612	8,09	BR 11001	0,98
ERR 727	40,97	ERR 772	10,10	ERR 594	1,07
ERR 589	33,87	ERR 710	14,87	ERR 739	0,45
ERR 604	46,50	ERR 779	14,81		
ERR 752	37,93	ERR 705	6,09		

As bactérias produzem AIA por várias vias de síntese. Triptofano é um precursor de AIA, pois sua adição em meios de cultura promove aumento dessa síntese, mas há vias independentes de triptofano. Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* são estudadas em razão de sua interação com gramíneas e por sintetizarem AIA por diferentes vias. No entanto, alguns autores sugerem que 90% do ácido indol acético sintetizado por este gênero é derivado de uma via independente da adição de triptofano ao meio de cultura, pois outros compostos podem ser metabolizados (ZAKHAROVA et al., 1999). Neste trabalho, para *A. brasilense* não houve diferenças significativas quanto ao AIA sintetizado com e sem triptofano para (Tabelas 9, 10 e 11). Oliveira-Longatti et al. (2014), em seus experimentos, também verificou que houve produção de AIA por isolados de rizóbios e de vida livre, mesmo quando não houve adição de triptofano ao meio de cultura, onde a produção de AIA variou de 0,32 a 42,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com triptofano e 0,23 a 12,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sem triptofano e o padrão positivo BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*) foi de 37,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com e 12,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sem a presença de triptofano. Neste estudo, a produção de AIA variou de 1,53 a 184,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio com triptofano e 0,52 a 38,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio sem triptofano e os padrões positivos BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*) e BR 11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropediacae*) foram de 10,36; 104,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com e 9,38; 9,96  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sem a presença de triptofano, respectivamente.

A produção de AIA variou significativamente entre as bactérias com e sem triptofano. Segundo Pedraza et al. (2004), a quantidade de AIA produzida por estirpes bacterianas depende da espécie que está em estudo. Afirma que as condições em que os micro-organismos são cultivados (presença ou ausência do triptofano para a síntese de AIA, oxigenação, pH, e a fase de crescimento em que se encontra a bactéria), podem influenciar na produção. O tipo de ambiente e sua vegetação também podem influenciar na produção desse hormônio vegetal, principalmente o ambiente rizosférico, onde o número de micro-organismos é muito maior do que em solos com poucas espécies vegetais, onde a concentração de nutrientes e a competição por colonização de nichos é intensa, podendo atuar na produção desse hormônio no competitivo ambiente rizosférico.

Estes resultados são de grande importância, pois esse é o primeiro relato da produção de hormônios vegetais por bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil. Podendo ter uma influência positiva para o crescimento de mudas de castanheira-do-Brasil, bem como outras plantas. O AIA apresenta um papel fundamental no enraizamento e crescimento apical dos vegetais através da divisão e diferenciação das células recém-formadas nos meristemas. Porém, o efeito que este hormônio pode exercer na planta depende de sua concentração disponível às

células vegetais. Em concentrações muito altas AIA pode promover um efeito deletério e inibir o crescimento vegetal (BISWAS et al., 2000).

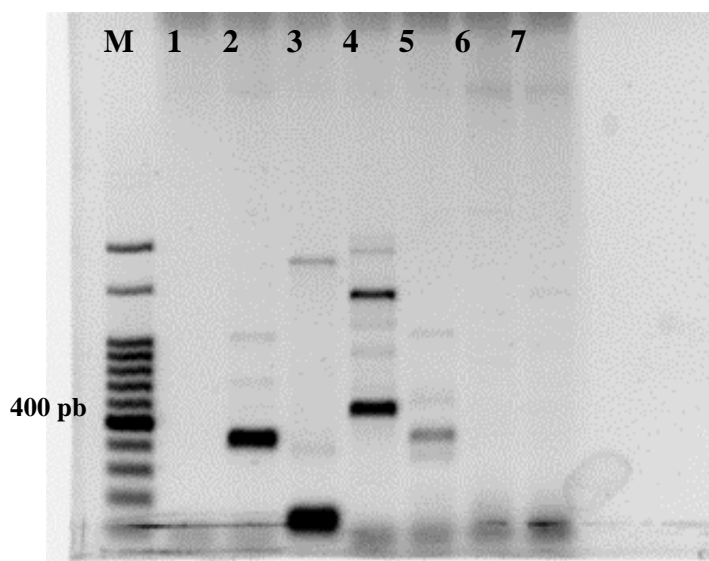
A interação planta-bactéria envolve diversos mecanismos associados tanto à planta quanto aos micro-organismos. Sendo assim, há necessidade de estudos mais aprofundados e a utilização desses isolados em testes quanto a sua eficiência em mudas, visando o aumento na promoção de crescimento favorecendo a produtividade agrícola ou reflorestamento.

#### 4.4 Amplificação do Gene *nifH*

Das 100 bactérias submetidas à amplificação da região do gene *nifH* apenas 18 apresentaram bandas específica de amplificação pelos iniciadores 19F e 407R correspondente do gene *nifH* no tamanho de aproximadamente 400pb (Figura 6). Algumas bactérias apresentaram bandas com tamanhos não correspondentes ao gene, com amplificações de regiões inespecíficas, inclusive algumas das que apresentaram bandas específicas do gene *nifH*, sendo assim necessária a realização de testes com outros iniciadores

Das 18 estirpes que apresentaram a presença do gene *nifH*, oito foram isoladas em meio seletivo para *Azospirillum* sp. (NFB e LGI), e 10 isoladas de meio não seletivo DYG'S (Tabela 12), podendo indicar a presença desses gêneros entre essa diversidade obtida.

Figura 6 – Produtos de amplificação da região do gene *nifH* de bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil



Legenda: M (marcador 100pb); 1 (branco); 2 (SEMIA 5079 *Bradyrhizobium japonicum*); 3 (BR 11790 *Herbaspirillum frisingense*); 4 (BR 11192 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*); 5 (ERR 657); 6 (ERR 587) e 7 (ERR 586).

Tabela 12 – Bactérias que apresentaram bandas específicas de amplificação pelos iniciadores 19F e 407R correspondente do gene *nifH* e seus respectivos meios de isolamento

Bactérias	Meio	Gene <i>nifH</i>	Bactérias	Meio	Gene <i>nifH</i>	Bactérias	Meio	Gene <i>nifH</i>	Bactérias	Meio	Gene <i>nifH</i>
ERR 575	JMV	-	ERR 676	DYG'S	-	ERR 727	DYG'S	-	ERR 795	DYG'S	-
ERR 584	JMV	-	ERR 677	DYG'S	-	ERR 733	DYG'S	-	ERR 797	DYG'S	-
ERR 587	JMV	-	ERR 678	DYG'S	-	ERR 737	DYG'S	-	ERR 799	DYG'S	-
ERR 589	JMV	-	ERR 679	DYG'S	+	ERR 738	DYG'S	-	ERR 800	DYG'S	-
ERR 594	JMV	-	ERR 680	DYG'S	-	ERR 739	DYG'S	-	ERR 803	DYG'S	-
ERR 596	LGI	-	ERR 684	DYG'S	+	ERR 741	DYG'S	-	ERR 805	DYG'S	-
ERR 602	LGI	+	ERR 689	DYG'S	-	ERR 744	DYG'S	-	ERR 807	DYG'S	-
ERR 604	LGI	+	ERR 691	DYG'S	-	ERR 745	DYG'S	-	ERR 809	DYG'S	-
ERR 611	LGI	+	ERR 692	DYG'S	-	ERR 750	DYG'S	-	ERR 813	DYG'S	-
ERR 612	LGI	+	ERR 694	DYG'S	-	ERR 752	DYG'S	-	ERR 815	DYG'S	+
ERR 616	LGI	-	ERR 698	DYG'S	-	ERR 753	DYG'S	-	ERR 819	DYG'S	+
ERR 626	LGI	-	ERR 701	DYG'S	-	ERR 754	DYG'S	-	ERR 821	DYG'S	+
ERR 640	LGI	+	ERR 703	DYG'S	-	ERR 761	DYG'S	-	ERR 822	DYG'S	-
ERR 642	LGI	-	ERR 705	DYG'S	-	ERR 762	DYG'S	+	ERR 827	NFB	+
ERR 644	LGI	-	ERR 706	DYG'S	-	ERR 763	DYG'S	-	ERR 828	NFB	-
ERR 651	DYG'S	-	ERR 708	DYG'S	-	ERR 765	DYG'S	-	ERR 830	NFB	+
ERR 652	DYG'S	-	ERR 709	DYG'S	-	ERR 770	DYG'S	-	ERR 833	NFB	-
ERR 654	DYG'S	-	ERR 710	DYG'S	-	ERR 771	DYG'S	-	ERR 838	NFB	+
ERR 656	DYG'S	-	ERR 711	DYG'S	+	ERR 772	DYG'S	-	ERR 843	NFB	-
ERR 657	DYG'S	-	ERR 712	DYG'S	-	ERR 773	DYG'S	+	ERR 849	NFB	-
ERR 660	DYG'S	-	ERR 717	DYG'S	-	ERR 779	DYG'S	-	ERR 858	NFB	-
ERR 665	DYG'S	-	ERR 719	DYG'S	-	ERR 782	DYG'S	-	ERR 859	NFB	-
ERR 667	DYG'S	+	ERR 720	DYG'S	-	ERR 785	DYG'S	+	ERR 865	NFB	-
ERR 669	DYG'S	-	ERR 721	DYG'S	-	ERR 792	DYG'S	-	ERR 870	NFB	-
ERR 673	DYG'S	-	ERR 723	DYG'S	-	ERR 794	DYG'S	-	ERR 873	NFB	-

Legenda: Sinal positivo (+) e sinal negativo (-) indicam presença ou ausência do gene *nifH*, respectivamente.

#### 4.5 Bactérias com Potencial em Promover o Crescimento Vegetal

Entre as 100 bactérias avaliadas, 24 foram selecionadas como as mais eficientes em realizar processos relacionados ao potencial para o crescimento vegetal (solubilização de P-Ca e P-Al, produção de AIA com e sem triptofano e possuem o gene *nifH*) sendo apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil com maior potencial para a promoção do crescimento vegetal

Bactérias	Origem	Tipo de Promoção	Bactérias	Origem	Tipo de Promoção
ERR 584	SAF	Solubilização de fosfato de Al	ERR 692	Monocultivo	Solubilização de fosfato de Ca e AIA
ERR 587	Nativa	Solubilização de fosfato de Ca e Al	ERR 694	Monocultivo	Solubilização de fosfato de Ca
ERR 589	Monocultivo	Solubilização de fosfato de Al	ERR 703	Monocultivo	AIA
ERR 596	Monocultivo	AIA	ERR 710	SAF	AIA
ERR 604	SAF	AIA e FBN	ERR 712	SAF	Solubilização de fosfato de Al e AIA
ERR 611	SAF	AIA e FBN	ERR 719	SAF	Solubilização de fosfato de Ca, Al e AIA
ERR 612	Nativa	Solubilização de fosfato de Al e FBN	ERR 723	SAF	AIA
ERR 626	SAF	AIA	ERR 733	SAF	Solubilização de fosfato de Al
ERR 640	SAF	AIA e FBN	ERR 744	SAF	AIA
ERR 652	Monocultivo	Solubilização de fosfato de Ca	ERR 762	SAF	AIA e FBN
ERR 656	Monocultivo	AIA	ERR 779	Nativa	Solubilização de fosfato de Ca e AIA
ERR 680	Monocultivo	AIA	ERR 827	SAF	AIA e FBN

Estas bactérias são oriundas do sistema agroflorestal, mata nativa e monocultivo. Futuros testes serão realizados de inoculação para a produção de mudas de castanheira-do-Brasil para avaliar e testar sua capacidade de promoção de crescimento.

#### 4.6 Sequenciamento Parcial do Gene 16S rRNA

Para construção das relações filogenéticas, as sequências consenso de nucleotídeos obtidas neste estudo foram comparadas com as sequências do banco de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta Blast. Essa análise resultou na distribuição das sequências em 18 gêneros. Foram detectadas sequências de gêneros pertencentes às classes  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria. De acordo com as análises comparativas, foram encontradas diversas sequências similares e até mesmo idênticas às espécies bacterianas já identificadas (Quadro 1). Dentre as sequências certas bactérias não obtiveram um número suficiente de bases

sequenciadas para a comparação no Blsat, como ERR 612, ERR 642, ERR 698 e ERR 712 (>500 pb) e ERR 611, ERR 616, ERR 669 e ERR 815 (<200 pb) e por isso não foram incluídas na formação da árvore filogenética.

Houve uma predominância de gêneros bacterianos dentro da filiação taxonômica do filo das proteobacterias, sendo a maioria pertencente à classe gama ( $\gamma$ ). As estirpes se assemelharam aos gêneros pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, com elevada similaridade, como o genero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Cedecea*, *Citrobacter* e *Pantoea*. Junto à família *Pseudomonaceae* também foi encontrado o gênero *Pseudomonas*. Na subdivisão beta ( $\beta$ ) houve a presença dos gêneros *Achromobacter*, *Burkholderia* e *Delftia* entre as estirpes e na subdivisão alfa ( $\alpha$ ) houve alta similaridade entre as estirpes com os gêneros *Agrobacterium* e *Ochrobactrum*. Dentro da classe Bacilli houve a presença dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium* e pela classe Actinobacteria houve gêneros pertencentes a família *Microbacteriaceae* como *Microbacterium*.

Quadro 1 – Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das bactérias e análises de comparação no BLASTn (National Center for Biotechnology information website) oriundas de diferentes sistemas

Bactérias	Origem	Meio	Identificação taxonômica considerada	Nº Genbank	Similaridade
ERR 575	SAF	JMV	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> <i>P. illinoisensis</i>	LK391532 KR856190	100%
ERR 584	SAF	JMV	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	AJ440714	99%
ERR 587	Nativa	JMV	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> <i>B. seminalis</i> <i>B. anthrina</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. cenocepacia</i>	EU982858 KP216609 KP216607 KM486560 KF826288	100%
ERR 589	Monocultivo	JMV	<i>Burkholderia difusa</i> <i>B. pyrrocinia</i>	KF475808 AJ440714	99%
ERR 594	Monocultivo	JMV	<i>Burkholderia zhejiangensis</i> <i>B. simbiotnt of cavaleries</i>	HE983368 AB665362	100%
ERR 596	Monocultivo	LGI	<i>Pantoea ananatis</i> <i>P. anthophila</i> <i>P. agglomerans</i>	KC153128 JN644500 FJ788420	99%
ERR 602	SAF	LGI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP011989	99%
ERR 604	SAF	LGI	<i>Kosakonia</i> sp. <i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. oryzae</i>	KM253162 KF912873 HQ706110	100%
ERR 612	Nativa	LGI	<i>Burkholderia</i> sp.	DQ977698	82%
ERR 626	SAF	LGI	<i>Klebsiella variicola</i> <i>K. pneumoniae</i>	KT156813 KM275682	99%

Continua...



Continua...

ERR 640	SAF	LGI	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> <i>S. maltophilia</i>	JQ660216 EU239210	100%
ERR 642	Nativa	LGI	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EU239211	79%
ERR 644	Nativa	LGI	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> <i>C. flaccumfaciens</i> <i>C. citreum</i> <i>Microbacteriaceae bacterium</i> <i>Bacillus subtilis</i>	KM019832 HE716906 FN178360 JN872518 EU373393	100%
ERR 651	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 KT238987	100%
ERR 652	Monocultivo	DYG'S	<i>Enterobacter asburiae</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. ludwigii</i> <i>Citrobacter murliniae</i>	CP011591 KM875595 KC122712 KF831022	100%
ERR 654	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i>	KP892558 KP686225 KP407115 KP342195 KP986945	100%
ERR 656	Monocultivo	DYG'S	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> <i>L. fusiformis</i>	KJ162140 FJ174622	99%
ERR 657	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycoides</i> <i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. anthracis</i>	KR078401 KP745594 CP010106 KP279991 KJ127234 KM817261	99%
ERR 660	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	KP788033 KT238987 CP010106 KP172548	100%
ERR 665	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 CP010106 KJ567095	99%
ERR 667	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 KP892558 KP745594 KT238987	100%
ERR 673	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 CP010106 KJ567095	100%
ERR 676	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i>	KT238996	100%
ERR 677	Monocultivo	DYG'S	<i>Paenibacillus favisporus</i>	KC713916	99%
ERR 678	Monocultivo	DYG'S	<i>Paenibacillus favisporus</i>	KC713916	99%
ERR 679	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i>	KP788033 KP745594 CP010106 KP342195 KP986945	99%
ERR 680	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus pumilus</i>	KM596792	99%
ERR 684	Monocultivo	DYG'S	<i>Paenibacillus cineris</i>	KF150476	99%

Continua...

Continua...

ERR 689	Monocultivo	DYG'S	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>A. aegrifaciens</i>	KP282760 KP241015	99%
ERR 691	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. cereus</i>	KJ496384 JN411471	99%
ERR 692	Monocultivo	DYG'S	<i>Enterobacter cloacae</i>	KT156816	99%
ERR 694	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus megaterium</i>	HF584835	99%
ERR 698	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus sp.</i>	JX941518	88%
ERR 701	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. cereus</i>	KJ496384 JN411471	99%
ERR 703	Monocultivo	DYG'S	<i>Lysinibacillus sp.</i> <i>L. sphaericus</i>	KP670273 KF527213	100% 99%
ERR 705	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 CP010106 KJ567095	100%
ERR 706	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. salmavava</i>	KR082239 KT238987 KP306751 KM051837	100%
ERR 708	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus safensis</i> <i>B. pumilis</i>	KP717556 KT307977	100%
ERR 709	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	KP788033 CP010106 KJ567095	100%
ERR 710	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	HQ455005	99%
ERR 711	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	HQ455005	99%
ERR 712	SAF	DYG'S	<i>Serratia marcescens</i>	GU213910	91%
ERR 717	SAF	DYG'S	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EU982902	99%
ERR 719	SAF	DYG'S	<i>Serratia marcescens</i> <i>S. nematodiphila</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KR778806 KJ672378 HQ377326	99%
ERR 720	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ652623	100%
ERR 721	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ652623	100%
ERR 723	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ975115	100%
ERR 727	SAF	DYG'S	<i>Enterobacter hormaechei</i> <i>E. cloacae</i> <i>Cedecea davisae</i>	JQ660217 GU459208 KT156819	99%
ERR 733	SAF	DYG'S	<i>Microbacterium thalassium</i>	KF973240	99%
ERR 737	SAF	DYG'S	<i>Achromobacter denitrificans</i>	KM268799	99%
ERR 738	SAF	DYG'S	<i>Achromobacter denitrificans</i>	KM268799	99%
ERR 739	SAF	DYG'S	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> <i>O. anthropi</i> <i>Stenotrophomonas maltophilas</i>	KP771804 JX455164 KP326563	100%
ERR 741	SAF	DYG'S	<i>Bacillus safensis</i>	KC519415	99%
ERR 744	SAF	DYG'S	Uncultured bacterium clone <i>U. achromobacter sp. clone</i>	HM343683 GQ416595	99%

Continua...

Continua...

ERR 745	SAF	DYG'S	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> <i>O. anthropi</i> <i>Stenotrophomonas maltophilas</i>	KP771804 JX455164 KJ784477	100%
ERR 750	SAF	DYG'S	Uncultured bacterium clone <i>Stenotrophomonas maltophilas</i>	HM558720 KF724885	99%
ERR 752	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ652623	100%
ERR 753	SAF	DYG'S	<i>Microbacterium oxydans</i>	KC967221	99%
ERR 754	SAF	DYG'S	Uncultured organism clone	HQ750246	98%
ERR 761	SAF	DYG'S	Uncultured bacterium clone <i>Stenotrophomonas maltophilas</i>	EF089407 KR006911	99%
ERR 762	SAF	DYG'S	<i>Delftia acidovorans</i> <i>D. tsuruhatensis</i> <i>D. lacustris</i>	KM051118 KJ782619 KC790276	99%
ERR 763	SAF	DYG'S	<i>Alcaligenes sp.</i>	KC337149	100%
ERR 765	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ652623	100%
ERR 770	SAF	DYG'S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	AB683956 AJ551156	99%
ERR 771	SAF	DYG'S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KM893074	99%
ERR 772	SAF	DYG'S	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	HQ731453	99%
ERR 773	SAF	DYG'S	<i>Microbacterium thalassium</i>	KF973240	99%
ERR 779	Nativa	DYG'S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KT153615	100%
ERR 782	Nativa	DYG'S	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	KP313737	100%
ERR 785	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	KJ524505 HF584912	100%
ERR 792	Nativa	DYG'S	<i>Agrobacterium sp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> <i>O. anthropi</i>	KF836052 KJ784477 KP771804 JX455164	99%
ERR 794	Nativa	DYG'S	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> <i>L. xylanilyticus</i>	KP347685 KJ767332	99%
ERR 795	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. bacterium</i>	KJ524505 JX994097 JN392787	99%
ERR 797	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>Bacillaceae bacterium</i>	KJ524505 HF584912 JN392787	99%
ERR 799	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus acidiceles</i> <i>B. luciferensis</i>	KF010787 JQ579634	99%
ERR 800	Monocultivo	DYG'S	<i>Paenibacillus favisporus</i> <i>P. cineres</i>	JQ073761 HM355680	99%
ERR 803	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	KF475850 KJ586274 JX077088	100%
ERR 805	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. toyonenses</i> <i>Bacillaceae bacterium</i>	CP010106 KP686225 KP342195 KP986945 KM241845 KM021138	100%

Continua...

Continua...

ERR 807	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. coagulans</i>	KP788033 KM985372 JN700115 JQ086379 FJ976533	100%
ERR 809	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus subtilis</i>	KM983391	99%
ERR 813	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. thuringiensis</i>	KP161858 KM019835 KJ769222	99%
ERR 819	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	KJ801578 KF500576	99%
ERR 821	Nativa	DYG'S	<i>Bacillus safensis</i> <i>B. pumilus</i>	KP717556 KT307977	99%
ERR 822	Nativa	DYG'S	<i>Flavobacterium sp.</i>	KJ944147	100%
ERR 827	SAF	NFB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KJ742508	94%
ERR 828	SAF	NFB	<i>Stenotrophomonas nitritreducens</i>	KC355332	99%
ERR 830	Nativa	NFB	<i>Bacillus safensis</i> <i>B. pumilus</i>	KP717556 KT307977	100%
ERR 833	Nativa	NFB	<i>Enterobacter sacchari</i>	HQ204281	99%
ERR 838	SAF	NFB	<i>Enterobacter oryzae</i>	JQ659304	99%
ERR 843	SAF	NFB	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	GQ416114	99%
ERR 849	SAF	NFB	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KF724885	99%
ERR 858	SAF	NFB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Rhizobium sp</i>	KP986958 KP979534	99%
ERR 859	SAF	NFB	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	KF668484	98%
ERR 865	SAF	NFB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Rhizobium sp</i>	KP986958 KP979534	100%
ERR 870	SAF	NFB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Rhizobium sp</i>	KF307695 KP979534	99%
ERR 873	SAF	NFB	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KF724885	100%

Foram formadas quatro árvores filogenéticas, uma para cada classe das sequências detectadas (Figura 7, 8, 9 e 10).

Das 6 bactérias que foram classificadas como  $\alpha$ -Proteobacteria, houve o agrupamento de 50% entre os gêneros *Agrobacterium* e *Ochrobactrum* respectivamente (Figura 7). Para as 11 bactérias classificadas como  $\beta$ -Proteobacteria, 36,4% foram agrupadas com os gêneros de *Burkholderia*, 18,2% com *Delftia*; e 45,4% com *Achromobacter* (Figura 8). Já as bactérias da subdivisão  $\gamma$ - Proteobacteria, houve agrupamentos de 20,6% entre as espécies do gênero *Enterobacter*, 6,8% com *Klebsiella*, 3,4% com *Serratia*, 27,5% do gênero *Pseudomonas*, 3,4% com *Pantoea* e 10,3% com *Stenotrophomonas*, sendo que 28% não se agruparam com

nenhumas das estirpes tipo (Figura 9). Por fim das 43 bactérias correspondente a classe Bacillis e Actnobacteria, tiveram agrupamentos do gênero *Bacillus* com 67,4%, 9,3% com *Lysinibacillus*, 11,6% com *Paenibacillus*, 2,3% com *Microbacterium* e 4,7% com *Curtobacterium*, apenas duas bactérias (4,7%) não se agruparam com umas das estirpes tipo (Figura 10).

Figura 7 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 856 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação  $\alpha$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50

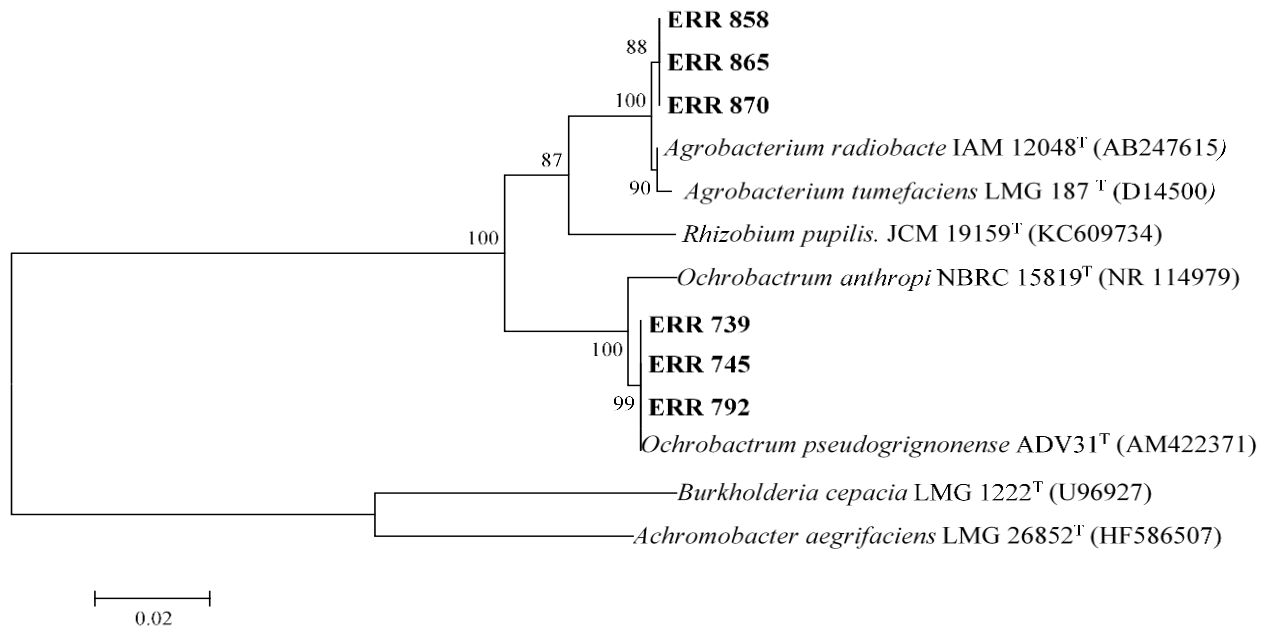


Figura 8 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 739 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação  $\beta$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50

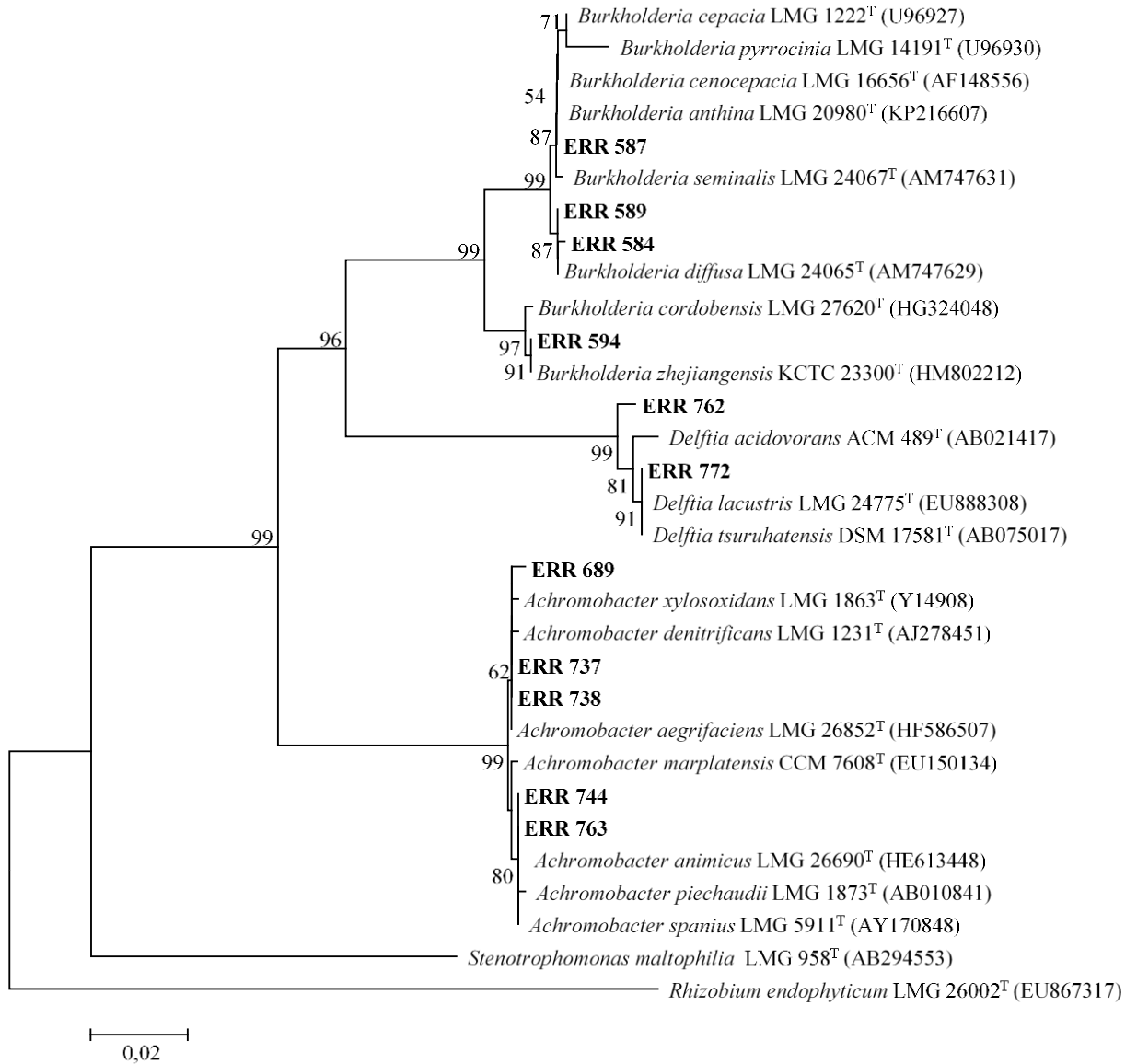


Figura 9 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 592 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação  $\gamma$ -Proteobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50

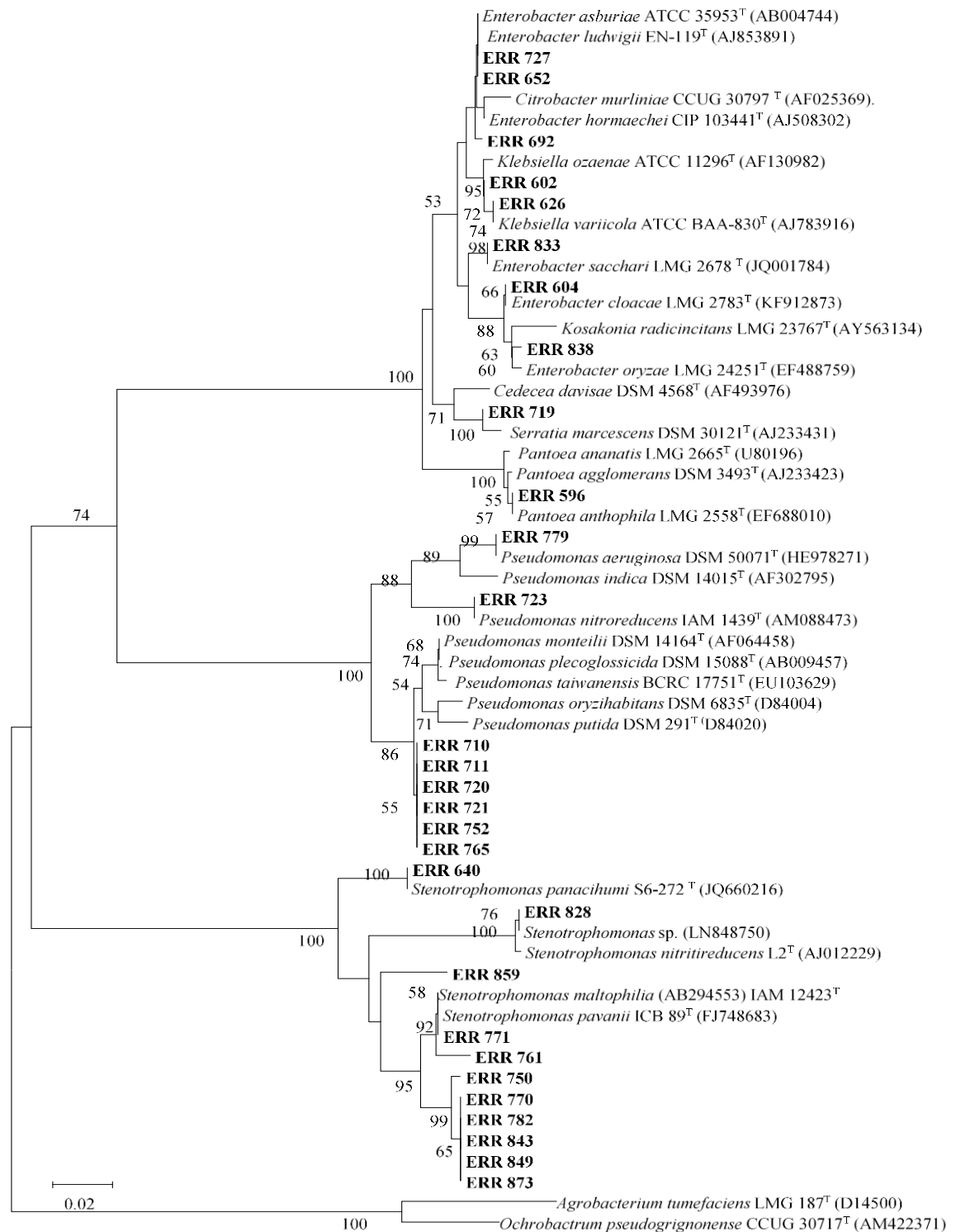
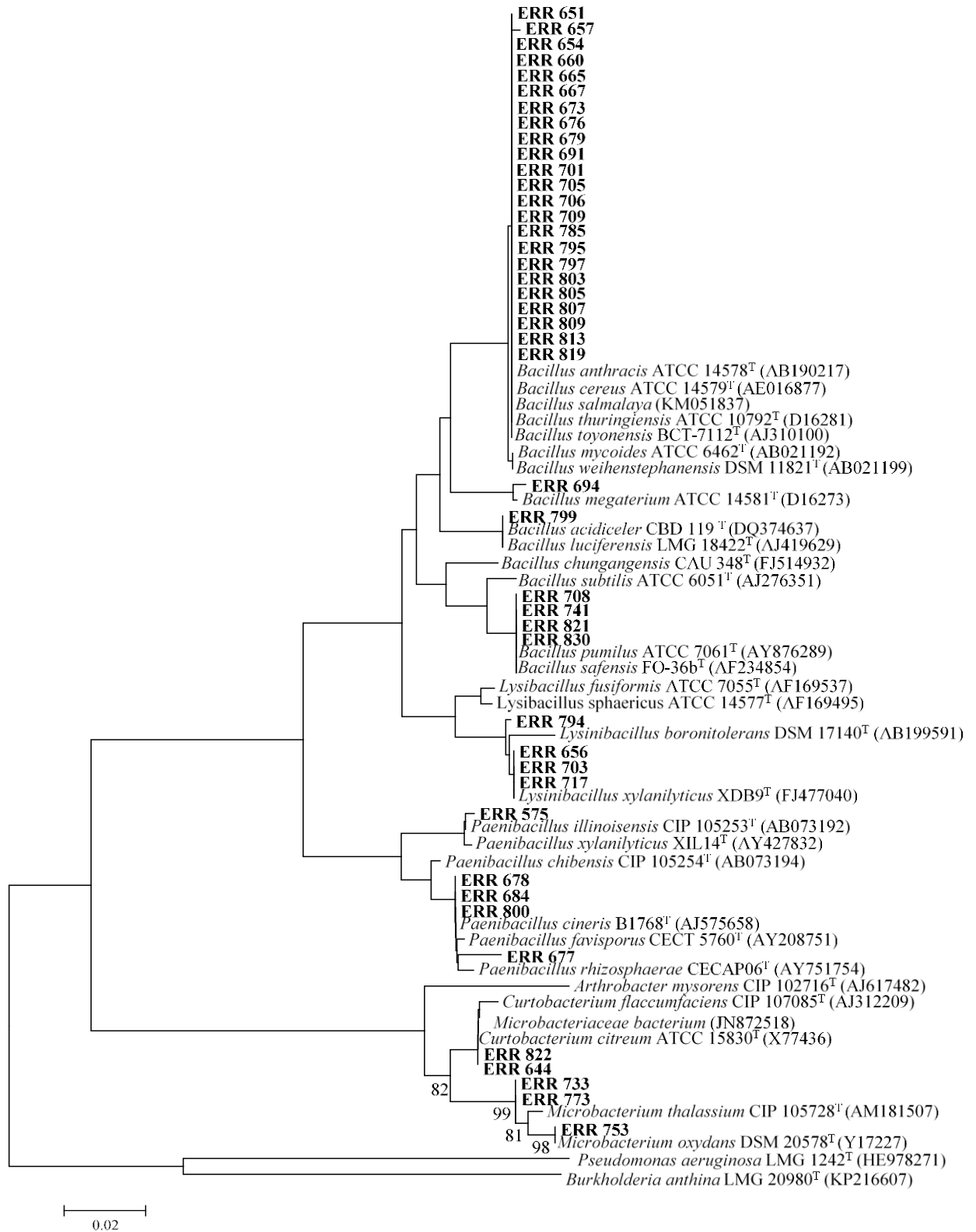


Figura 10 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências com cerca de 564 pb do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil e sequências tipos relacionadas a classificação Bacilli e Actinobacteria. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining. Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50





Apesar de um dos meios utilizados favorecerem o crescimento de *Azospirillum* sp. (NFB), através do sequenciamento parcial do gene do 16S rRNA não foi detectada a presença de espécie pertencentes a este gênero. Nobrega et al. (2004) utilizando os meios NFB, Fam e JNFB para o isolamento de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* s, *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp., oriundos de áreas sob diferentes estratégias de reabilitação, após a mineração de bauxita, conseguiram isolar representantes de outras espécies, além das espécies alvo.

O meio de cultura JMV tem sido utilizado para o isolamento de *Burkholderia* spp., o que é coerente com a maioria dos isolados obtidos nesse meio. O gênero *Burkholderia* tem sido encontrado como endofítico em Poáceas como cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006) e arroz (RODRIGUES et al., 2006). Apesar das preocupações sobre a patogenicidade do grupo *B. cepacia*, várias estirpes desta espécie não são fitopatogênicas e desempenham papel importante na promoção da saúde vegetal (BEVIVINO et al., 1998), que pode ocorrer através da produção de fitohormônios, da fixação de nitrogênio atmosférico (TRAN et al., 2000), ou até pela capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Das similaridades de gêneros de bactérias endofíticas encontrados nas áreas de coletas, a área de SAF foi a que apresentou a maior diversidade de gêneros de bactérias endofíticas, 15 tipos de gêneros, seguidos pelas áreas de nativa e monocultivo, 8 e 7 respectivamente (Tabela 14). A área de SAF é caracterizada pela diversidade de espécies florestais arbóreas e arbustivas em consorciação com espécies agrícolas e/ou animais, em uma mesma área, assemelhando-se à floresta primária, aliada a presença de grande biodiversidade (SMITH et al., 1996) quando comparadas a áreas de monocultivo. A ocorrência dessa diversidade de gêneros bacterianos pode estar relacionada com a sobrevivência desses micro-organismos pela presença de diferentes espécies vegetais, nas áreas de SAF e nativa, disponibilizando nichos diversificados e matéria orgânica proporcionando melhor e maior diversidade de gêneros.

Os gêneros *Burkholderia*, *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Enterobacter* foram encontrados em todas as áreas. O gênero *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* não foi observado em área de monocultivo, apresentando a maior ocorrência de gêneros da ordem *Bacillales*.

Tabela 14 – Diversidade de gêneros encontrados por área de isolamento das bactérias isoladas de raízes de castanheira-do-Brasil

<b>SAF</b>	<b>Nativa</b>	<b>Monocultivo</b>
<i>Achromobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Burholderia</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus</i>
<i>Curtobacterium</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Delftia</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	
<i>Lysinibacillus</i>		
<i>Microbacterium</i>		
<i>Ochrobactrum</i>		
<i>Paenibacillus</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Serratia</i>		
<i>Stenotrophomonas</i>		

Em relação a diversidade pelos meios utilizados, o meio DYG'S foi o que apresentou maior diversidade, 12 gêneros distintos, seguidos pelos meios LGI, NFB e JMV com 6, 4 e 2 tipos de gêneros respectivamente (Tabela 15). Essa ocorrência de diversidade em relação ao meio DYG'S, deve-se ao fato desse meio ser considerado rico em nutrientes e não seletivo.

Tabela 15 – Diversidade de gêneros encontrados pelo tipo de meio de isolamento em raízes de castanheira-do-Brasil

<b>DYG'S</b>	<b>LGI</b>	<b>NFB</b>	<b>JMV</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Curtobacteria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Klesbsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	
<i>Ochrobactrum</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Pantoea</i>		
<i>Enterobacter</i>	<i>Bacillus</i>		
<i>Serratia</i>			
<i>Microbacterium</i>			
<i>Achromobacter</i>			
<i>Uncultured bacterium</i>			
<i>Delftia</i>			
<i>Paenibacillus</i>			

Em comparação a diversidade de gêneros das bactérias que melhor se destacaram com maior potencial para o desenvolvimento vegetal, foi observado a presença de 12 tipos de gêneros (Tabela 16). Isso mostra uma grande diversidade de tipos de bactérias que possuem potencial em promover o crescimento vegetal associadas a castanheira-do-Brasil.

Tabela 16 – Diversidade de gêneros das bactérias que melhor se destacaram com maior potencial para o desenvolvimento vegetal

<b>Bactéria</b>	<b>Origem</b>	<b>Meio</b>	<b>Gênero</b>
ERR 584	SAF	JMV	<i>Burkholderia</i>
ERR 587	Nativa	JMV	<i>Burkholderia</i>
ERR 589	Monocultivo	JMV	<i>Burkholderia</i>
ERR 596	Monocultivo	LGI	<i>Pantoea</i>
ERR 604	SAF	LGI	<i>Enterobacter</i>
ERR 612	Nativa	LGI	<i>Burkholderia</i>
ERR 626	SAF	LGI	<i>Kebsiella</i>
ERR 640	SAF	LGI	<i>Stenotrophomonas</i>
ERR 652	Monocultivo	LGI	<i>Enterobacter</i>
ERR 656	Monocultivo	DYG'S	<i>Lysinibacillus</i>
ERR 680	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus</i>
ERR 692	Monocultivo	DYG'S	<i>Enterobacter</i>
ERR 694	Monocultivo	DYG'S	<i>Bacillus</i>
ERR 703	Monocultivo	DYG'S	<i>Lysinibacillus</i>
ERR 710	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas</i>
ERR 712	SAF	DYG'S	<i>Serratia</i>
ERR 719	SAF	DYG'S	<i>Serratia</i>
ERR 723	SAF	DYG'S	<i>Pseudomonas</i>
ERR 733	SAF	DYG'S	<i>Microbacterium</i>
ERR 744	SAF	DYG'S	<i>Achromobacter</i>
ERR 762	SAF	DYG'S	<i>Delftia</i>
ERR 779	Nativa	DYG'S	<i>Pseudomonas</i>
ERR 827	SAF	NFB	<i>Kebsiella</i>

Dentre estas melhores que se destacaram com maior potencial para o desenvolvimento vegetal, foi observado a presença de gêneros importantes associados à proteção da planta hospedeira, como *Pseudomonas* responsáveis pela produção de compostos antagonistas e tem sido amplamente utilizada no controle biológico de fungos causadores de doenças (AMEIN; OMER; WELCH et al., 2008). Outros gêneros bacterianos observados são descritos na literatura como portadores de características benéficas como: *Bacillus*, *Eterobacter*, *Pantoea*, e *Stenotrophomonas* produtores de AIA (PARK et al., 2005; PATTEN; GLICK, 1996), *Stenotrophomonas* como biodegradadores de contaminantes (QURESHI et al., 2007); *Bacillus* e *Microbacterium* promotores de crescimento (TSAVKELOVA et al., 2007; KARLIDAG et al., 2007); *Bacillus* com potencial no controle biológico (RYU et al., 2006; SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY; ANNAPURNA, 2007). Além da produção de hormônios, certos gêneros possuem a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, entre as espécies de gêneros com esta capacidade encontrados são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Kebsiella* e *Achromobacter* (RODRIGUES FRAGA, 1999).

## 5 CONCLUSÃO

Há uma grande diversidade de bactérias endofíticas presentes em raízes de castanheira-do-Brasil em Roraima e a diversidade de bactérias isoladas das áreas de sistema agroflorestal, monocultivo e mata nativa são similares.

Existem bactérias capazes de solubilizar fosfatos de cálcio e alumínio e produzir ácido indol acético e bactérias diazotróficas em raízes de castanheira-do-Brasil.

A produção de halo sobre o meio sólido não deve ser considerada como o único critério para a solubilização de P, sendo necessária a realização de testes paralelos em meios líquidos para uma análise precisa da quantificação de P liberado, visto que para seleção de possíveis solubilizadores, é indicado o teste com duas ou três fontes de fósforo.

Entre as 100 bactérias avaliadas, 24 foram as mais promissoras para futuros testes de promoção do crescimento vegetal na produção de mudas de castanheira-do-Brasil.

Há uma grande diversidade de gêneros com capacidade de promover o crescimento vegetal associados a raízes de castanheira-do-Brasil;

Foi constatada a presença dos gêneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Cedecea*, *Curtobacteria*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomona*.

Este estudo é o primeiro relato de caracterização de bactérias endofíticas em castanheira-do-Brasil com potencial de promover o crescimento vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- ALONI, R. et al. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 883-893, feb. 2006.
- AMARAL, C. P.; BELENTANI, L.; OLIVEIRA, R. A. O uso sustentável da castanha-do-Brasil. **Revista Científica da Ajes**, Juína, v. 4, n. 8, p. 49-60, jan./jun. 2013.
- AMEIN, T.; OMER, Z.; WELCH, C. Application and evaluation of pseudomonas strains for biocontrol of wheat seedling blight. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 3, p. 532-536, mar./may. 2008.
- ARAÚJO, M. M.; OSAQUI, H.; MELO, R. S. Padrão de distribuição espacial de castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K), barragem do contado, Floresta Nacional de Carajás, Pará. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 2, 2001, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2001. p. 367-375.
- ARNOU, D. I. **Soil and fertilizer phosphorus in crop nutrition**. 4. ed. New York: Academic Press, 1953. 492 p.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 231-237, jun. 2002.
- BAL, A. et al. Isolation and identification of diazotrophic bacteria from internal tissues of *Pinus contorta* and *Thuja plicata*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 807-813, apr. 2012.
- BALDANI, J. I. et al. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. In: PEDROSA, F. O. et al. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Netherlands: Springer, 2000. p. 397-400.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* ge. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v.36, n. 1, p.86-93, jan. 1986.
- BALDANI, J. I. et al. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 195-232.

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 911- 922, may. /jun. 1997.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, n. 4, p.465–479, may. 2012.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406, [s. m.].1976.

BEVIVINO, A., et al. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 225-237, nov. 1998.

BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880-886, jan. 2000.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 2001. 1388 p.

BRASIL. Decreto nº 5.975, de 30 de novembro de 2006. Ficam revogados os Decretos n. 97.628, de 10 de abril de 1989, 1.282, de 19 de outubro de 1994, e 2.788, de 28 de setembro de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1 dez. 2006.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 923-929, jul. 1997.

CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTGATE, J. R. Derivation and properties of F-prime factors carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 93, n. 1, p. 111-125, mar. 1976.

CASTRO-GONZÁLEZ, R. et al. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 345, n. 1, p. 155–169, aug. 2011.

CHAIRMAN, R. W. F. **Biological nitrogen fixation**. Washington, DC: National Academy Press, 1994. 61 p.

CHU, E. Y.; KATO, O. R. Efeito da Inoculação de Fungos Micorrízicos Vesiculares em Urucuzeiros (*Bixa orellana* L.). Belém: Embrapa-CPATU, 1992. 15 p. (Boletim de Pesquisa, 128)

CLAY, J. W. Brazil nuts: the use of a keystone species for conservation and development. In: FREESE, C. H., **Harvesting wild species**: implications for biodiversity conservation. London: The John Hopking University, 1997. p. 169-185.

CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica**: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA, 2000. 409 p.

COLWELL, R.; MAO, C. X.; CHANG, J. Interpolating, Extrapolating, and Comparing Incidence-Based Species Accumulation Curves. **Ecology**, Washington, v. 85, n. 10, p. 2717-2727, oct. 2004.

COSTA, I. B., et al. Isolamento de fungos “Dark Septate” a partir de raízes de castanha-do-Brasil. In: FERTILIDADE E BIOLOGIA DO SOLO, 9, 2014, Araxá. **Resumo...** Araxá: FERTBIO, 2014a. p. 1.

COSTA, I. B., et al. Ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas associativas de raízes de castanha-do-Brasil. In: FERTILIDADE E BIOLOGIA DO SOLO, 9, 2014, Araxá. **Resumo...** Araxá: FERTBIO, 2014b. p. 1.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 1–18, set. 1995.

CYMERYS, M. et al. Castanheira (*Bertholletia excelsa* H. & B.). In: SHANLEY, P.; MEDINA, G. (Ed.). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: Cifor; Imazon, 2005. p. 61-73.

DI CELLO, F. et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4485-4493, aug. 1997.

DIXON, R. A.; CANNON, F. C.; KONDOROSI, A. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 260, n. 5548, p. 268-271, mar. 1976.

DIXON, R. A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. **Nature**, London, v. 237, n. 5350, p. 102-103, may. 1972.

DOBBELAERE, S.; VANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, jun. 2003.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concept of plant bacteria interactions endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 44, n. 5, p. 310-313, [s. m.]. 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI/Itaguaí, 1995. 60 p.

DUPUY, N. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 461-473, jul. 1994.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212 p.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizante**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 2009. 627 p.

ESTRADA, G. A. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 369, n. 1, p. 115–129, nov. 2012.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, jun. 2001.

FANKEM, H. et al. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Camerron. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 2, n. 7, p. 171-178, jul. 2008.

FEMACT. Fundação do Meio Ambiente Ciência e Tecnologia do Estado de Roraima. **O Brasil do hemisfério norte: diagnóstico científico e tecnológico para o desenvolvimento**. Boa Vista: AMBTEC, 1993. 512 p.

FERNANDES, E. T. M. B. Diversidade Morfológica e Produção de *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Lecythidaceae) no Sudeste do Estado do Acre – Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, n. 8, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: EMBRAPA - Acre, 2007. p. 1-2.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

GALLOWAY, J. N. et al. The nitrogen cascade. **BioScience**, Uberlandia, v. 53, n. 4, p. 341–356, apr. 2003.

GALVÃO, P. G. et al. **Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 63 p. (Documentos, 270).



GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 395-412, mar. 2005.

GUPPY, C. N. et al. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Australian Journal Soil Research**, Melbourne, v. 43, n. 2, p.189-202, oct. 2005.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 83-93, aug. 2002.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, jul. 1997.

HARA, F. A. S. E OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n.3, p. 343-357, jul. 2004.

HARA, F. A. S. E OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, jul. 2005.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 463-471, spt. 2008.

HASSAN, U. et al. Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from cereal crops. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 7, 1996, Faisalabad. **Abstracts...** Faisalabad: NIBGE, 1996. p. 159-160.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends Biotechnol**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 190-197, jun. 1996.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Documentos, 283).

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro: MPOG, 2008. 47 p.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. solubilization of hardly soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 265-270, mar. 1995.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p. 119-129.

KARLIDAG, H. et al. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 16–20, sep. 2007.

KETZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate dissolving capability by of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, n. 1, p. 79-85, feb. 1959.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 96, n. 3, p. 473-480, feb. 2004.

KIM, Y. C. et al. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 5, p. 1548–1555, jan. 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, dec. 1980.

LAEMMLI, U. K. et al. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, aug. 1970.

LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melilot* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga*, sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 715-733, oct. 1994.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p 115–148.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitium atropurpureum*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 319, n. 1-2, p. 127–145, jan. 2009.

LOCATELLI, M. et al. **Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 384 p.

MAGALHÃES, F. M. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 417-430, [s. m.]. 1983.

MARRA, L. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 357, n. 1-2, p. 289-307, mar. 2012.

MARRA, L. et al. Solubilization of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, set. /oct. 2011.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Produção de fosfatases, enzima ACC desaminase e antagonismo a fitopatógeno por rizobactérias. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 7, n. esp., jul./dez. 2011.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium johannense* sp.nov. and *Sesbania virgata* (CAZ.) PERS. a highly specific symbiosis. In: PEDROSA, F. O. et al. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Netherlands: Springer, 2000, p. 197-206.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S. et al. **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2013. 352 p.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-99, nov. 2010.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobio isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p. 135-146, apr. 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. W.; OLIVEIRA, L. A.; BECKER, P. Ausência de micorrizas vesículo-arbusculares efetivas em Lecythidaceas numa área de floresta primária da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 27, n. 1, p. 3-8, nov. 1997.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology, and economy botany of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, New York, v. 8, n. 1, p. 130-150, [s. m.]. 1990.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.: M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: Edgar blucher, 1983. 724 p.

MÜLLER, C. H. et al. **Castanha-do-Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995, 65 p. (Coleção plantar, 23).

MÜLLER, C. H. **Quebra de dormência e enxertia em castanheira-do-brasil**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982. 40 p. (Documentos, 16).

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 170, n. 1, p. 265-270, jan. 1999.

NERONI, R. F.; CARDOSO, E. J. B. Occurrence of Diazotrophic Bacteria in *Araucaria Angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p. 303-304, may./ jun. 2007.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Caracterização Fenotípica e Diversidade de Bactérias Diazotróficas Associativas Isoladas de Solos em Reabilitação Após a Mineração de Bauxita. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 269-279, mar./apr. 2004.

OHKUMA, M. et al. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2747-2752, aug. 1996.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, apr. 2014.

PARK, M. et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 127-133, apr. 2005.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 207-220, mar. 1996.

PEDRAZA, R. O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 233, n. 1, p. 15-21, apr. 2004.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e Avaliação de Rizobactérias Isoladas de Raízes de Milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, abr. 2010.

PEREZ, E. et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 2905-2914, nov. 2007.

PERIN, L. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, may. 2006.

QURESHI, A. et al. Degradation of 4-nitroaniline by *Stenotrophomonas* strain HPC 135. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 60, n. 4, p. 215-218, apr. 2007.

RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting an computer-assisted pattern analysis. In: GAETANO-ANOLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. **DNA markers: protocols, applications and overviews**. New York: John Wiley, 1997. p. 1-26.

RADWAN, T.; MOHAMED, Z. K; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 32, n. 1, p. 39–53, [s. m.]. 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOR, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007. 830 p.

REINHOLD-HUREK, B. et al. Interactions of diazotrophic *Azoarcus* spp. with rice. In: PEDROSA, F. O. et al. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Netherlands: Springer, 2000, p. 405-408.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 139-44, apr. 1998.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum* amazonense associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 103-113, jan. /fev. 2004.

REIS, V. M. et al. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**, Viçosa: SBCS, 2006. p. 153- 174.

RODRÍGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4, p. 319-330, oct. 1999.

RODRIGUES, L. S. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275-284, fev. 2006.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 12, n. 1-2, p. 16, [s. m.]. 1986.

RODRIGUEZ, H.; GONZALES, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 155-161, nov. 2000.

ROSSELLÓ-MORA R.; AMANN R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 25, n 1, p. 39–67, aug. 2001.

RYU, C. M. et al. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. **Biological Control**, Orlando, v. 39, n. 3, p. 282-289, dec. 2006.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Caloocan, v. 20, n. 5, p. 282-285, may. 1995.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, n. 1, p. 25-29, jul. 2007.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communications**. Illinois: University of Illinois, 1963. 117 p.

SILVA, A. C. S. et al. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 1, p. 37-42, fev. 2011a.

SILVA, K. et al Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 518-525, sep/oct. 2011b.

SILVA, K. et al. Diazotrophic Burkholderia species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 4, p. 253-262, jun. 2012.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCARF, 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, jun. 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbon. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 311-319, abr./jun. 2000.

SIMONET, P. et al. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3278-3286, nov. 1991.

SMITH, N. J. H. et al. Agroforestry trajectories among smallholders in the Brasília Amazon: innovation and resiliency in pioneer and older settled areas. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 15-27, jul. 1996.

SOUCHIE, E. L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, mai./ago. 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

ST. JOHN, T. V. Uma lista de espécies de plantas tropicais brasileiras naturalmente infectadas com micorriza vesicular-arbuscular. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 10, n. 1, p. 229-234, [s. m.]. 1980.

STREICHER, S. L.; GURNEY, E. G.; VALENTINE, R. C. The nitrogen fixation genes. **Nature**, London, v. 239, n. 5374, p. 495-499, oct. 1972.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 12-22, [s. m.]. 1982.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using simony methods. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, oct. 2011.

TEIXEIRA, K. R. S. **Bases moleculares e genéticas da fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26 p. (Documentos, 32).

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, nov. 1994.

TRAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, n. 1, p. 273-284, jan. 2000.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 69-76, jan. 2007.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, n. 2, p. 117-126, mar. 2006.

UEDA, T. et al. Genetic diversity of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 3, p. 235-240, mar. 1995.

VALE JÚNIOR, J. F.; LEITÃO SOUSA, M. I. Caracterização e distribuição dos solos das Savanas de Roraima. In: BARBOSA, R.I.; XAUD, H.A.M. & SOUZA, J.M.C. **Sanvanas de Roraima: Etnoecologia, biodiversidade e potencialidades agrosilvopastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 79-91.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407–438, jun. 1996.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, n. 2, p. 571-586, mar. 2003.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (Documentos, 234).

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 69, p. 99-151, jan. 2000.

WIDMER, F. et al. Analysis of a *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir forest site in the Oregon cascade mountain range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 374-380, fev. 1999.

ZAKHAROVA, E. A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 259, n. 3, p. 572-576, fev. 1999.

ZEHR, J. et al. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes In A marine cyanobacterial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2527-2532, jul. 1995.

ZUIDEMA, P. A.; BOOT, R. G. A. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 18, n. 1, p. 1-31, jan. 2002.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Croqui das áreas de coleta no Campo Experimental Serra da Prata (Mucajaí)

Paricá													Cedro doce
52 m													
	63	64	127	128	191	192	255	256	319	320	383	384	Castanha do brasil - experimento de poda Teresinha
1	62	65	126	129	190	193	254	257	318	321	382	385	
2	61	66	125	130	189	194	253	258	317	322	381	386	
3	60	67	124	131	188	195	252	259	316	323	380	387	
4	59	68	123	132	187	196	251	260	315	324	379	388	
5	58	69	122	133	186	197	250	261	314	325	378	389	
6	57	70	121	134	185	198	249	262	313	326	377	390	
7	56	71	120	135	184	199	248	263	312	327	376	391	
8	55	72	119	136	183	200	247	264	311	328	375	392	
9	54	73	118	137	182	201	246	265	310	329	374	393	
10	53	74	117	138	181	202	245	266	309	330	373	394	
11	52	75	116	139	180	203	244	267	308	331	372	395	
12	51	76	115	140	179	204	243	268	307	332	371	396	
13	50	77	114	141	178	205	242	269	306	333	370	397	
14	49	78	113	142	177	206	241	270	305	334	369	398	
15	48	79	112	143	176	207	240	271	304	335	368	399	
16	47	80	111	144	175	208	239	272	303	336	367	400	
17	46	81	110	145	174	209	238	273	302	337	366	401	
18	45	82	109	146	173	210	237	274	301	338	365	402	
19	44	83	108	147	172	211	236	275	300	339	364	403	
20	43	84	107	148	171	212	235	276	299	340	363	404	
21	42	85	106	149	170	213	234	277	298	341	362	405	
22	41	86	105	150	169	214	233	278	297	342	361	406	
23	40	87	104	151	168	215	232	279	296	343	360	407	
24	39	88	103	152	167	216	231	280	295	344	359	408	
25	38	89	102	153	166	217	230	281	294	345	358	409	
26	37	90	101	154	165	218	229	282	293	346	357	410	
27	36	91	100	155	164	219	228	283	292	347	356	411	
28	35	92	99	156	163	220	227	284	291	348	355	412	
29	34	93	98	157	162	221	226	285	290	349	354	413	
30	33	94	97	158	161	222	225	286	289	350	353	414	
31	32	95	96	159	160	223	224	287	288	351	352	415	
Estrada													Paricá

APÊNDICE B – Croqui da área de SAF - castanheiras e cupuçuzeiros bloco 1

	Cupu 11		Cupu 21		Cupu 28		Cupu 0		Cupu 49		Cupu 61		Cupu 73		Cupu 84
						Cast 12							Cast 6		
	Cupu 10		Cupu 20		Cupu 27		Cupu 36		Cupu 48		Cupu 60		Cupu 72		Cupu 83
	Cupu 9		Cupu 19		Cupu 26		Cupu 35		Cupu 47		Cupu 59		Cupu 71		Cupu 82
						Cast 11							Cast 5		
	Cupu 8		Cupu 18		Cupu 25.1		Cupu 34		Cupu 46		Cupu 58		Cupu 70		Cupu 81
	Cupu 7		Cupu 17		Cupu 25		Cupu 33		Cupu 45		Cupu 57		Cupu 69		Cupu 0
						Cast 10							Cast 4		
	Cupu 6		Cupu 16		Cupu 0		Cupu 0		Cupu 44		Cupu 56		Cupu 68		Cupu 79
	Cupu 5		Cupu 15		Cupu 24		Cupu 32		Cupu 43		Cupu 55		Cupu 67		Cupu 0
						Cast 9							Cast 3		
	Cupu 0		Cupu 14		Cupu 23		Cupu 0		Cupu 42		Cupu 54		Cupu 66		Cupu 78
	Cupu 4		Cupu 13.1		Cupu 0		Cupu 31.1		Cupu 41		Cupu 53		Cupu 65		Cupu 77
						Cast 8							Cast 2		
	Cupu 3		Cupu 13		Cupu 22.1		Cupu 31		Cupu 40		Cupu 52		Cupu 64		Cupu 76
	Cupu 2		Cupu		Cupu 0		Cupu 30		Cupu 39		Cupu 51		Cupu 63		Cupu 75
						Cast 7							Cast 1		
	Cupu 1		Cupu 12		Cupu 22		Cupu 29		Cupu 0		Cupu 50		Cupu 62		Cupu 74

APÊNDICE C – Croqui da área de SAF - castanheiras e cupuçuzeiros bloco II

	Cupu 96		Cupu 108		Cupu 117		Cupu 126		Cupu 138		Cupu 149		Cupu 159		Cupu 167	
						Cast 24								Cast 18		
	Cupu 95		Cupu 107		Cupu 116		Cupu 125		Cupu 137		Cupu 148		Cupu 158		Cupu 166	
	Cupu 94		Cupu 106		Cupu 115		Cupu 1234		Cupu 136		Cupu 147		Cupu 157		Cupu 165.3	
						Cast 23								Cast 17		
	Cupu 93		Cupu 105		Cupu 114.2		Cupu 123.1		Cupu 135		Cupu 146.1		Cupu 156.1		Cupu 165.2	
	Cupu 92		Cupu 104		Cupu 114.1		Cupu 123		Cupu 134		Cupu 0		Cupu 156		Cupu 165.1	
						Cast 0								Cast 16		
	Cupu 91		Cupu 103		Cupu 114		Cupu 122		Cupu 133		Cupu 145		Cupu 155		Cupu 165	
	Cupu 90		Cupu 102		Cupu 113		Cupu 121		Cupu 132		Cupu 144		Cupu 154		Cupu 164.1	
						Cast 21								Cast 15		
	Cupu 89		Cupu 101		Cupu 112.1		Cupu 120		Cupu 131		Cupu 143		Cupu 153		Cupu 164	
	Cupu 88		Cupu 100		Cupu 112		Cupu 119		Cupu 130		Cupu 142		Cupu 152.1		Cupu 163	
						Cast 20								Cast 0		
	Cupu 87		Cupu 99		Cupu 111		Cupu 118		Cupu 129		Cupu 141		Cupu 152		Cupu 162	
	Cupu 86		Cupu 98		Cupu 110		Cupu 0		Cupu 128		Cupu 140		Cupu 151		Cupu 161	
						Cast 19								Cast 0		
	Cupu 85		Cupu 97		Cupu 109		Cupu 0		Cupu 127		Cupu 139		Cupu 150		Cupu 160	

APÊNDICE D – Croqui da área de SAF - castanheiras e cupuzeiros- bloco III

	Cupu 173.1		Cupu 0		Cupu 186.1		Cupu 194		Cupu 204		Cupu 213		Cupu 222		Cupu 232	
						Cast 36								Cast 30		
	Cupu 0		Cupu 180.1		Cupu 186		Cupu 193		Cupu 203		Cupu 212		Cupu 221		Cupu 231	
	Cupu 0		Cupu 180		Cupu 185		Cupu 192		Cupu 202		Cupu 211		Cupu 220		Cupu 0	
						Cast 35								Cast 29		
	Cupu 173		Cupu 0		Cupu 0		Cupu 191		Cupu 201		Cupu 210.2		Cupu 219		Cupu 230	
	Cupu 172		Cupu 178		Cupu 184		Cupu 190		Cupu 200		Cupu 210.1		Cupu 218.2		Cupu 229	
						Cast 34								Cast 28		
	Cupu 0		Cupu 177		Cupu 0		Cupu 189		Cupu 199		Cupu 210		Cupu 218.1		Cupu 228.1	
	Cupu 0		Cupu 176.1		Cupu 183		Cupu 188.1		Cupu 198		Cupu 209		Cupu 218		Cupu 228	
						Cast 33								Cast 27		
	Cupu 171		Cupu 0		Cupu 182		Cupu 188		Cupu 197.1		Cupu 208		Cupu 0		Cupu 227	
	Cupu 170		Cupu 176		Cupu 181.2		Cupu 0		Cupu 197		Cupu 207		Cupu 216		Cupu 226	
						Cast 32								Cast 26		
	Cupu 169		Cupu 175.1		Cupu 181.1		Cupu 187.1		Cupu 196		Cupu 206		Cupu 0		Cupu 225	
	Cupu 0		Cupu 0		Cupu 181		Cupu 0		Cupu 0		Cupu 0		Cupu 214.1		Cupu 224	
						Cast 31								Cast 25		
	Cupu 168		Cupu 0		Cupu 180.2		Cupu 187		Cupu 195		Cupu 205		Cupu 214		Cupu 223	

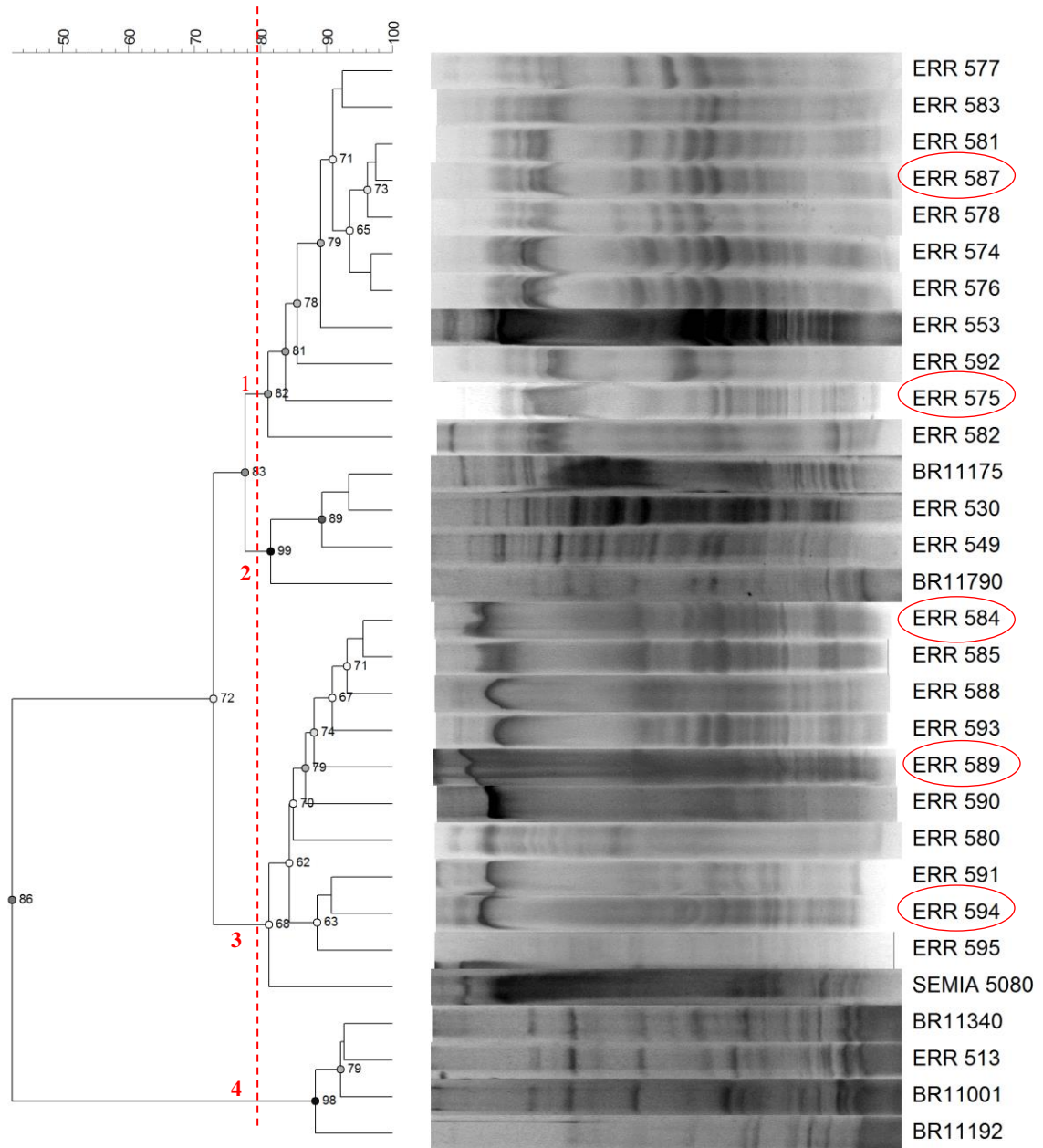
APÊNDICE E – Croqui da área de SAF - castanheiras e cupuzeiros bloco IV

		Cupu 254		Cupu 261		Cupu 268		Cupu 280		Cupu 290		Cupu 298		Cupu 306
												Cast 42		
		Cupu 253		Cupu 260		Cupu 267		Cupu 279		Cupu 289		Cupu 297.1		Cupu 305
	Cupu 240	Cupu 252		Cupu 259.1		Cupu 266.1		Cupu 278		Cupu 288		Cupu 297		Cupu 304
					Cast 47							Cast 41		
	Cupu 239	Cupu 251		Cupu 259		Cupu 266		Cupu 277		Cupu 287.1		Cupu 296		
	Cupu 238	Cupu 250		Cupu 258		Cupu 265		Cupu 276		Cupu 287		Cupu 295.1		Cupu 302.3
					Cast 46							Cast 40		
	Cupu 0	Cupu 249		Cupu 257.2		Cupu 264		Cupu 275		Cupu 286		Cupu 295		Cupu 302.2
	Cupu 237	Cupu 248		Cupu 257.1		Cupu 263.1		Cupu 274		Cupu 285		Cupu 294		Cupu 302.1
					Cast 45							Cast 39		
	Cupu 236	Cupu 247		Cupu 257		Cupu 263		Cupu 273		Cupu 284		Cupu 293		Cupu 302
	Cupu 235	Cupu 246		Cupu 256.1		Cupu 262.3		Cupu 272		Cupu 283		Cupu 292		Cupu 301
					Cast 44							Cast 38		
	Cupu 234	Cupu 245		Cupu 256		Cupu 262.2		Cupu 271		Cupu 282		Cupu 291.2		Cupu 300
		Cupu 244		Cupu 255		Cupu 262.1		Cupu 270		Cupu 281.1		Cupu 291.1		Cupu 299.1
					Cast 43							Cast 37		
	Cupu 233	Cupu 243				Cupu 262		Cupu 269		Cupu 281				Cupu 299

APÊNDICE F – Croqui da área de SAF - castanheiras e cupuzeiros bloco V

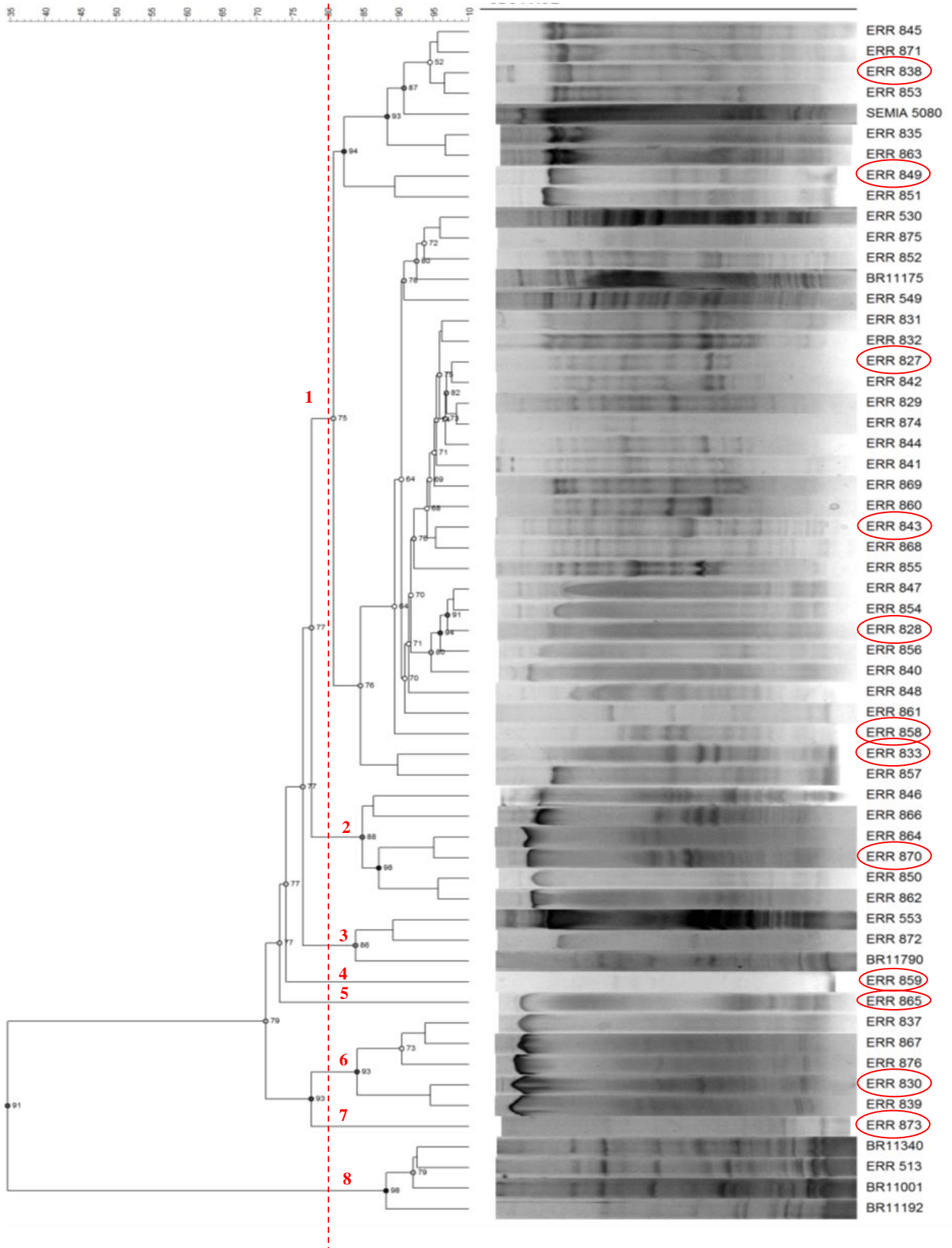
	Cupu 405	--		Cupu 426		Cupu 436		--		Cupu 458		--		--
					Cast 60								Cast 54	
	Cupu 404	Cupu 416		Cupu 425		Cupu 435.1		Cupu 447		Cupu 457		Cupu 465		Cupu 473
	Cupu 403	Cupu 415		Cupu 424.2		Cupu 435		Cupu 446		Cupu 456		Cupu 464		Cupu 472
					Cast 59							--		
	Cupu 402	Cupu 414		--		Cupu 434		--		Cupu 455		Cupu 463		Cupu 471.2
	Cupu 401	Cupu 413		Cupu 424.1		Cupu 433		Cupu 444		Cupu 454		--		Cupu 471.1
					Cast 58								Cast 52	
	Cupu 400	Cupu 412		--		Cupu 432		Cupu 443		Cupu 453		Cupu 461		Cupu 471
	Cupu 399	Cupu 411		Cupu 423		Cupu 431		Cupu 442		Cupu 452		Cupu 460		Cupu 470
					Cast 57								Cast 51	
	Cupu 398	Cupu 410		Cupu 422		Cupu 430		Cupu 441		Cupu 451.1		Cupu 459.2		Cupu 469
	Cupu 397	Cupu 409		Cupu 421		Cupu 429		Cupu 440		Cupu 451		Cupu 459.1		Cupu 468.1
					Cast 56								Cast 50	
	Cupu 396	Cupu 408		Cupu 420		Cupu 0		Cupu 439		Cupu 450		Cupu 0		Cupu 468
	Cupu 395	Cupu 407		Cupu 419		Cupu 428		Cupu 438		Cupu 449		Cupu 0		Cupu 467
					Cast 57								Cast 0	
	Cupu 394	Cupu 406		Cupu 418		Cupu 427		Cupu 437		Cupu 448		Cupu 459		Cupu 466

APÊNDICE G – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos das raízes da castanheira-do-brasil e estirpes tipos de referência referente ao meio de isolamento JMV.

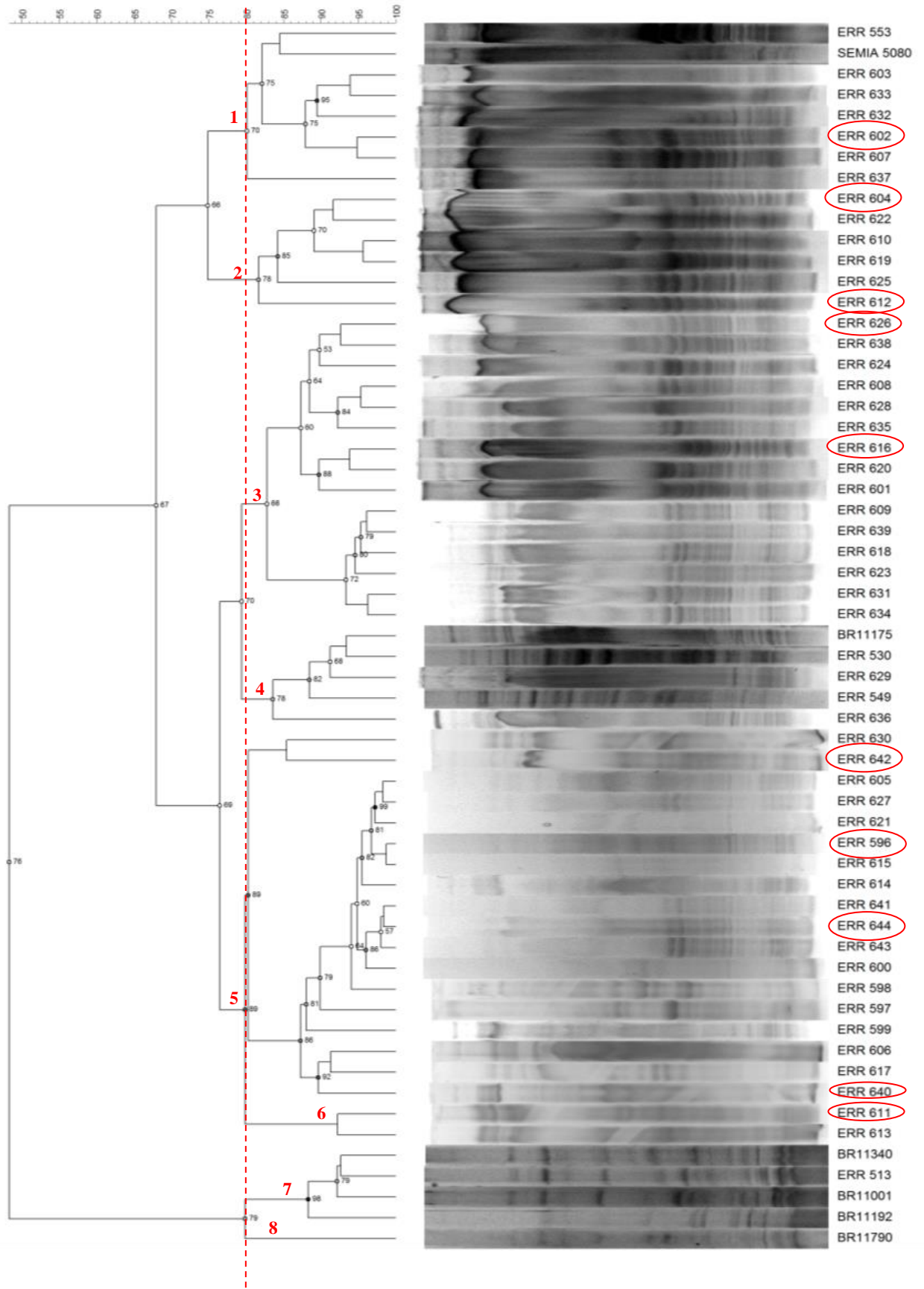




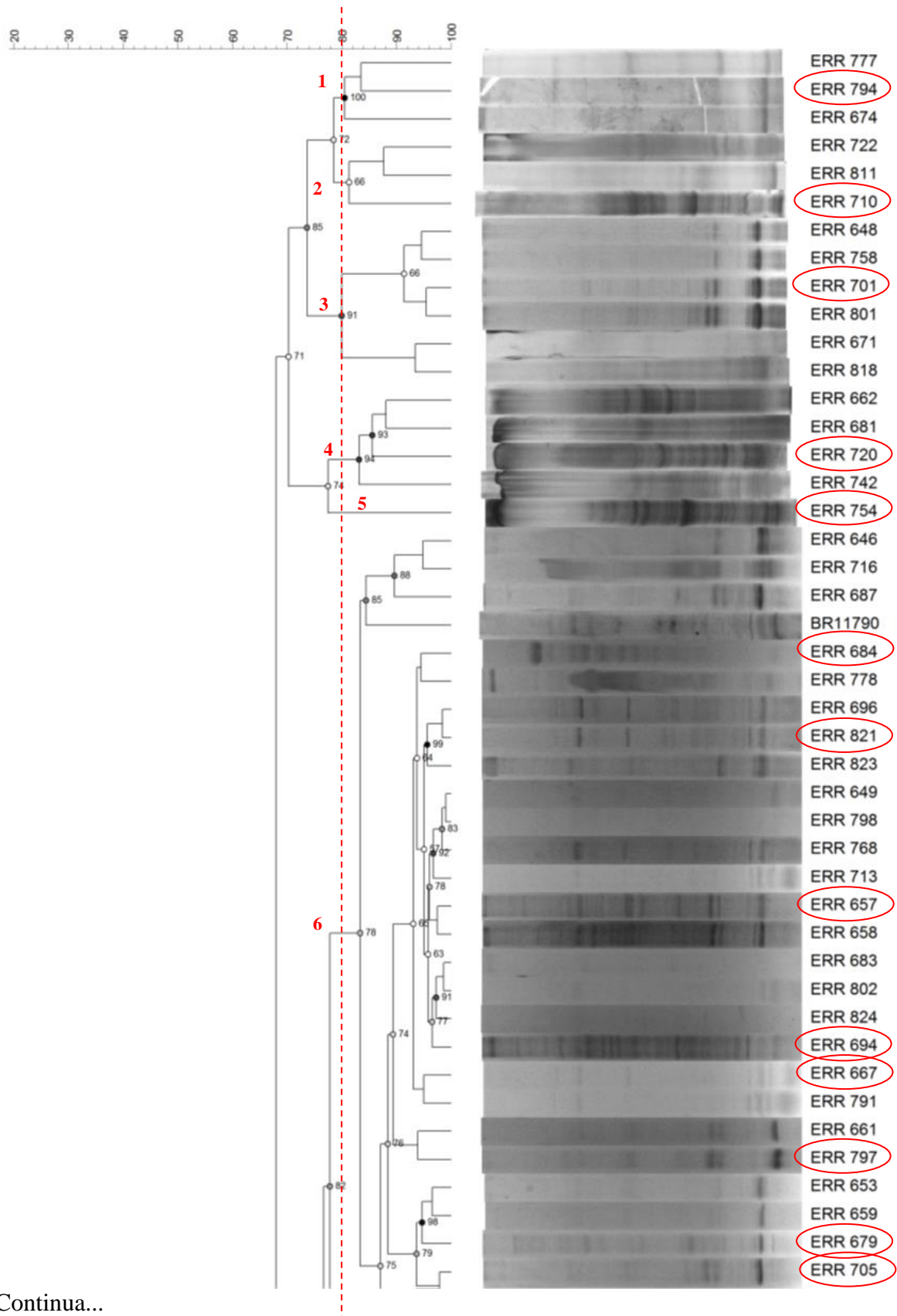
APÊNDICE H – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos das raízes da castanheira-do-brasil e estirpes tipos de referência referente ao meio de isolamento NFB.



APÊNDICE I – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos das raízes da castanheira-do-brasil e estirpes tipos de referência referente ao meio de isolamento LGI

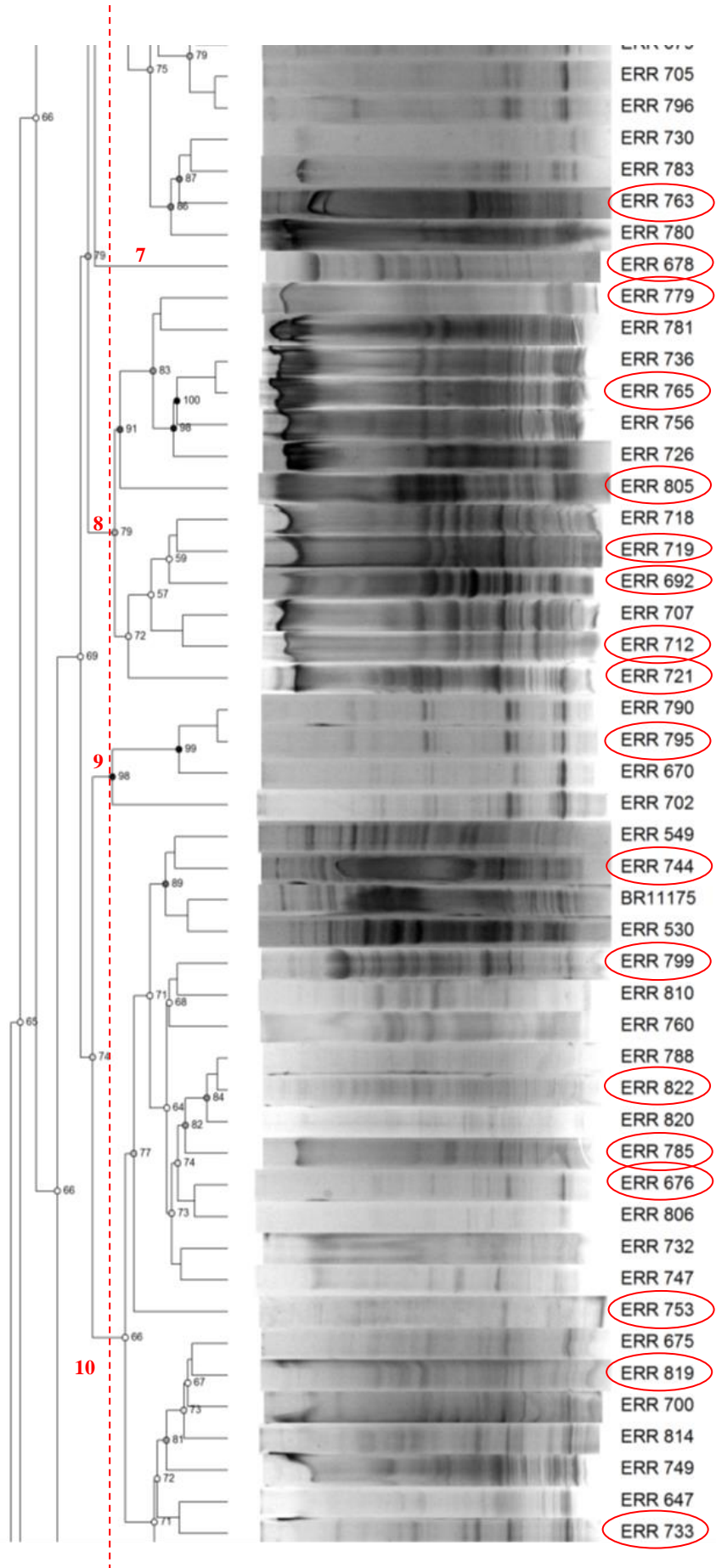


APÊNDICE J – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos das raízes da castanheira-do-brasil e estirpes tipos de referência referente ao meio de isolamento DYG'S



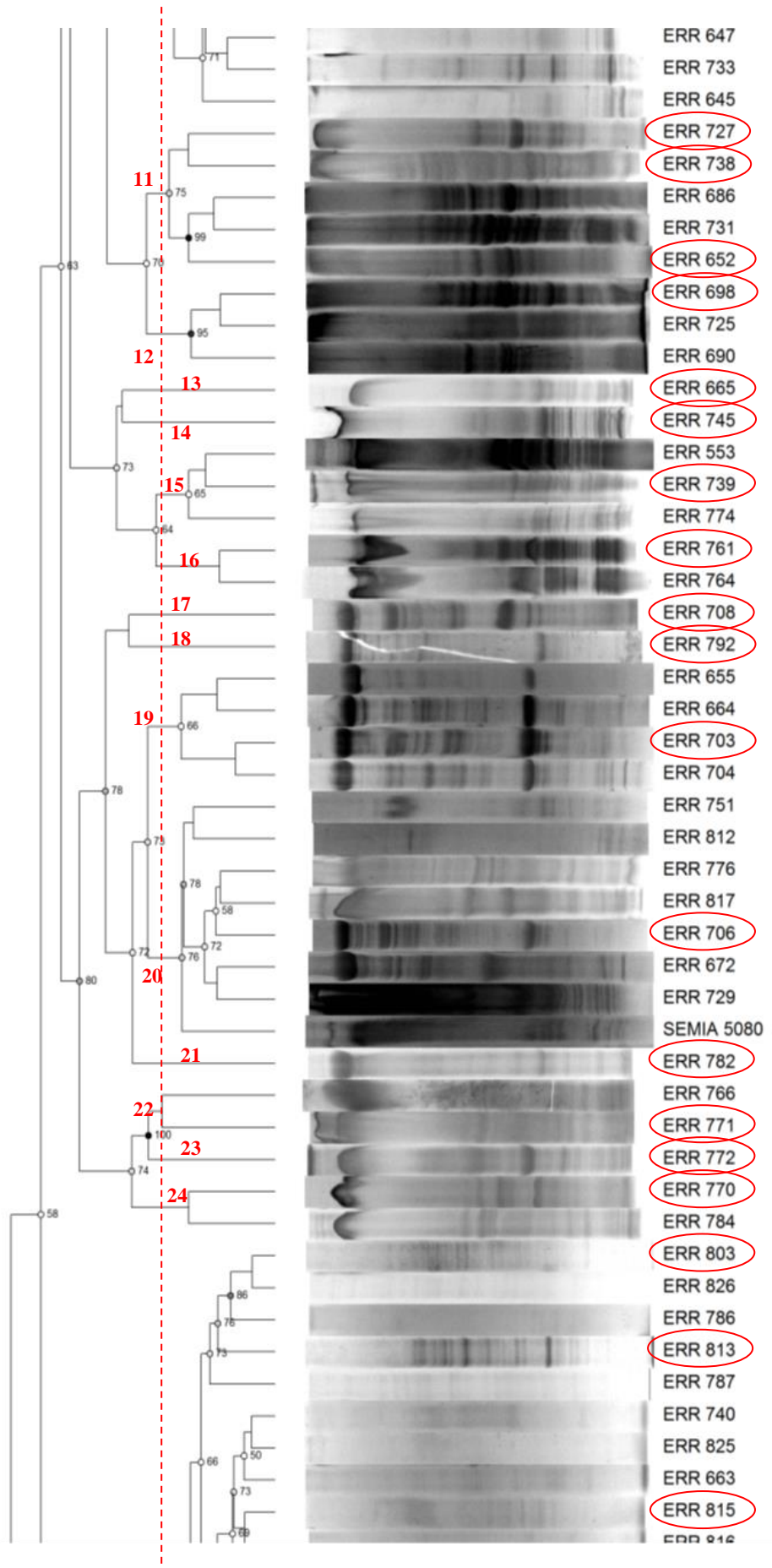
Continua...

Continua...



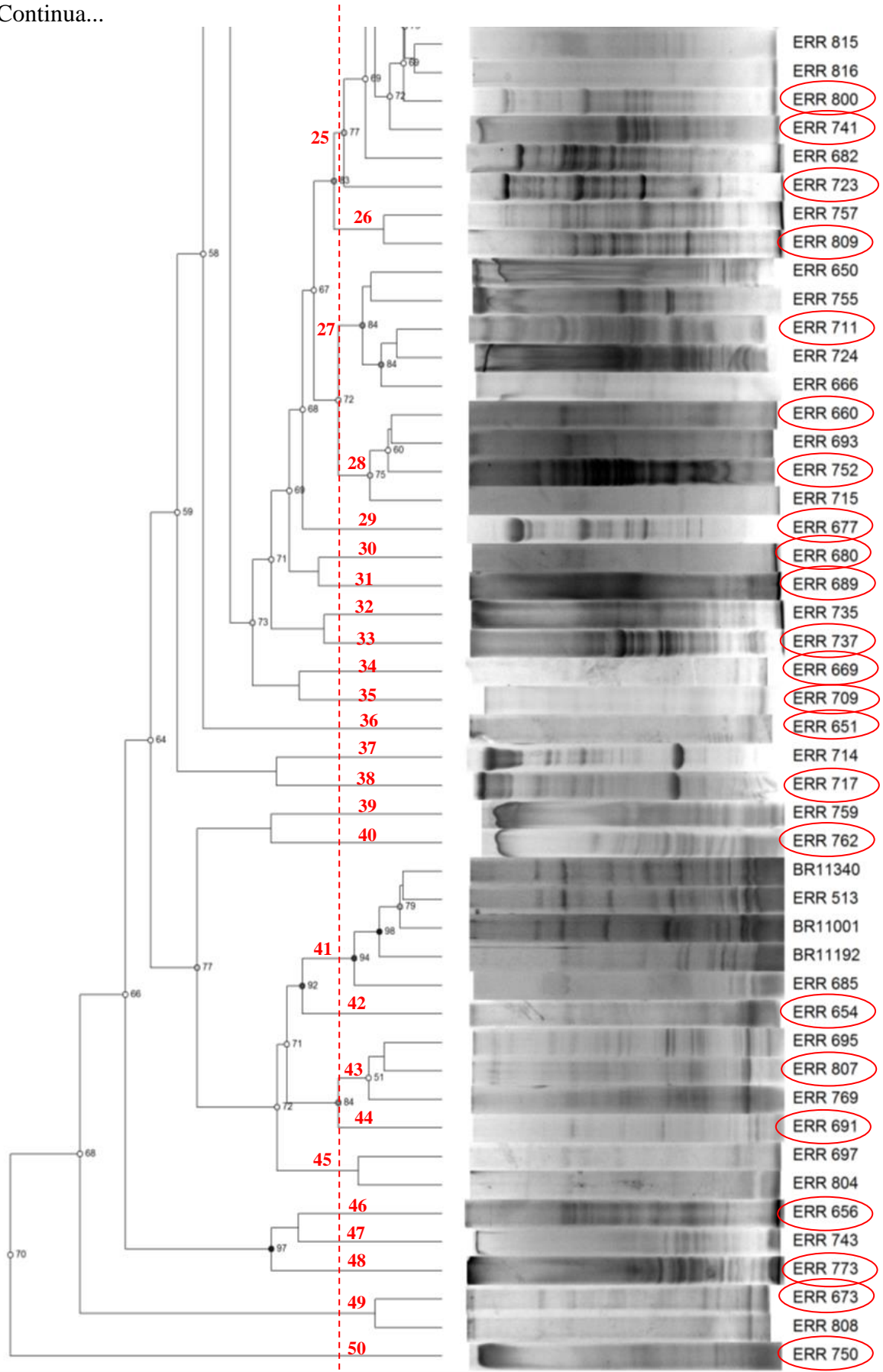
Continua...

Continua...

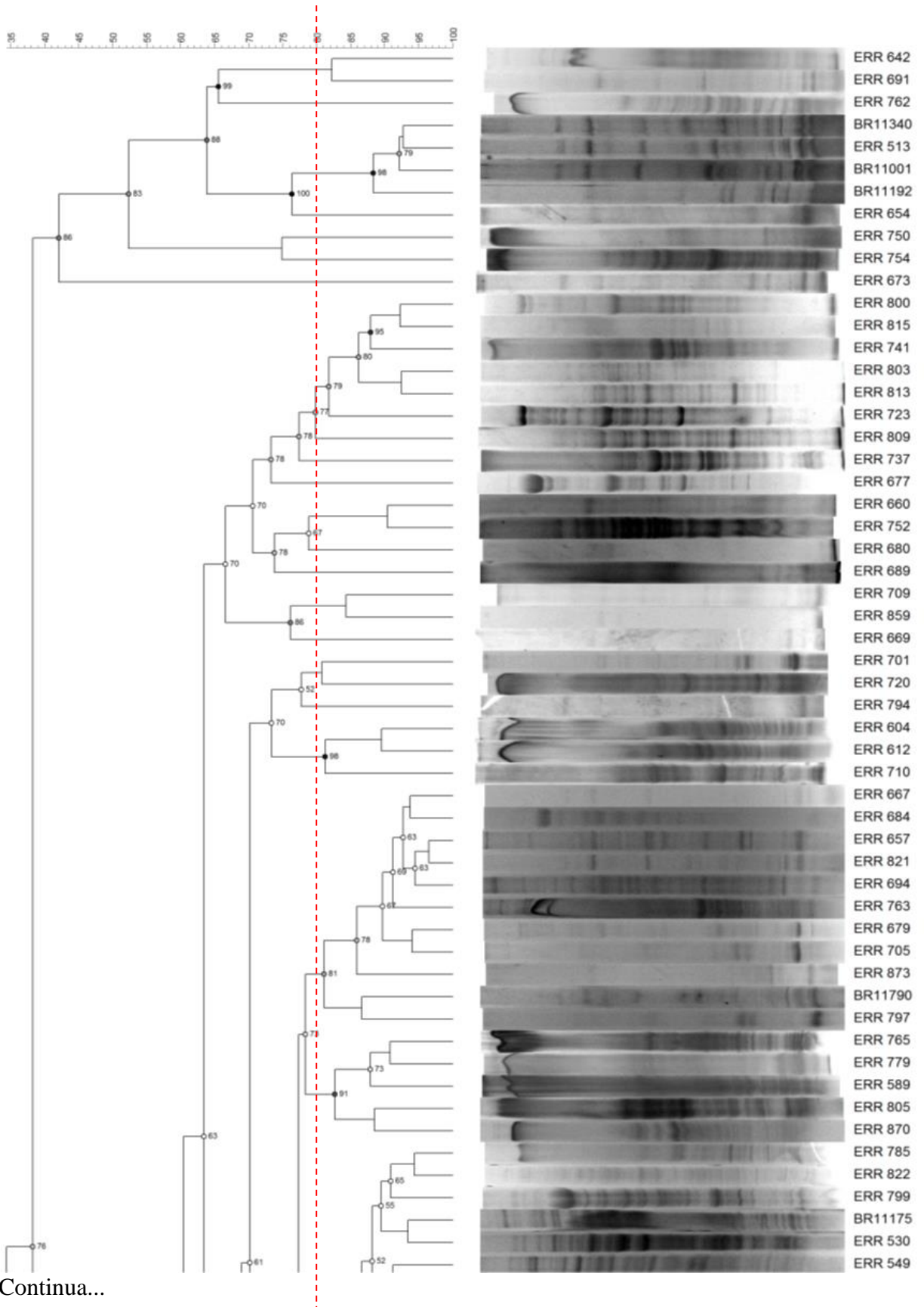


Continua...

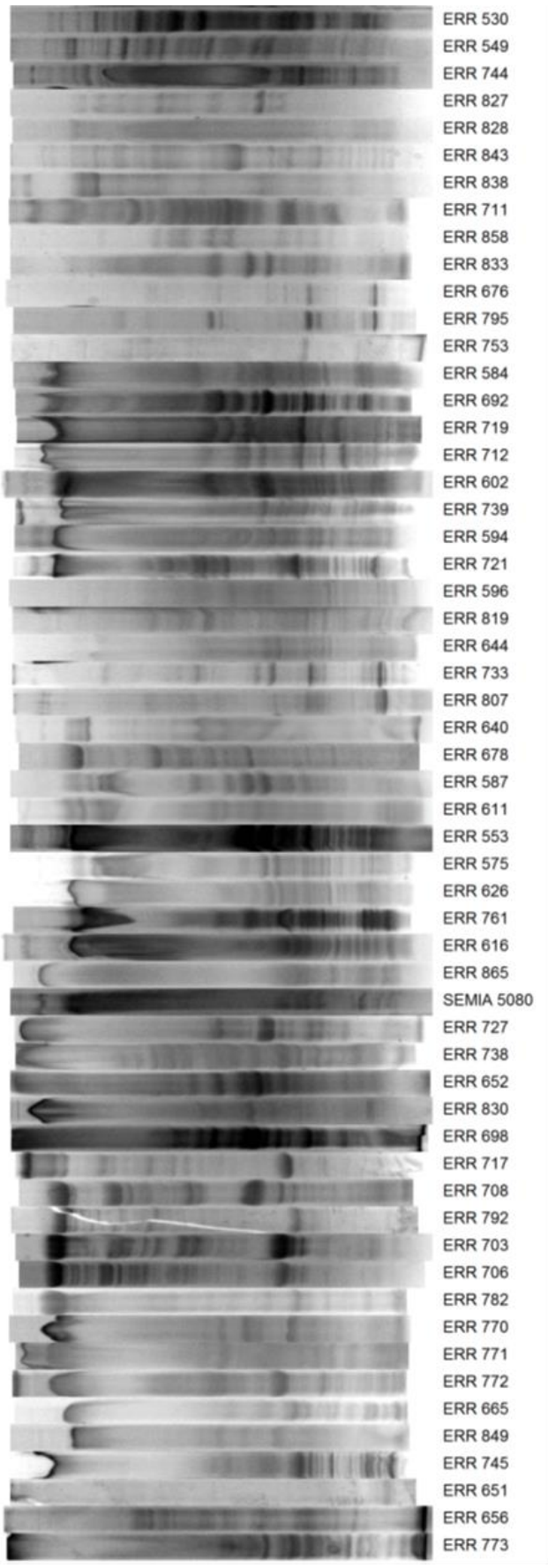
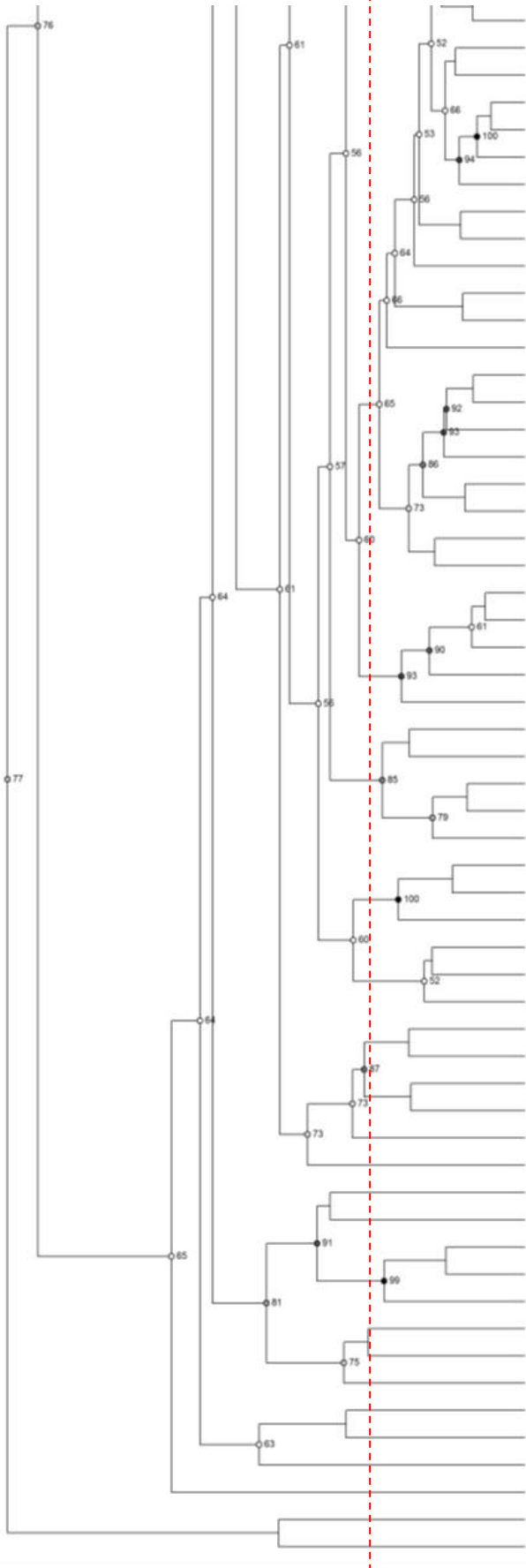
Continua...



APÊNDICE K – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos das raízes da castanheira-do-brasil e estirpes tipos de referência referente as bactérias selecionadas

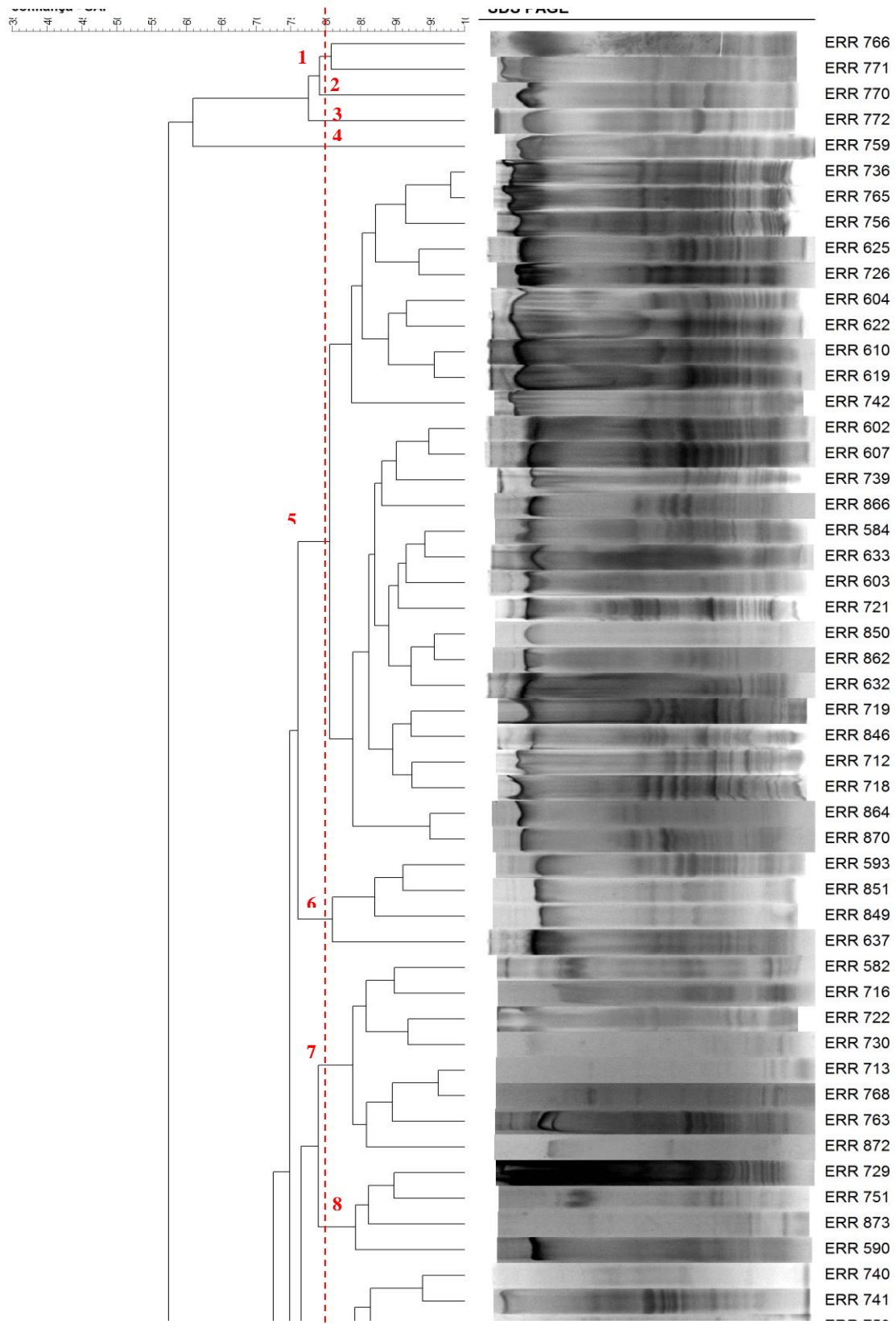


Continua...



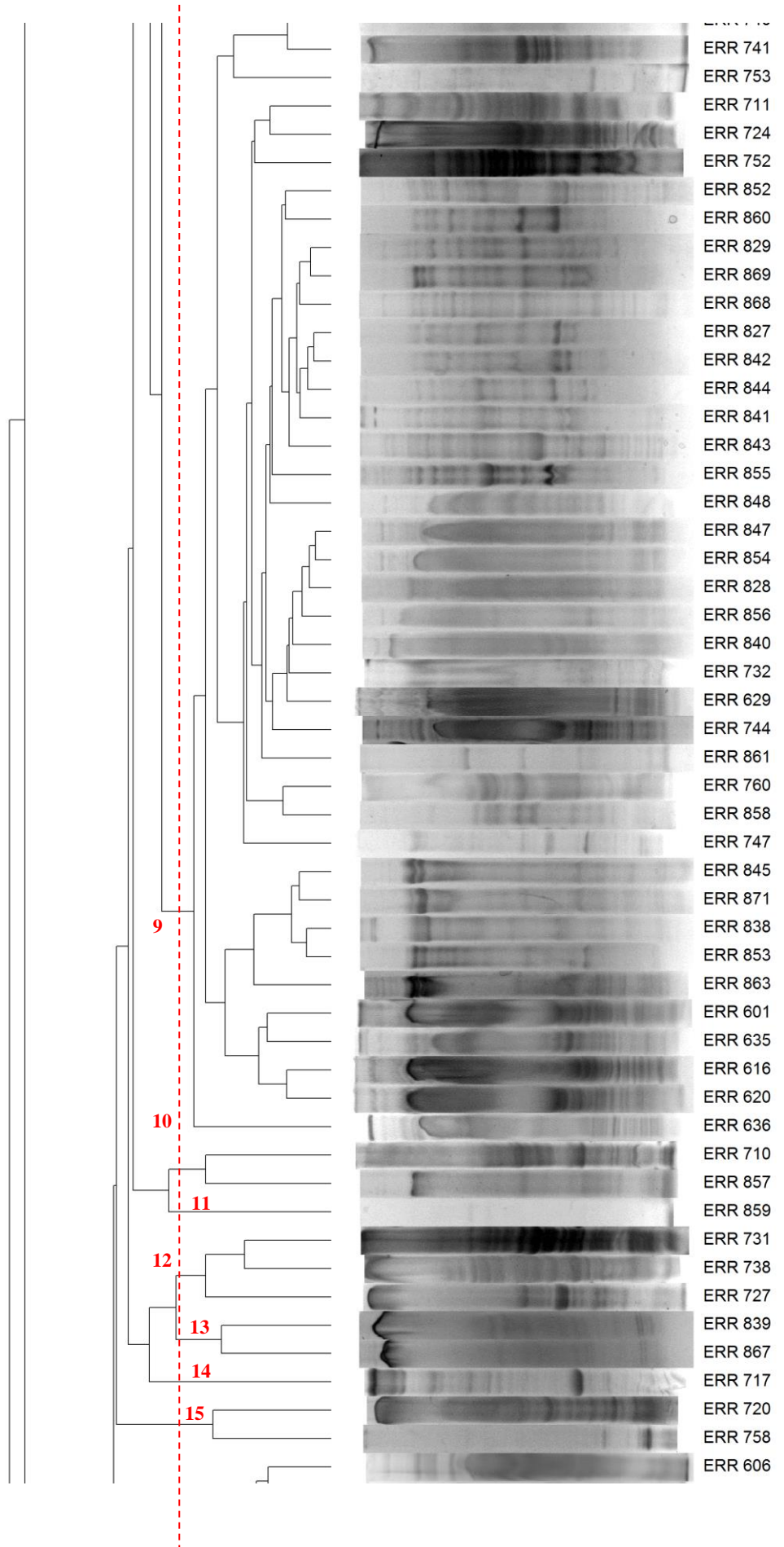


APÊNDICE L – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos da área de SAF.



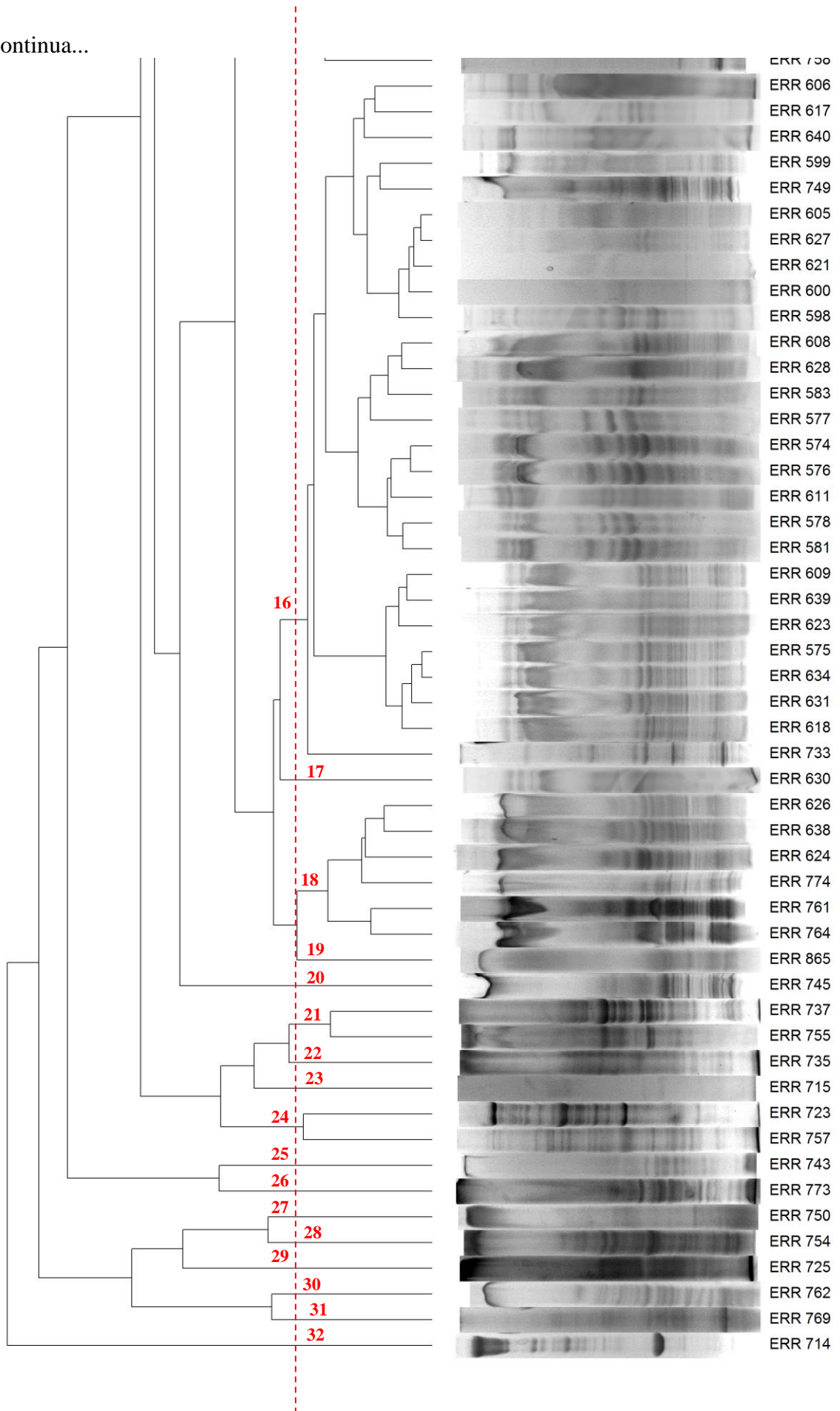
Continua...

Continua...

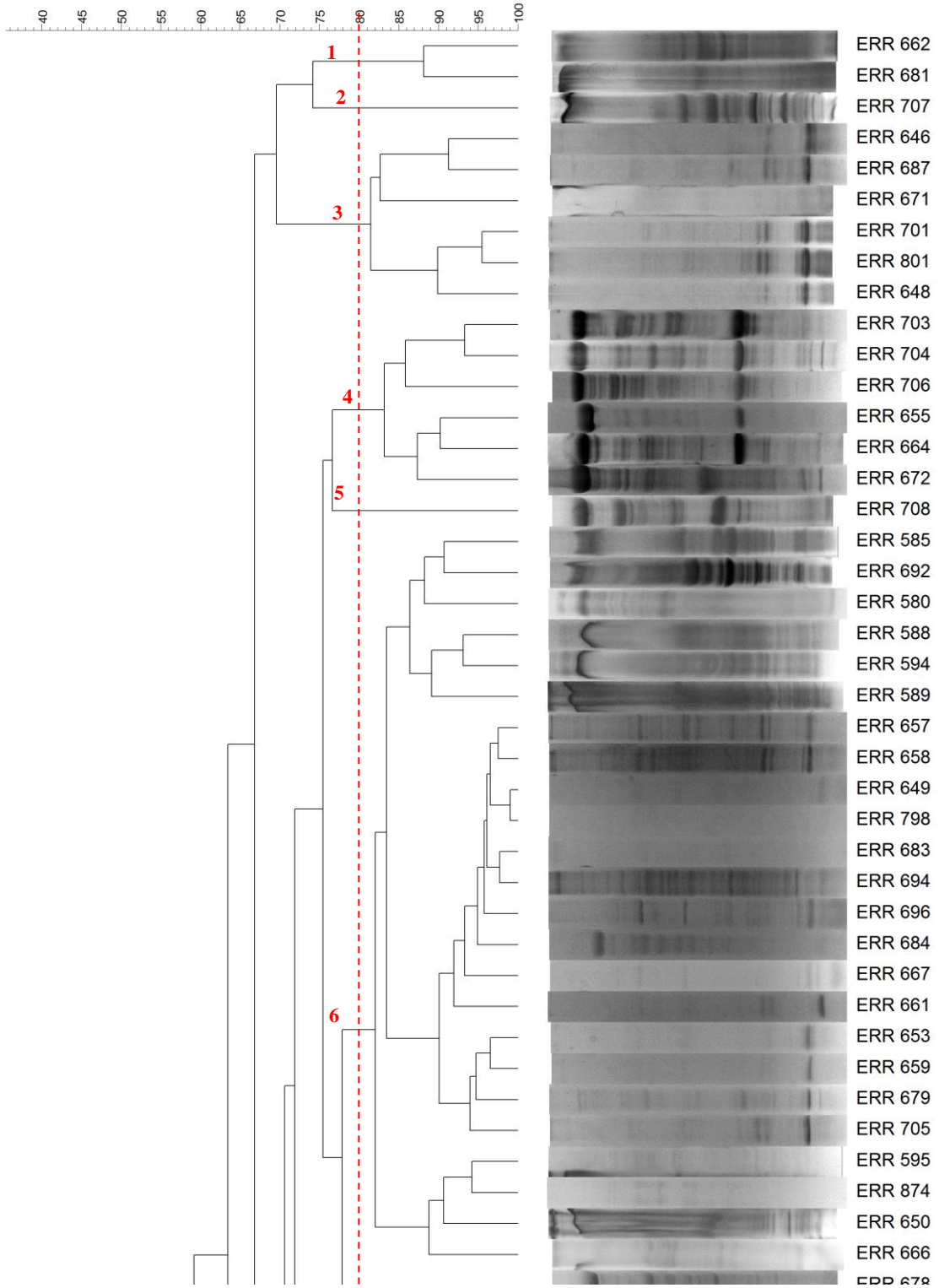


Continua...

Continua...

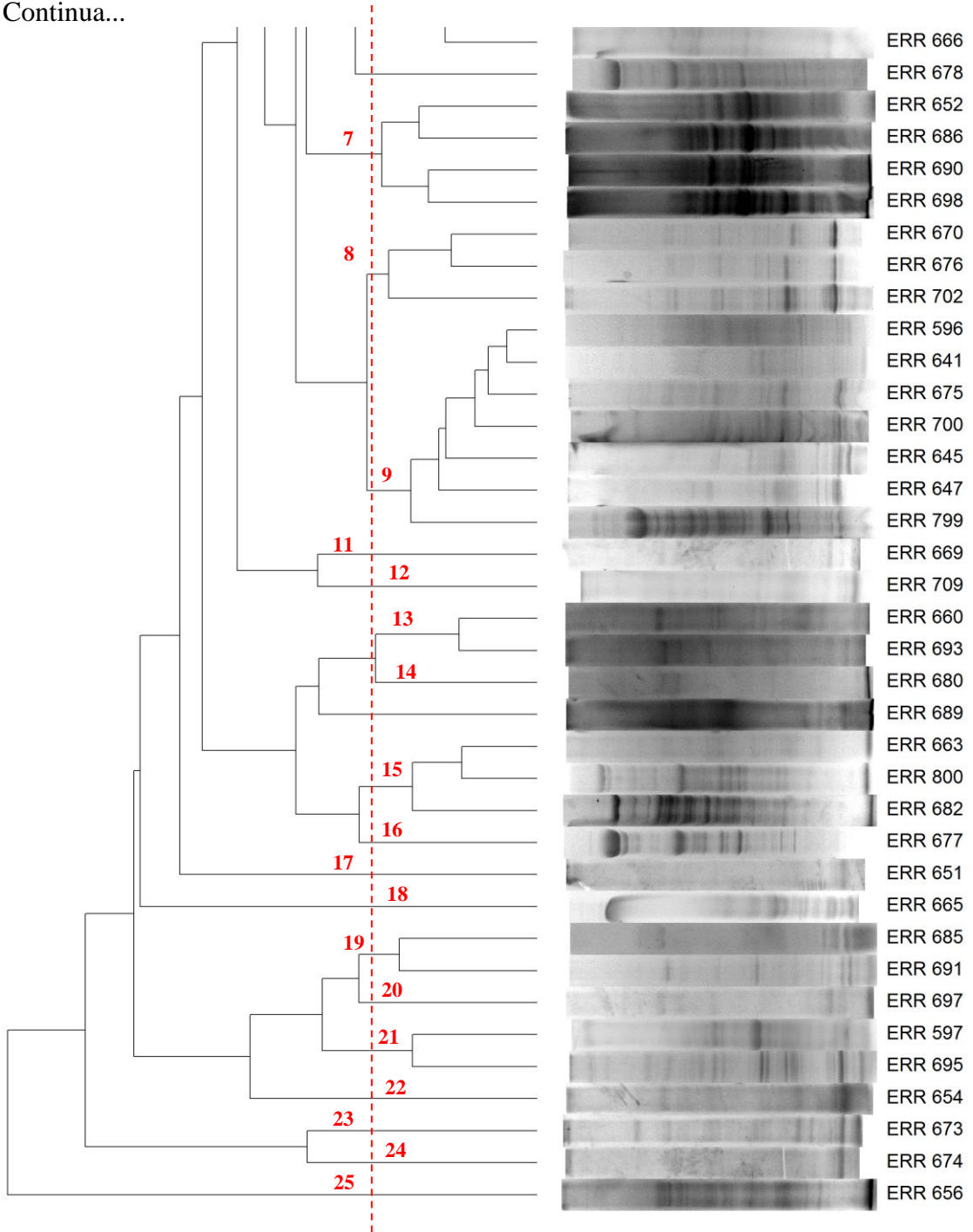


APÊNDICE M – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos de área monocultivo.

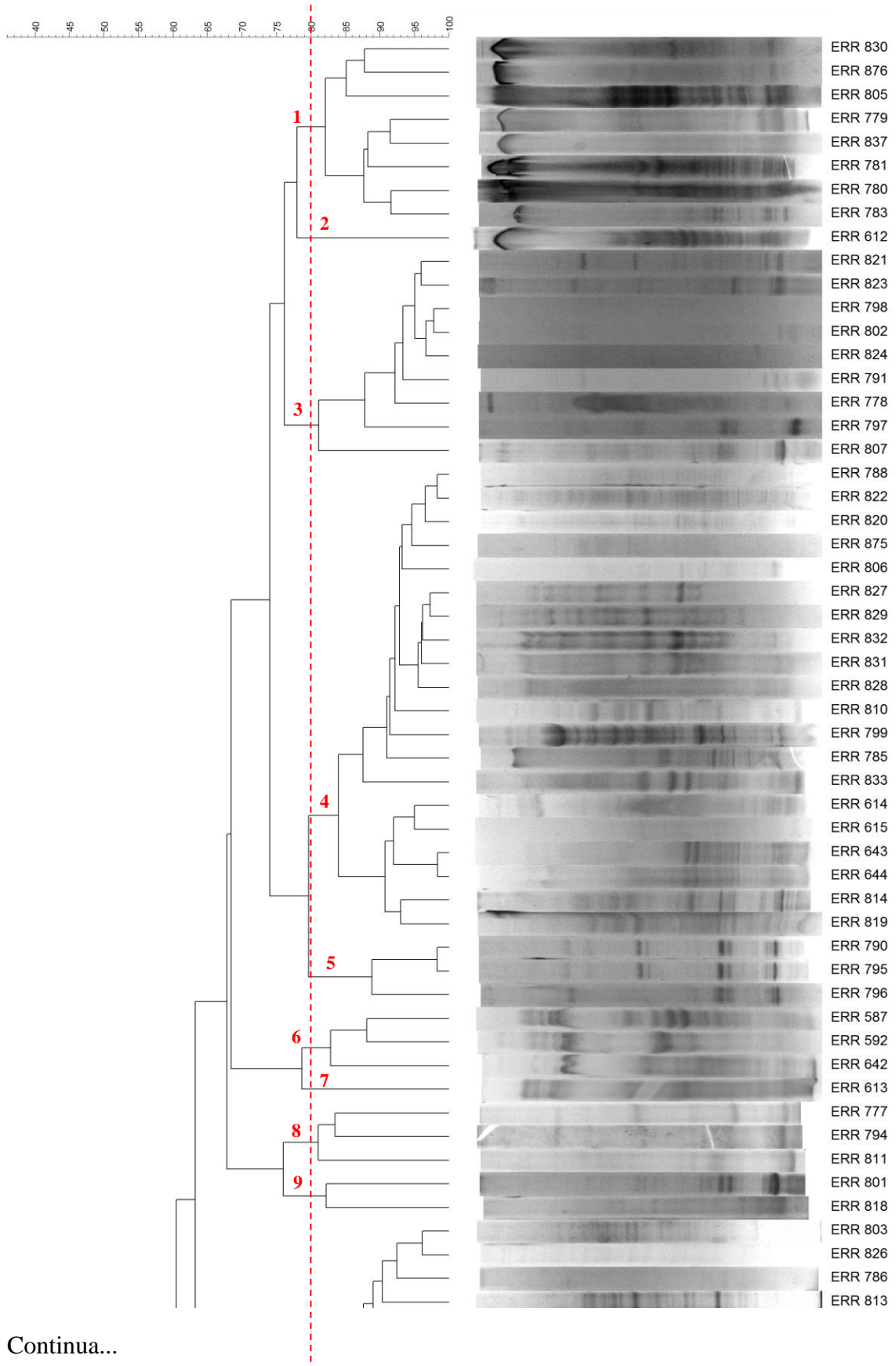


Continua...

Continua...

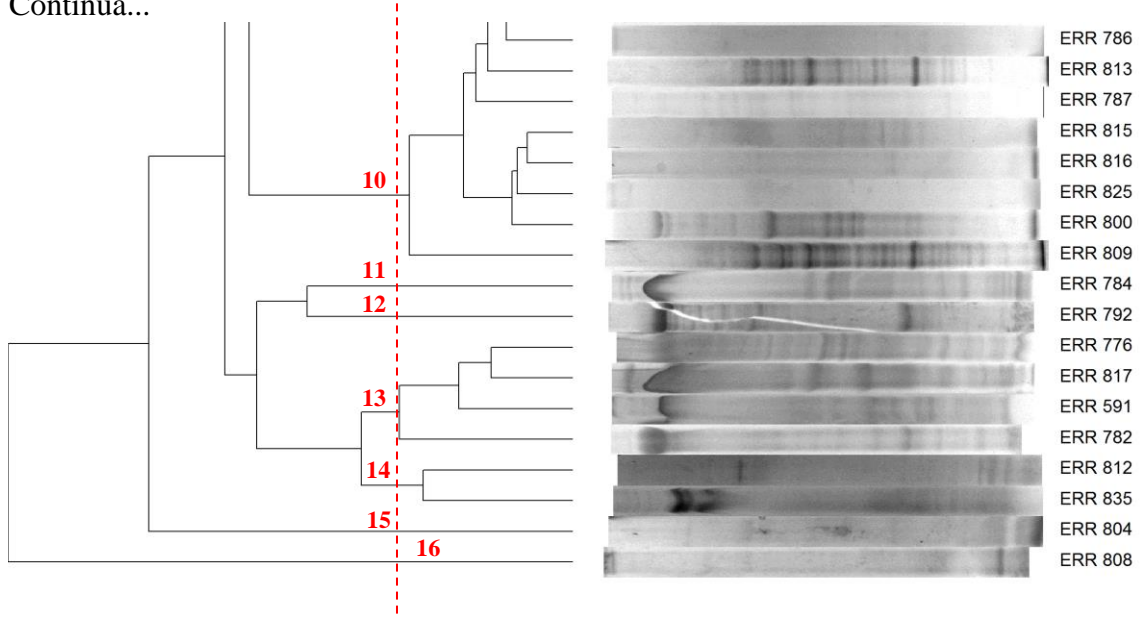


APÊNDICE N – Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados oriundos da área de nativa.



Continua...

Continua...



**ANEXOS**



ANEXO A – Protocolo utilizado no laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA RR para extração de proteína (SDS-PAGE)

### EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

1. Multiplique a bactéria em meio sólido adequado para cultivo da espécie a 28°C, para verificação da pureza.
2. Após ter certeza da pureza, repique colônias isoladas para o meio NAB sólido, a 28°C (para bactérias de crescimento rápido permanecer por 48h e as de crescimento lento por 72h.).
3. Com o auxílio de uma espátula, raspe uma quantidade generosa de muco, mas tendo o cuidado para não raspar o meio, e passe para tubos Eppendorf de 1,5 mL limpos e esterilizados.
4. Adicione 1 mL do tampão de tratamento da amostra e misture com misturador do tipo Vórtex.
5. Aqueça a mistura a 95°C por exatamente 15 min, esfrie e centrifugue em uma centrífuga a 10.000 rpm por 10 min.
6. Verta o sobrenadante (extrato de proteína), com o auxílio de uma pipeta, em dois tubos Eppendorf limpos. A parte maior para uso diário deve ser armazenada a -20°C, e parte menor para armazenamento mais longo, a -80°C por até 3 anos.

ANEXO B – Protocolo utilizado no laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA RR  
para preparação do gel SDS-PAGE

**PREPARAÇÃO GEL DE SDS-PAGE NAS PLACAS**  
**(Modificado de Laemmli, 1970)**

A) Preparação do gel de separação de 12% 80 mL.

1. Misture as soluções na seguinte ordem em um frasco limpo.
2. H<sub>2</sub>O (destilada) 26,8 mL
3. 1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação) 20 mL
4. Bis-Acrilamida (solução de monômeros) 32 mL
5. SDS 10% 800 µL
6. TEMED 40 µL
7. APS 10% ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 500 µL  
OBS.: o APS deve ser recém-preparado (fresco 1 hora, no máximo)
8. Misturar bem e verta 40 ml da solução imediatamente entre as placas de vidro. O nível de gel de separação deve ser, aproximadamente, 12,6 cm da base.
9. Cubra com 3 ml de água destilada para manter uma condição de anaerobiose e obter uma superfície plana.
10. Deixe polimerizar por 1h a temperatura ambiente.
11. Após 1 hora descarte a água destilada e prepare o gel de concentração 4%.

B) Preparação do gel de concentração de 4% 24 mL.

1. Misture as soluções na seguinte ordem em um frasco limpo.
2. H<sub>2</sub>O (destilada) 14,4 mL
3. 1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação) 6 mL
4. Bis-Acrilamida (solução de monômeros) 3,2 mL
5. SDS 10% 240 µL
6. TEMED 36 µL
7. APS 10% ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 120 µL  
OBS.: o APS deve ser recém-preparado (fresco 1 hora, no máximo)
8. Misturar bem e verta a solução imediatamente entre as placas de vidro.

9. Aplique a solução do gel de empilhamento (concentração) em cima do gel de separação polimerizado à temperatura ambiente.
10. Insira o pente entre as placas para formar de 15 ou 20 aberturas (poços).
11. Deixe polimerizar à temperatura ambiente por, aproximadamente, 35 min.
12. Remova o pente.

ANEXO C – Protocolo utilizado no laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA RR para eletroforese de proteína solubilizada com sds

**ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA COM SDS**

1. Após a remoção do pente, remova as placas do suporte horizontal e encaixe as placas no suporte vertical e faça o teste de vazamento.  
OBS. Utilize o tampão de corrida para passar nas borrachas do suporte vertical na hora de encaixar as placas para ter uma melhor vedação
2. Faça o teste de vazamento do suporte.
3. Preencha os poços até sua superfície com o tampão de corrida preparado fresco.
4. Marque as aberturas com números desejados e aplique extrato de proteína em cada um dos poços usando uma micropipeta. O volume a ser aplicado é em microlitros e depende da concentração do extrato de proteína.
5. Transfira o suporte com as placas para dentro da cuba cheia de tampão de corrida e preencha até a superfície do reservatório do suporte com o tampão de corrida.  
OBS. Certifique-se de que o local ao realizar a corrida seja bem frio (18° C), e preencha dentro do suporte vertical com etileno glicol a 20%.
6. Ligue a corrente a 100 MA para cada placa (correspondendo a aproximadamente 300 volts) e deixe correr a corrente constante até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 2 cm do final do gel de separação (comprimento total de gel de separação: aproximadamente 40 cm; comprimento total de gel de separação + empilhando gel / (fundo de aberturas): aproximadamente 10 cm).
7. Desligue a corrente e tire as placas da cuba.
8. Remova os grampos que seguram o gel, retire os espaçadores, insira uma espátula de plástico plana e empurre para soltar as placas de vidro.  
OBS. Nunca use um objeto de metal, o qual lascará as placas de vidro.
9. Descarte o gel de empilhando, deixe permanecer o gel de separação, faça a marca de início da aplicação das amostras e coloque o gel na solução de coloração.
10. Após 12 horas, retire o gel da solução de coloração e coloque na solução de descoloração (revelação), troque a solução caso precise, quando as bandas eletroforéticas estiverem nítidas, passe o resto do gel transparente para a solução de fixação e armazene sob refrigeração. Quanto for secar o gel, se ele estiver com o tamanho adequado, coloque-o na solução secante por aproximadamente 1 hora. Em um bastidor, coloque uma folha de

papel celofane umedecido em água destilada, coloque o gel e coloque outra folha de celofane, formando um sanduíche. Feche o bastidor, estique o papel e deixe secar. Caso o gel não esteja no tamanho adequado, deixe-o em água destilada por meia hora antes de colocar na solução secante.

## ANEXO D – Tampões e soluções para SDS PAGE

### 1. Tampão da amostra

5 mL de glicerol.

2,5 mL de Tris-HCl 0,6173 M, pH 6,8.

0,5 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 0,39 g de ditioneitol (DTT).

0,5 mL de solução de SDS 10%.

2,5 mg de azul-de-bromofenol.

Complete o volume para 25 mL com água destilada e armazene a solução, em alíquotas, em congelador.

### 2. Tris-HCl 0,6173 M, pH 6,8

7,475 g de Tris base.

Adicione aproximadamente 80 mL de água destilada e titule com HCl para pH 6,8.

Complete o volume para 100 mL, filtre a solução e armazene a temperatura ambiente.

### 3. Solução estoque SDS 10%

10 g de SDS.

Complete o volume para 100 mL com água destilada e armazene a temperatura ambiente.

### 4. Solução estoque de persulfato de amônio (APS)10%

0,1 g de APS para 1 mL de água destilada.

Use sempre solução fresca, preparada imediatamente antes do uso.

### 5. Tampão do gel de separação (1,5M)

18,17 g de Tris base

Adicione aproximadamente 50 mL de água destilada e coloque 24,2 mL de HCl 1,72M e titule até elevar o pH a 8,8.

Complete o volume para 100 mL, e armazene em geladeira a 4° C.

## **6. Tampão do gel de concentração**

6,057 g de Tris base

Adicione aproximadamente 50 mL de água destilada e coloque 29 mL de HCl 1,72M e titule até elevar o pH a 6,8.

Complete o volume para 100 mL, e armazene em geladeira a 4° C.

## **7. Solução de monômeros**

29,2 g de Acrilamida.

0,8 g de Bis-acrilamida.

Complete o volume para 100 mL, filtre e armazene em geladeira a 4° C, no escuro.

## **8. Tampão de corrida (Tampão Tris-Glicina)**

12,0 g de Tris base.

57,5 g de Glicina.

4 g de SDS.

Adicione aproximadamente 2 L de água destilada.

Complete o volume para 4 L. Não ajuste o pH. Filtre a solução e armazene em geladeira.

## **9. Revelação de proteínas totais**

### **9.1 Solução de coloração**

400 mL de Metanol.

70 mL de Ác. Acético.

0,25 g de Coomassie Blue R250.

Complete o volume para 1 L de água destilada.

## 9.2 Solução de descoloração

400 mL de Metanol.

70 mL de Ác. Acético.

Complete o volume para 1 L de água destilada.

## 9.3 Solução de fixação

450 mL de Metanol.

100 mL de Ác. Acético.

Complete o volume para 1 L de água destilada.

## 9.4 Solução secante

650 mL de Metanol.

5 mL de glicerol.

Complete o volume para 1 L de água destilada.



## ANEXO E – MEIOS DE CULTIVOS E SOLUÇÕES

**1. Meio NAB**

0,225 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

1,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

14 g de Agar Nutriente

Completar o volume para 500 mL de água destilada.

Não precisa medir o pH.

**2. Meio DYG'S (RODRIGUEZ NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986)**

2 g de Glicose.

2 g de Ácido málico.

1,5 g de Peptona bacteriológica.

2 g de Extrato de levedura.

0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

1,5 g de Ácido glutâmico.

Ajustar o pH para 6.5 com solução de KOH a 10%:

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar  $15 \text{ g L}^{-1}$  de ágar para meio sólido.

**3. Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983)**

5 g de Sacarose.

0,2 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

0,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

0,02 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

0,002 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

0,015 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

5 mL de Azul de bromotimol (0.5% em 0.2 N de KOH).

1 mL de solução de vitamina para meio de cultura.

Obs.: para meio de cultura sólido, adicionar 0,05 g de extrato de levedura

Ajustar o pH para 6 a 6,2 com solução de NaOH a 10%: ou HCl 10%.

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio sólido.

Adicionar 1,4 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio semissólido.

#### **4. Meio JMV (BALDANI, 1996)**

5 g de Manitol.

0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

1,8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

0,1 g de NaCl

0,02 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

2 mL de Azul de bromotimol (sol. 0.5% em 0.2N de KOH).

2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura.

0,015 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

Obs.: para meio de cultura sólido, adicionar 0,1 gr de extrato de levedura

Ajustar o pH para 5 a 5,5 com solução de NaOH a 10%: ou HCl 10%.

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio sólido.

Adicionar 1,6 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio semissólido.

#### **5. Meio NFB (DOBEREINER et al., 1995)**

5 g de Ácido málico.

0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

0,1 g de NaCl.

0,02 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

0,015 g de FeSO<sub>4</sub>.

2 mL de Azul de bromotimol (0.5% em 0.2N de KOH.).

1 mL de Vitamina para meio de cultura.

2 mL de Solução de micronutrientes para meio de cultura.

Obs.: para meio de cultura sólido, adicionar 0,05 gr de extrato de levedura

Ajustar o pH para 5 a 5,5 com solução de NaOH a 10%: ou HCl 10%.

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio sólido.

Adicionar 1,6 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio semissólido.

## **6. Meio NBRIP Ca (NAUTIYAL, 1999)**

0,25 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.

10 g de glicose

5 g de MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O

0,2 g de KCl.

0,1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

2,6 g de CaHPO<sub>4</sub>.

Ajustar o pH para 7 com solução de KOH a 10%: ou HCl 10%.

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio sólido.

## **7. Meio NBRIP Al (NAUTIYAL, 1999)**

0,25 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.

10 g de glicose.

5 g de MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O.

0,2 g de KCl.

0,1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

0,054 g de AlPO<sub>4</sub> (equivalente a 12 mg/L).

Ajustar o pH para 4,5 com solução de KOH a 10%: ou HCl 10%.

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g L<sup>-1</sup> de ágar para meio sólido.

## **8. Solução de micronutrientes**

0.200 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

0.235 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.

0.280 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

0.008 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

0.024 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Complete o volume com 200 mL de água destilada.

Guardar na geladeira.

### **9. Solução de vitamina para meio de cultura**

10 mg de Biotina.

20 mg de Pyridoxol-HCL.

Dissolver os reagentes em banho maria.

Complete o volume com 100 mL de água destilada.

Guardar na geladeira.

