

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS –  
AGRONOMIA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E TRAÇOS  
FUNCIONAIS DE MICRO-ORGANISMOS RIZOSFÉRICOS E  
ENDOFÍTICOS DE *Butia archeri* Glassman

Autora: Liliane Círa Pinheiro

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias - Agronomia no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

RIO VERDE – GO

Novembro, 2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema Integrado de Bibliotecas –SIBI/IF Goiano Campus Rio Verde**

P645i Pinheiro, Liliane Círa

Isolamento, caracterização e traços funcionais de micro-organismos rizosféricos e endofíticos de *Butia archeri* Glassman / Liliane Cira Pinheiro. - 2014.  
57fls :il, fig., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias –Agronomia, Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, 2014.

1. *Butia archeri* Glassman. 2. Micro-organismos endofíticos e rizosféricos. 3. Diversidade. 4. Traços funcionais. I. Souchie, Edson Luiz. II. Título.

CDD 589.2

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E TRAÇOS  
FUNCIONAIS DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E  
RIZOSFÉRICOS DE *Butia archeri* (Glassman) Glassman**

Autora: Liliane Círa Pinheiro  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração  
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 28 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares  
Avaliador externo  
UFMT-Câmpus Cuiabá

Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
Avaliador interno  
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
Presidente da banca  
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me permitido chegar até aqui e, principalmente, pela capacidade de executar esta etapa de minha vida acadêmica.

À Olivia Pinheiro de A. Moraes, minha mãe e, além de tudo, meu maior tesouro na vida, responsável por tudo que hoje eu sou e pelo que conquistei até aqui. Por seu imenso amor, agradeço muito, mamãe.

Aos meus queridos irmãos Francisco das Chagas Pinheiro, Vanuza Aurea Pinheiro e João Gutemberg Pinheiro, pelas palavras de encorajamento em todo esse tempo. Ao Maykon Alves Souza, namorado, companheiro e acima de tudo amigo, que escolheu caminhar ao meu lado, apoiando-me durante essa difícil jornada.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Souchie, que é um exemplo de pessoa a ser seguido, profissional e acima de tudo um grande ser humano, agradeço pela orientação, pelo grande incentivo, amizade e confiança até aqui.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcos Antônio Soares, pela orientação e importantes sugestões nos trabalhos.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola, que de alguma forma contribuíram com os trabalhos, por sua amizade e companheirismo, agradeço.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana da UFMT em Cuiabá- MT, que foram muito importantes para a realização desse trabalho. Sem a ajuda e compreensão de vocês, isto não seria possível. Meu muito obrigado.

A todos os verdadeiros amigos que torceram para essa conquista, e a todos que contribuíram de alguma forma, sou imensamente grata!

*“O maior líder é aquele que reconhece a sua pequenez, extrai força da sua humildade e experiência da fragilidade”.*

**Augusto Cury**

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Liliane Círa Pinheiro, natural de Maurilândia – GO, filha de Olívia Pinheiro de Araújo Moraes e João Bosco Pinheiro de Moraes (*in memoriam*), graduada em Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado pela Fesurv – Universidade de Rio Verde, em 2011. Em julho de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia (Mestrado) do IF Goiano – Campus Rio Verde.

## SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIACÕES.....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
RESUMO GERAL.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
3. OBJETIVOS GERAIS .....	19
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS E FUNGOS DETERIORADORES, ENDOFÍTICOS E RIZOSFÉRICOS DE <i>Butia archeri</i> Glassman.....	20
RESUMO .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1 Coleta e processamento das raízes .....	24
2.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos, rizosféricos e fungos deterioradores de sementes .....	24
2.3 Manutenção do banco de micro-organismos.....	26
2.4 Identificação molecular dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos .....	26
2.5.1 Isolados bacterianos .....	26
2.5.2 Isolados fúngicos.....	28
2.6 Análise dos dados.....	24
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Diversidade.....	27
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
CAPÍTULO II.....	38
TRAÇOS FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS E FUNGOS RIZOSFÉRICOS E ENDOFÍTICOS DE <i>Butia archeri</i> Glassman .....	39
RESUMO .....	40
1. INTRODUÇÃO .....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	43

2.1	Teste qualitativo da solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio sólido.....	42
2.2	Quantificação da solubilização em meio líquido de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ .....	43
2.3	Curva de calibração dos meios com $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ .....	44
2.4	Curva de solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ por isolados bacterianos e fúngicos.....	45
2.5	Avaliação qualitativa e quantitativa da produção de ácido indol acético (AIA) por microorganismos endofíticos e rizosféricos de <i>Butia archeri</i> .....	45
2.6	Curva de calibração de AIA.....	46
2.7	Curva de produção de AIA pelos isolados bacterianos.....	46
3.	RESULTADOS.....	48
4.	DISCUSSÃO.....	50
5.	CONCLUSÕES.....	51
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$\mu\text{L}$	Microlitro
AIA	Ácido indolacético
AN	Ágar nutriente
BDA	Ágar batata dextrose
$\text{CaHPO}_4$	Fosfato de cálcio
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
$\text{FePO}_4$	Fosfato de ferro
HCl	Ácido clorídrico
HCN	Ácido cianídrico
H'	Índice de Shannon
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat Amplification
ITS	Internal Transcribed Spacer
M	Molar
mL	Mililitro
MSF	Micro-organismo solubilizador de fosfato
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
pH	Potencial de hidrogênio
rDNA	DNA recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
UFC	Unidade formadora de colônia

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região 16S.....25

Tabela 2. Identificação molecular de isolados fungicos endofíticos, rizosféricos e deterioradores de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região ITS.....26

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por fungos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*.....42

Tabela 2. Solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por bactérias endofíticas e rizosféricas de *B. archeri*.....43

Tabela 3. Produção de ácido indol-acético (AIA) *in vitro* por bactérias endofíticas e rizosféricas de *B. archeri*.....43

Tabela 4. Avaliação de bactérias antagônicas ao fungo *Aspergillus niger*.....44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto visual de folhas e flores de *Butia archeri* Glassman (A). Planta jovem, (viveiro Flora vivo) (B). ..... 14

### CAPÍTULO II

Figura 1. Curva de calibração dos meios de cultura para solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ .....39

Figura 2. Curva de calibração do meio de cultura para a síntese de AIA.....41

## RESUMO GERAL

A palmeira *Butia archeri* (Arecaceae), conhecida como butiá, é de grande interesse no paisagismo e jardinagem, além de fazer parte da alimentação do homem na forma de frutos e até de produtos elaborados, como doces, bebidas e óleos. Entretanto, sua propagação é desfavorecida nos ambientes diversos, por causa da intensa depredação pela fauna, desmatamentos, construções de estradas e de hidrelétricas. O aumento da oferta de mudas de Arecaceas contribui diretamente na melhoria da qualidade ambiental, na absorção de CO<sub>2</sub>, na qualidade paisagística das cidades, no aumento das florestas de palmeiras e na obtenção de óleo dos frutos para a indústria de biodiesel. Com este trabalho, objetivou-se desenvolver processos para maximizar a formação de mudas da espécie butiá por meio do(a): a) isolamento de micro-organismos rizosféricos e endofíticos; b) seleção de micro-organismos quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e ferro, produção de ácido indolacético (AIA) e antibiose a micro-organismos deterioradores de sementes; c) microbiolização de sementes para avaliar sua capacidade de inibição à deterioradores de sementes e benefício à germinação. Foi observado que bactérias e fungos estão presentes no ambiente endofítico e rizosférico, sendo detectada maior frequência e diversidade de espécies endofíticas. Oito gêneros bacterianos endofíticos e três rizosféricos pertencentes a três filos: Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes e ainda cinco gêneros fúngicos endofíticos e dois rizosféricos, pertencentes a um único filo (Ascomycota), foram detectados no ambiente endofítico e rizosférico de butiá. Os isolados bacterianos se destacaram pela maior capacidade de solubilização de CaHPO<sub>4</sub> do que FePO<sub>4</sub> e ainda por sintetizarem AIA. Dois isolados bacterianos foram capazes de inibir o crescimento de um fungo deteriorador de sementes de *B. archeri*.

**Palavras-chave:** rizosfera, formação de mudas, solubilização de fosfatos, antibiose.

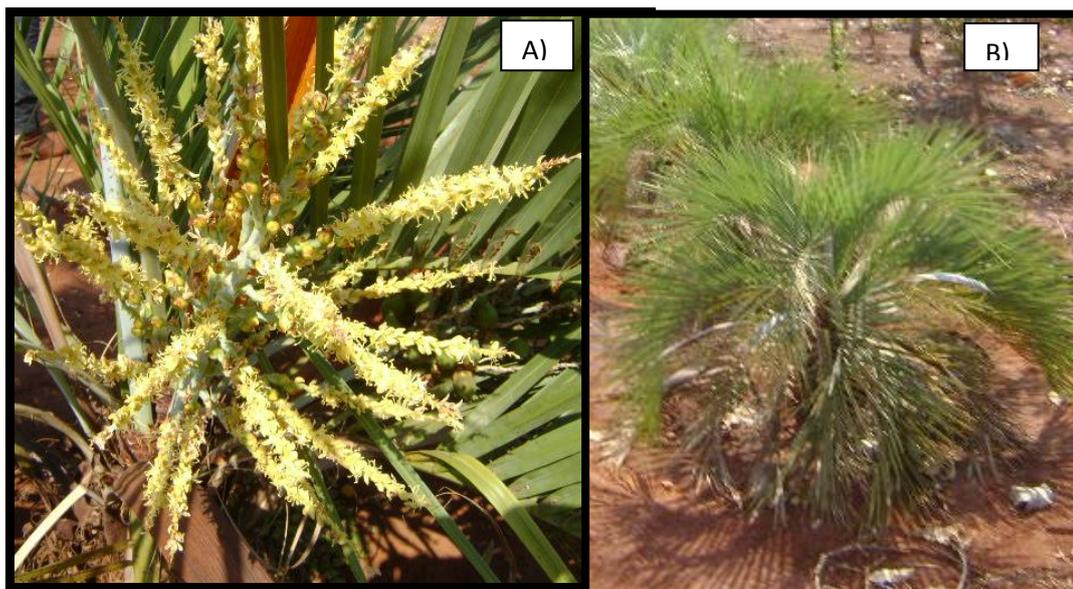
### GENERAL ABSTRACT

Palm *Butia archeri* (Arecaceae), known as “butiá”, is of great interest for landscaping and gardening. Their fruits and other products as candy, beverages and oils are also appreciated on human feeding. However, its propagation is disadvantaged in many environments, due to intense predation by wildlife, deforestation, roads and hydroelectric constructions. The increased supply of Arecaceae seedlings contributes directly to the improvement of environmental quality, absorption of CO<sub>2</sub>, landscape of the cities, increase of palm forests and oil production for the biodiesel industry. This work aimed to: a) isolate rhizospheric and endophytic microorganisms; b) microorganisms selection by the ability of calcium and iron phosphate solubilization, production of indole acetic acid (IAA) and antibiosis to spoilage microorganisms seeds; c) seed microbiolization to evaluate their spoilage inhibition capacity of seeds and benefit of seed germination. Bacteria and fungi were observed in the rhizosphere and endophytic environment, where endophytic species had the highest frequency and diversity. From the rhizosphere and endophytic environment of butia, eight endophytic and three rhizospheric bacteria genera, belonging to three phyla: Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes and five endophytic fungal genera and two rhizospheric, belonging to Ascomycota were detected. The bacteria isolate showed the higher CaHPO<sub>4</sub> solubilization capacity than FePO<sub>4</sub> as well as IAA synthesis. Two bacteria isolates were capable of inhibiting the growth of a deleterious fungus seeds of *B. archeri*.

**Key words:** rhizosphere, seedling production, phosphate solubilization, antibiosis.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Arecaceae possui aproximadamente 189 gêneros e 3000 espécies (Uhl e Dransfield, 1999). Lorenzi et al. (1996) citam 29 gêneros e 132 espécies para o Brasil. A espécie *Butia archeri* Glassman, da família Arecaceae, popularmente conhecida como coqueirinho-do-campo ou butiá (Figura 1), é uma palmeira solitária, com caule subterrâneo ou aéreo, com até 1,3 m de altura e 10-20 cm de diâmetro recoberto pelos remanescentes fibrosos das folhas. Esta espécie tem grande potencial para uso no paisagismo e jardinagem, porém tem grande dificuldade de germinação e seu crescimento é lento. Sua distribuição ocorre nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo no domínio Cerrado e em campo Cerrados de altitude (campos rupestres), a pleno sol, geralmente em solos arenosos e rochosos (Lorenzi et al., 2010).



**Figura 1.** Aspecto visual de folhas e flores de planta jovem de *Butia archeri* Glassman (A) e planta jovem cultivada no viveiro Flora Vivo, em Rio Verde, GO (B).

A propagação desta espécie é desfavorecida nos ambientes diversos por causa da intensa depredação pela fauna, desmatamentos, construções de estradas e de

hidrelétricas. O aumento da oferta de mudas de palmeiras contribuirá diretamente na melhoria da qualidade ambiental, na absorção de CO<sub>2</sub>, na qualidade paisagística das cidades, no aumento das florestas de palmeiras e na obtenção de óleo dos frutos para a indústria de biodiesel (Rubio Neto, 2010; Rubio Neto et al., 2011).

A principal forma de propagação na família Arecaceae é a sexuada. No entanto, é comum que esse processo seja lento, irregular e com baixas porcentagens. Muitos autores acreditam que isto esteja relacionado, principalmente, ao mecanismo de dormência física imposta pelo tegumento que, por ser bastante lignificado, dificulta a absorção de água e, conseqüentemente, a embebição da semente. Por isso, recomenda-se a utilização de tratamentos que facilitem a absorção de água, como a escarificação mecânica na região do hilo (Rubio Neto, 2010).

No entanto, tal processo, bem como o de extração da semente, causa pequenos ferimentos no seu tegumento, gerando aberturas para micro-organismos saprofíticos (fungos e bactérias), durante os testes de germinação e de emergência, o que implica em expressiva redução do número de plantas viáveis (Rubio Neto, 2010; Rubio Neto et al., 2011). Além da dormência física, esta espécie também apresenta dormência fisiológica, requerendo estudos para a superação da mesma.

Uma forma de contornar tal problema consiste no estudo de estratégias para maximizar a promoção do crescimento de plântulas de Arecáceas, na fase de viveiro, por meio da seleção e uso de micro-organismos rizosféricos e endofíticos benéficos. Tal estratégia é promissora já que favorece o controle de micro-organismos patogênicos, incrementa a resistência ao estresse hídrico e reduz o custo final das mudas.

A promoção do crescimento de plantas é um dos benefícios da aplicação destes micro-organismos (Silva et al., 2006; Saravanan et al., 2007). Tal habilidade tem sido atribuída a mecanismos diretos, tais como: fixação do nitrogênio, maior disponibilidade de fósforo (P), produção de fitormônios e também a mecanismos indiretos como: antagonismo em relação a patógenos, levando, conseqüentemente, ao aumento na taxa de germinação, crescimento das raízes e de parte aérea, número de folhas e flores, área foliar e rendimento de culturas (Silveira, 2001). Diversos micro-organismos rizosféricos possuem a habilidade de incrementar o desenvolvimento vegetal, pela produção de fitormônios, pela solubilização de fosfatos ou ainda por exercer controle biológico sobre fitopatógenos. Os micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) são capazes, por meio de mecanismos específicos, de extrair ou solubilizar P de frações insolúveis no solo e de fosfatos inorgânicos naturais pouco

solúveis, favorecendo a nutrição e o desenvolvimento vegetal. Já as espécies rizosféricas produtoras de fitormônios também incrementam o desenvolvimento de plântulas, em nível de viveiro, maximizando seu estabelecimento em campo. Além dos MSF e dos produtores de AIA, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorecem direta e indiretamente a nutrição e o desenvolvimento vegetal e possuem forte interação com os grupos microbianos supracitados.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUENTES-RAMIREZ, L E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* an indolacetic acid producing bacteria from the sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p.145-150, 1993.

LORENZI, H. SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; VON BEHR, N. **Palmeiras no Brasil Nativas e Exóticas**. Editora Plantarum, Nova Odessa. 1996.

LORENZI, H.; KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae** (Palmeiras). Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.159-160, 2010.

RÚBIO NETO, A. Superação da dormência em sementes de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges ex Mart.]. **Dissertação de Mestrado em Agronomia. UFG.** 2010.

RÚBIO NETO, A.; SILVA, F. G.; SALES, J. F.; REIS, E. F.; SILVA, M. V. V.; SOUZA, A. L. Drying and imbibition of macaw palm [*Acrocomiaaculeata* (Jacq.) Loddiges ex MART.] fruits and seeds. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 34, p. 179-185, 2011.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J. et al. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, p. 130-140, 2007.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annonas quamosa* L.) **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: R. Barros & S.J. Michereff. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE, p. 71-100, 2001.

UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. Genera palmarum after ten years. In Evolution, variation, and classification of palms (A. Henderson & F. Borchemius, eds.). **New York Botanical Garden**, New York, p. 245-253, 1999.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Isolar, caracterizar e selecionar micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*, visando maximizar a formação de suas mudas.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar e identificar a diversidade genética, através de técnicas de biologia molecular, de micro-organismos endofíticos e rizosféricos cultiváveis de butiá.
- Avaliar o potencial de isolados rizosféricos e endofíticos de butiá na solubilização de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio.
- Quantificar a síntese de AIA por isolados rizosféricos e endofíticos.
- Testar a capacidade de inibição a fungos deterioradores de sementes por bactérias promotoras do crescimento vegetal.

## **CAPÍTULO I**

### **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS, RIZOSFÉRICOS E DETERIORADORES DE *Butia archeri* Glassman**

**RESUMO** – A diversidade e atividade dos micro-organismos do solo em espécies vegetais não são ainda suficientemente conhecidas. Dessa forma, a caracterização e o conhecimento da diversidade microbiana rizosférica e endofítica é relevante para avaliar a capacidade de favorecer o crescimento da palmeira *Butia archeri*. Com o presente trabalho, objetivou-se isolar e identificar a diversidade genética, através de técnicas de biologia molecular, de micro-organismos endofíticos e rizosféricos cultiváveis de *B. archeri*. As raízes de *B. archeri* retiradas da planta cultivada em viveiro natural foram escolhidas aleatoriamente para o isolamento dos micro-organismos. Para tanto, foram pesadas 10g de raiz e feito o isolamento utilizando meio de cultura BDA (ágar batata dextrose). Posteriormente, bactérias crescidas nesse meio foram repicadas em placas contendo meio de cultura específico (ágar nutriente). Já os fungos foram repicados em placas contendo BDA. Após o isolamento, os micro-organismos foram identificados pelo sequenciamento de fragmentos do rDNA das bactérias e fungos. As extrações de DNA, amplificação e sequenciamento foram feitos de acordo com Rosa (2008) e as sequências foram analisadas utilizando o programa BLASTn (versão 2.215). Foi detectado que bactérias e fungos estão presentes no ambiente endofítico e rizosférico, com maior frequência e diversidade de espécies endofíticas. Oito gêneros bacterianos endofíticos e três rizosféricos pertencentes a três filos: Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes e ainda cinco gêneros fúngicos endofíticos e dois rizosféricos, pertencentes a um único filo, Ascomycota, foram detectados no ambiente endofítico e rizosférico de butiá.

**Palavras-chave:** rizosfera, Cerrado, diversidade microbiana, Arecaceae.

### ABSTRACT

The diversity and activity of soil microorganisms in plant species are not yet sufficiently known. Thus, the characterization and the knowledge of rhizospheric and endophytic microbial diversity are relevant to evaluate the ability to enhance the growth of *Butia archeri*. This work aimed to isolate and identify the genetic diversity, through techniques of molecular biology, of endophytic and rhizospheric cultivated microorganisms of *B. archeri*. The roots of *B. archeri* collected from the seedling cultivated in nursery were randomly chosen for microorganism isolation. So, 10g of root were weighed for the isolation using PDA culture medium (potato dextrose agar). Subsequently, bacteria grown in this medium were purified to Petri plates containing specific culture medium (nutrient agar). The fungi were transferred to Petri plates containing PDA. After isolation, the microorganisms were identified by sequencing of the rDNA fragment of bacteria and fungi. DNA extraction, amplification and sequencing were performed according to Rose (2008) and sequences analyzed using the BLASTn program (version 2.215). We have detected that bacteria and fungi are present in endophytic and rhizosphere environment, with higher frequency and diversity of endophytic species. From the rhizosphere and endophytic environment of *B. archeri*, eight endophytic and three rhizospheric bacteria genera, belonging to three phyla: Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes and five endophytic fungal genera and two rhizospheric, belonging to Ascomycota were detected.

**Key words:** rhizosphere, Cerrado, microbial diversity, Arecaceae

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Butia archeri* Glassman, conhecida popularmente como coqueirinho-do-campo ou butiá, está distribuída nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Possui grande interesse pelo mercado paisagístico e de biocombustível, mas tem dificuldades de germinação de suas sementes e formação de mudas. Os micro-organismos endofíticos e rizosféricos podem favorecer o crescimento vegetal de diversas formas: disponibilizar maior quantidade de nutrientes à planta, produzir ou induzir a planta a sintetizar fitormônios essenciais ao seu desenvolvimento ou conferir defesa contra patógenos.

Segundo Kogel et al. (2006), micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam a parte interna das plantas, aparentemente, sem causar alterações visíveis a seus hospedeiros, o que lhes diferenciam dos micro-organismos fitopatógenos. Embora os Micro-organismos endofíticos sejam conhecidos há algum tempo, atualmente tomam maior evidência, devido às habilidades de beneficiar, direta ou indiretamente, a nutrição e o crescimento vegetal. Bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas são bastante estudadas, pela sua importância na agricultura, principalmente, pela capacidade de fixação de nitrogênio (Souza et al., 2004).

Os micro-organismos vivem no solo na forma de comunidade complexa, e uma grande variedade de interações é desenvolvida. A rizosfera é a região do solo que está sob influência direta das raízes, com características peculiares em relação ao solo, sendo a região em que ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas (Dantas et al., 2011).

Os fungos desempenham uma série de importantes funções ecológicas, porém, o atual entendimento sobre a biodiversidade fúngica no solo, ainda é limitado. A extração do DNA, juntamente com a reação em cadeia da polimerase e técnicas de criação de perfil da comunidade, tem sido bem sucedidas em investigações de ecologia bacteriana e mostram grande potencial para elucidar as características taxonômicas e funcionais das comunidades fúngicas do solo (Anderson et al., 2004).

De acordo com Bensch et al. (2012), a taxonomia morfológica contribui muito para o esclarecimento da diversidade de fungos endofíticos, mas a utilização de métodos de identificação molecular é que se mostra como excelente ferramenta para a identificação de morfoespécies.

Tendo em vista que mudas de butiá possuem grande interesse econômico, é estratégica a descoberta de mecanismos que aumentem consideravelmente a produção dessas mudas. Para isto, justifica-se a identificação molecular de micro-organismos com potencial de promoção do crescimento desta espécie arbórea. Com este trabalho, objetivou-se isolar e caracterizar geneticamente bactérias e fungos endofíticos e rizosféricos de butiá.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e processamento das raízes**

Coletou-se o sistema radicular de um indivíduo de butiá, nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 17° 35' 10.51" S, longitude 50° 59' 13.06" O e altitude de 822 m, em Rio Verde, GO. O indivíduo escolhido não apresentava sintomas aparentes de doença. As raízes obtidas foram retiradas com o auxílio de enxadão, colocadas em recipiente plástico com a devida identificação e transportadas até o Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Campus Rio Verde. Em seguida, foram feitos os isolamentos e as demais etapas de purificação e estocagem em geladeira a -80 °C.

### **2.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos, rizosféricos e fungos deterioradores de sementes**

Para isolamento de micro-organismos rizosféricos, 10g de fragmentos das raízes, escolhidos aleatoriamente, foram agitados em água peptonada esterilizada contendo Tween 80 (0,1%), por 30 min a 70 rpm, a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi diluído serialmente em solução salina e alíquotas de 50 µL foram semeadas, pela técnica *pour plate*, utilizando aproximadamente 20 mL de meio GELP em cada placa (Sylvester-Bradley et al., 1982). As placas foram incubadas em temperatura ambiente. O crescimento de micro-organismos e o aparecimento de halos de solubilização de CaHPO<sub>4</sub> foram avaliados no quarto dia após o plaqueamento. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) totais e solubilizadoras de fosfato foram contabilizados e os ajustes de diluição realizados para expressão dos resultados

em UFC/g de raiz. Colônias solubilizadoras de  $\text{CaHPO}_4$  foram isoladas para purificação e estocagem.

No isolamento dos micro-organismos endofíticos, fragmentos de raízes das espécies foram enxaguados em água corrente para retirada do excesso de solo aderido. Em seguida, tais fragmentos foram agitados em 1% de detergente neutro a 70 rpm, durante 10 min, a fim de reduzir o número de micro-organismos epifíticos. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente por enxágues sucessivos, em soluções de etanol (70%), hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo) e etanol (70%) por 1 min, 5 min e 30 segundos, respectivamente. Para retirar o excesso das substâncias químicas, três enxágues sucessivos em água destilada autoclavada foram realizados, e 500  $\mu\text{L}$  da água do último enxágue foram coletados para avaliação do processo de desinfestação. Os fragmentos desinfestados foram cortados em aproximadamente 1 cm de comprimento e depositados em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA). O crescimento dos micro-organismos endofíticos foi acompanhado por 10 dias. A frequência de colonização foi avaliada, considerando a porcentagem de fragmentos apresentando pelo menos um endofítico em relação ao total de fragmentos analisados, conforme fórmula abaixo.

$$\text{Frequência de Colonização} = \frac{\text{N}^\circ\text{fragmentos positivos}}{\text{Total de fragmentos}} \times 100$$

Para o isolamento dos fungos deterioradores de sementes, foram utilizadas sementes de butiá colocadas para germinar no Laboratório de Sementes da instituição e levadas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola.

Em seguida, foram retirados pequenos fragmentos de fungos crescidos em torno das sementes e cultivados em placa com três tipos de meio de cultura (papel germitest, areia e placa de Petri com papel mata borrão) e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA. Em seguida, foram purificados por retirada de fragmentos da borda do micélio, mantidos em tubos contendo meio BDA e estocados sob refrigeração.

### **2.3 Purificação e estocagem das linhagens de micro-organismos**

Isolados bacterianos foram purificados pela técnica da semeadura por estria em meio ágar nutriente (AN). Colônias isoladas foram repicadas para tubos contendo AN e mantidas sob refrigeração a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Os fungos esporulantes foram isolados por purificação monospórica e aqueles sem diferenciação de estruturas reprodutivas, obtidos com a retirada de fragmentos da borda do micélio. Em seguida, foram mantidos em tubos contendo meio BDA, sob refrigeração em geladeira.

Uma réplica do banco de micro-organismos foi mantida no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM) do Instituto de Biociências da UFMT (Cuiabá) para segurança, manutenção e posteriores avaliações juntamente com o Laboratório de Microbiologia Agrícola.

## **2.4 Manutenção do banco de micro-organismos**

Os fungos e bactérias obtidos foram purificados em meios de cultura sob refrigeração e reativados mensalmente para manutenção de sua viabilidade. Os fungos foram separados em grupos morfológicos e as lâminas obtidas por microcultivo foram feitas para auxiliar em sua identificação.

## **2.5 Identificação molecular dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos**

Foram utilizadas técnicas de biologia molecular em que os isolados bacterianos foram submetidos ao ERIC - PCR e os isolados fúngicos ao ITS para sua identificação. O sequenciamento genético dos isolados foi feito para definição de gênero e espécie. Os trabalhos foram conduzidos no LABEM da UFMT.

### **2.5.1 Isolados bacterianos**

Para a extração do DNA dos isolados bacterianos, estes foram crescidos em caldo nutriente (*over night*), 1 mL de cada cultura foi colocado em tubos de *ependorf* de 1,5 mL devidamente autoclavados. Posteriormente, foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 200 µL de solução TE (2 µL Tris-HCl 10 mM, pH 8, 0,4 µL de EDTA 1 mM e 20 µL de água ultra pura), 10 µL de lisozima e 6 µL de RNase, em seguida agitado em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 30 µL SDS 10% e 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) levados a agitação em vórtex por 1 minuto, incubados a -20 °C por

1 minuto, novamente agitados em vórtex por 1 minuto e centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram retirados 100 µL da fase sobrenadante e transferidos para novo *ependorf*, adicionado 0,1 volume de NaCl 5 M e 1 volume de isopropanol e deixados a -20 °C por, no mínimo, 2 horas.

Posteriormente, o produto foi centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e então cuidadosamente adicionado 200 µL de etanol 70% para não ressuspender o pellet. Em seguida, foi descartado para a retirada de todos os resíduos contidos no tubo. Estes foram colocados para secar o pellet com o *ependorf* virado para baixo e ressuspenso em 100 µL de água ultra pura e, finalmente, estocado a -20 °C.

A avaliação da diversidade genética das bactérias foi realizada através do ERIC-PCR, em que os oligonucleotídeos usados foram ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCCTGGGGATTAC-3') e ERIC 2 (5'-AAGTAA GTGACTGGGGTGAGCG-3') (Tian-Xing, 2011). O volume da reação de ERIC-PCR foi de 25 µL e a amplificação foi realizada através dos seguintes passos: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 30 seg e 68 °C por 4 min, e a extensão final a 68 °C, por 10 min.

O produto de ERIC-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo em tampão TEB 0,5x. Os tamanhos dos amplificadores foram determinados com marcador 123pb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, Inc.). As imagens foram salvas em foto documentador (Loccus Biotecnologia, Brasil) para posterior análise. A avaliação da diversidade foi obtida por avaliação visual do gel, considerando todos os amplificadores visíveis. Por comparação, os isolados com o mesmo perfil de amplificação foram considerados dentro do mesmo morfotipo. Uma linhagem representante de cada morfotipo foi selecionada para identificação molecular.

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-GAG TTT GAT CAC TGG CTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). As condições de amplificação foram realizadas como segue: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 40 seg, 58 °C por 35 seg e 72 °C por 1 min 20 seg, e extensão final de 72 °C, por 10 min.

Os produtos de amplificação foram purificados (Dunn e Blattner, 1987), a quantificação do DNA foi realizada com 1 µL do produto por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O restante do DNA purificado foi enviado para sequenciamento a uma

empresa terceirizada, e foi realizado o método de Sanger com o Kit Big Dye no ABI3100 Applied Biosystem. As sequências do 16S foram comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com sequências conhecidas, por uma pesquisa de similaridade via Blastn.

### 2.5.2 Isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio líquido BD (400 mL de infusão de batata, 20 g de dextrose) em temperatura ambiente, por 7 dias. O micélio fúngico foi lavado como auxílio de peneira em água destilada para a retirada de todo o meio de cultura. Em seguida, a amostra foi secada com papel toalha para retirada da umidade da amostra e levada ao *freezer* a -20 °C, até o momento da análise.

A extração do DNA genômico dos fungos foi realizada com kit de extração de DNA, seguindo recomendações do fabricante (Axygen biosciences, USA). A validação da morfotipagem foi determinada pela análise da variabilidade genética, utilizando o marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeat Amplification) e o IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism).

O marcador molecular ISSR foi aplicado com o oligonucleotídeo BH1 (5'-GTG GTGGTGGTGGTG-3'), (Integrated DNA Technologies, Inc). O volume de uma reação foi de 25 µL, contendo 4 µL de extrato de DNA, 14,45 µL de água ultra pura, 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de dNTP, 1 µL do *primer* BH1 e 0,3 µL da enzima taq polimerase. O programa do PCR consiste em uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 2 min e 72 °C por 2 min, e a etapa final de alongamento de 72 °C, por 10 min em um AMPLITHERM Thermal Cyclers. Para o marcador IRAP, foram utilizados os oligonucleotídeos CL IRAP1 (5'-CGT ACG GAA CAC GCT ACA GA-3') e CL IRAP4 (5'-CTT TTG ACG AGG CCA TGC-3'). O volume de uma reação foi de 25 µL, contendo 5 µL de extrato de DNA, 11,6 µL de água ultra pura, 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 1 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de dNTP, 1 µL do *primer* CL IRAP1, 1 µL do *primer* CL IRAP4 e 0,4 µL da enzima taq polimerase.

Os produtos de ISSR-PCR e IRAP-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TEB 0,5x. Os tamanhos dos amplificadores foram determinados com marcador 123pb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, Inc.). As imagens foram salvas em foto documentador (Loccus Biotecnologia, Brasil) para posterior

análise. A avaliação da diversidade foi obtida por avaliação visual do gel, considerando todos os amplificadores visíveis. Por comparação, os isolados com o mesmo perfil de amplificação, foram considerados dentro do mesmo morfotipo. Uma linhagem representante de cada morfotipo foi selecionada para identificação molecular.

A identificação foi realizada pelo sequenciamento parcial do espaçador interno transcrito (ITS) da região rDNA de representantes de cada grupo de morfotipo. Os oligonucleotídeos ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White et al., 1990) foram utilizados para amplificação da região intergênica 18S a 28S. O volume de reação foi de 35  $\mu$ L contendo 22,35  $\mu$ L de água ultra pura, 3,5  $\mu$ L de tampão de PCR 10x, 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 2,8  $\mu$ L de dNTP, 1  $\mu$ L do *primer* ITS 4, 1  $\mu$ L do *primer* ITS 5 e 0,3  $\mu$ L da enzima taq polimerase. As condições de amplificação foram realizadas como segue: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, 50 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min, e o passo final de alongamento de 72 °C por 10 min em um AMPLITHERM Thermal Cyclers.

Os produtos de amplificação foram purificados (Dunn e Blattner, 1987), a quantificação do DNA foi realizada com 1  $\mu$ L do produto da purificação por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O restante do DNA purificado foi enviado para sequenciamento a uma empresa terceirizada, e foi realizado o método de Sanger com o Kit Big Dye no ABI3100 Applied Biosystem. As sequências ITS foram comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com sequências conhecidas, por uma pesquisa de similaridade via Blastn.

## 2.6 Análise dos dados

A frequência relativa das espécies encontradas foi calculada dividindo o número de isolados de uma espécie pelo número total de isolados. O índice de diversidade de Shannon (H') foi calculado de acordo com Kumar e Hyde (2004).

## 3. RESULTADOS

Com o isolamento de micro-organismos feito a partir de raízes de butiá, foi possível observar 100% de frequência de colonização apenas para endofíticos, para bactérias foram isoladas 88 linhagens endofíticas, purificadas e estocadas. Para os fungos, foram isoladas 25 linhagens, sendo purificados e estocados em micoteca.

Quanto às bactérias rizosféricas foram isoladas 25 linhagens, às quais foram purificadas e estocadas. Para os fungos rizosféricos, foram isolados 2 linhagens, purificados e estocados em micoteca.

Com as análises moleculares, foram identificadas 113 bactérias (88 endofíticas e 25 rizosféricas), resumindo-se em 16 espécies: *Enterobacter* (37,9%), *Enterobacter aerogenes* (9,8%), *Enterobacter cloacae* (9,8%), *Enterobacter oryzae* (3,5%), *Enterobacter asburiae* (1,8%), *Enterobacter ludwigii* (0,9%), *Enterobacter strain* (0,9%), *Pantoea agglomerans* (0,9%) e *Cedecea davisae* (0,9%), pertencentes à classe *Gamma proteobacteria* e ordem *Enterobacteriales*; *Bacillus* sp. (4,3%), *Bacillus cereus* (2,7%) e *Brevibacillus brevis* (0,9%) da classe *Bacilli* e ordem *Bacillales*; *Rhizobium* sp. (19,6%) e *Rhizobium pusense* (2,6%), pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* e ordem *Rhizobiales*; *Streptacidiphilus luteoalbus* (0,9%) da ordem *Actinobacteria* e classe *Actinomycetales*; *Acinetobacter* sp. (2,6%), da classe *Gammaproteobacteria* e ordem *Pseudomonadales*.

A espécie predominante encontrada foi *Enterobacter*, para rizosféricos e endofíticos, seguido por *Rhizobium*, que teve um número expressivo na identificação de bactérias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região 16S.

Isolados	Ambiente / Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência Relativa (%)
BA78BE	E(1)	<i>Cedecea davisae</i>	KF475889	97	0,9
BA71E	E(22)	<i>Rhizobium</i> sp.	JQ697684	99	19,5
BA188E	E(1)	<i>Streptacidiphilus luteoalbus</i>	AY530190	99	0,9
BA215E	E(3)	<i>Rhizobium pusense</i>	KF297587	99	2,7
BA228E	E(1)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JQ312027	99	0,9
BA298E	E(11)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KF254601	99	9,7
BA89R	R(1)	<i>Brevibacillus brevis</i>	HM449127	99	0,9
BA68E	E(1) / R(4)	<i>Bacillus</i> sp.	GQ180177	98	4,4
BA88R	R(3)	<i>Bacillus cereus</i>	HQ694315	99	2,7
BA63E	E(33) / R(1)	<i>Enterobacter</i> sp.	KF420155	98	30,1
BA80R	R(9)	<i>Enterobacter</i> sp.	JF496523	99	8,0
BA183E	E(10) / R(1)	<i>Enterobacter cloacae</i>	JF772071	99	9,7
BA206E	E(1)	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KF475838	99	0,9

BA106R	R(4)	<i>Enterobacter oryzae</i>	JX088114	99	3,5
BA109R	R(2)	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ659657	99	1,8
BA250E	E (1)	<i>Enterobacter strain</i>	DQ916133	99	0,9
BA239E	E (3)	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924	99	2,7

E = endofítico / R = rizosférico; ID (%) = % identidade

Na identificação dos fungos rizosféricos, endofíticos e deterioradores foram encontradas 10 gêneros, sendo que as duas espécies predominantes foram *Aspergillus niger* e *Fusarium sp.* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Identificação molecular de isolados fúngicos endofíticos, rizosféricos e deterioradores de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região ITS.

Isolados	Ambiente/ Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência Relativa (%)
BA301E	E (7)	<i>Fusarium sp.</i>	KC981108	99	12,3
BA296E	E (1)	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN232163	97	1,8
BA141D	D (2)	<i>Fusarium proliferatum</i>	EU821492	99	3,5
BA72E	E (2)	<i>Talaromyces verruculosus</i>	HQ608025	99	3,5
BA156D	D(3)	<i>Talaromyces sp.</i>	AB808419	99	5,3
BA214E	E(3)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	HM469430	99	5,3
BA178D	D(3)	<i>Penicillium sp.</i>	JQ912017	98	5,3
BA367E	E(1)	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	JQ936326	99	1,8
BA214E	E(1)	<i>Diaporthe sp.</i>	EF488448	98	1,8
BA108R	R(1)	<i>Hypocrea lixii</i>	JQ040359	99	1,8
BA99R	R(1)	<i>Bionectria ochroleuca</i>	HQ607798	98	1,8
BA163D	D(20)	<i>Aspergillus niger</i>	KF304798	98	35,1
BA142D	D(3)	<i>Aspergillus sp.</i>	JF312217	99	5,3
BA181D	D(1)	<i>Aspergillus flavus</i>	EF409804	99	1,8
BA149D	D(3)	<i>Aspergillus sustus</i>	AY213638	98	5,3
BA139D	D(1)	<i>Gibberella intermedia</i>	JQ272470	98	1,8
BA145D	D(2)	<i>Gibberella aoniliformis</i>	AB374142	98	3,5
BA170D	D(2)	<i>Neodeighonia phoenicum</i>	EU673340	98	3,5

E = endofítico / R = rizosférico/ D= deteriorador; ID (%) = % identidade

### 3.1. Diversidade

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener  $H'$  encontrados para as populações microbianas de *B. archeri* foram: bactérias endofíticas 1,75 e rizosféricas 1,66; para as populações fúngicas endofíticas 1,48 e rizosféricas 0,69.

## 4. DISCUSSÃO

De acordo com Aburjaile et al. (2012) o solo contém grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários, algas e vírus, e apesar desta diversidade, os microrganismos cultiváveis predominantes entre a microbiota do solo são fungos e bactérias heterotróficas do domínio Bactéria. Confirmando dessa forma os resultados do presente estudo em que foram obtidos bactérias e fungos cultiváveis, a partir de amostras de solos rizosféricos.

Sanguin et al. (2006) mostraram que através de métodos baseados em PCR foi possível descobrir a taxa de ocorrência de *Acidobacteria*, *Actinobactérias* e *Archaea*. Esses autores afirmam que muito deve ser feito para caracterizar totalmente a diversidade de rizobactérias e mapear seu efeito no solo e planta. O presente trabalho é o primeiro relato sobre diversidade microbiana, endofítica e rizosférica, para a espécie arbórea butiá.

Nunes et al. (2012) relataram em um estudo sobre diversidade, que o valor mais alto do índice de Shannon encontrado, estava na mata dos cocais, que apresenta características da floresta Amazônica, cerrado e caatinga, sendo os valores do índice: 2,42 e 3,01 para duas diferentes épocas do ano. Comparado ao maior índice de Shannon para populações microbianas endofíticas do presente estudo, (realizado com solo rizosférico de *Butia archeri*, típica do cerrado) que é de 1,75, conclui-se que o índice aqui obtido é considerado médio em relação ao índice do estudo citado anteriormente, que se mostrou alto, já que ambos têm em comum o cerrado e Mata dos cocais como locais utilizados para a realização do estudo.

Até o presente, para esta espécie arbórea, há trabalhos sobre quebra de dormência vegetal. Na produção de mudas de palmeiras, visando acelerar o processo germinativo de algumas espécies, é recomendada a remoção completa das partes do fruto que envolve as sementes (Lorenzi et al., 1996). Segundo Santos et al. (2013), *B. archeri* é comum em campos rupestres possuir uma camada visivelmente densa de cera obstruindo os estômatos, estratégia considerada como adaptativa contra o excesso de

radiação, comum em locais de elevada altitude ou de clima frio. Ainda de acordo com a descrição da sistemática vegetal feita por Peralta (2011), *B. archeri* possui em geral estipe médio, com cicatriz de pecíolos antigos, longas folhas penatífidas em obras trançadas, e pequenas drupas comestíveis, com semente oleaginosa.

Um estudo mostra que foi possível encontrar similaridade significativa entre rizobactéria e *Rhizobium radiobacter* (Pelzer et al., 2011). Isto confirma a similaridade entre os gêneros *Rhizobium* e *Acinetobacter*, pertencentes ao mesmo Filo (Proteobacteria) identificado no presente trabalho.

Sun et al. (2012) descreveram o isolamento das espécies *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* de gêneros comuns, de uma comunidade de fungos endofíticos das plantas de regiões desérticas da China. A espécie *Fusarium*, que também foi encontrada no presente trabalho, pode estar relacionada com regiões de clima quente, como é o caso do clima no domínio Cerrado em que plantas de butiá são nativas.

Alberto (2013) isolou e identificou fungos de cajú-de-arvore-do-cerrado, detectando os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Bionectria* e *Diaporthe* sp., também detectados no presente trabalho. Esses resultados semelhantes mostram que os gêneros descritos podem ser então típicos do Cerrado, já que tanto butiá como caju-de-árvore-do-cerrado são nativas deste domínio.

*Diaporthe*, gênero endofítico conhecido por produzir enzimas que atuam na inibição do metabolismo de patógenos (Prada et al., 2009), também foi identificado neste trabalho, mostrando sua importância para exercer antagonismo a muitos microorganismos prejudiciais a espécies vegetais de interesse econômico, como é o caso do butiá.

Silva et al. (2011) identificaram três espécies de fungos de solos do agreste pernambucano: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Similarmente, tais gêneros foram detectados neste estudo. Comumente, nos trabalhos de isolamento de fungos de solo, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são detectados. Cavalcanti et al. (2006) isolaram fungos de solo da Caatinga da região Xingó, e as espécies que se destacaram foram *Penicillium* e *Aspergillus*, confirmando a frequência dessas espécies.

Almeida et al. (2005) obtiveram isolados fúngicos endofíticos (*Fusarium oxysporum* e *Fusarium* sp.) das plantas de pupunha cultivadas *in vitro*, os quais apesar de serem endofíticos mostraram atividade patogênica. Essas espécies também foram detectadas no presente trabalho como fungos endofíticos. Souza et al. (2004) detectaram gêneros considerados fitopatógenos (*Guignardia*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* e

*Glomerella*) e, apesar disso, estes isolados foram obtidos a partir de plantas saudáveis sem qualquer doença aparente.

Silva et al. (2006), que isolaram fungos endofíticos de pinha (*Annona* spp.) para avaliar a capacidade desses fungos em promover o crescimento das mudas daquela espécie arbórea, relatam que o isolamento de tais micro-organismos é importante no conhecimento de mecanismos que promovam o crescimento vegetal.

Bomfeti et al. (2007) identificaram a bactéria patogênica (*Pantoea ananatis*), corroborando o presente trabalho em que foi detectado um isolado do mesmo gênero (*Pantoea agglomerans*).

Santos et al. (2008) afirmam que micro-organismos endofíticos têm sido pouco estudados, se considerada sua vasta biodiversidade e especificidade nas colonizações das plantas hospedeiras. O conhecimento dessas interações entre plantas e micro-organismos, além de contribuir para o entendimento de muitos processos na natureza e na ecologia, pode estabelecer fontes alternativas de substâncias de interesse para a humanidade, em vários aspectos.

## 5. CONCLUSÕES

- Bactérias e fungos estão presentes no ambiente endofítico e rizosférico de butiá.
- Há maior número e diversidade de espécies endofíticas do que rizosféricas em butiá.
- Oito gêneros bacterianos endofíticos e três rizosféricos pertencentes a três filos: Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes e ainda cinco gêneros fúngicos endofíticos e dois rizosféricos, pertencentes a um único filo, Ascomycota, foram detectados no ambiente endofítico e rizosférico de butiá.
- Os gêneros bacterianos mais frequentes isolados no ambiente endofítico foram *Enterobacter* sp. e *Rhizobium* sp. e, para fungos, *Penicillium simplicissimum* e *Fusarium* sp. No ambiente rizosférico, foram às bactérias do gênero *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. e as espécies fúngicas *Bionectria ochroleuca* e *Hypocrea lixii*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURJAILE, S. B., SILVA, M. P., BATISTA, E. A. F. S., BARBOSA, L. P. J. L., BARBOSA, F. H. F. Pesquisa e caracterização da diversidade microbológica do solo, na região de São José do Buriti-MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (cerrado) por plantações de eucalipto. **Ciência Equatorial**, v.1, p. 69-81, 2012.

ALBERTO, P.S. Diversidade de fungos endofíticos de *Anacardium othonianum* Rizzini e seu potencial biotecnológico. **Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia. IF Goiano**. 2013.

ALMEIDA, C. D.; YARA, R.; ALMEIDA, M. D. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 467-470, 2005.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 769-779, 2004.

BENSCH K.; BRAUN U.; GROENEWALD J.; CROUS P. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72 p. 1-401, 2012.

BOMFETI, C. A.; MEIRELES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. D. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELES, L. D. Evaluation of commercial chemical products, *in vitro* and *in vivo* in the control of foliar disease, maize white spot, caused by *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 63-67. 2007.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**. v. 20, p. 831-837, 2006.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P. D.; FARIAS, M. F. D.; NOGUEIRA, V. D. F. B. Interações entre grupos de micro-organismos com a rizosfera. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, p. 213-224, 2011.

DUNN, I. S; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: Multi enzyme, high capacity recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 2677 – 2698, 1987.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-368, 2006.

KUMAR, D. SILVA SUNDARA; HYDE, KEVIN D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Divers**, v. 17, p. 69-90, 2004.

LORENZI, H. SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; VON BEHR, N. **Palmeiras no Brasil Nativas e Exóticas**. Editora Plantarum, Nova Odessa. 1996.

NUNES, L., SILVA, D., ARAÚJO, A., LEITE, L. F. C., CORREIA, M. E. F. Caracterização da fauna edáfica em sistemas de manejo para produção de forragens no Estado do Piauí. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 30-37, 2012.

PELZER, G. Q.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R.; ZILLI, J. É.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 95-103, 2011.

PERALTA, S. L. Incorporação do óleo essencial de *Butia capitata* como antibacteriano em um adesivo experimental. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia- Universidade Federal de Pelotas – RS**, 2013.

PRADA, H.; ÁVILA, L.; SIERRA, R.; BERNAL, A.; RESTREPO, S. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endofito *Diaporthe* sp. aislado de

frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 3, p. 198–201, 2009.

ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 259-261, 2008.

SANGUIN, HERVÉ.; REMENANT, B.; DECHESNE, A.; THIOULOUSE, J.; VOGEL, T. M.; NESME, X.; MOËNNE-LOCCOZ, Y., GRUNDMANN, G.L. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4302-4312, 2006.

SANTOS, L. D. S.; OLIVEIRA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, I. C. S.; LOPES-JÚNIOR, M. L.; ARRUDA, M. S. P.; SAILIVA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES FILHO, E.; OLIVEIRA, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, v. 26, p. 539-548, 2008.

SANTOS, S. A.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; VALENTE, G. E.; FRANCINO, D. M. T.; JÚNIOR, W. G. O. C. Micromorfologia Foliar de espécies de *Butia* (ARECACEAE). **64º Congresso Nacional de Botânica**. Belo Horizonte – MG, 2013.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SIVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 649-655, 2006.

SILVA, D. C. V.; TIAGO, V. P.; MATTOS, J. L. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira Botânica**, v. 34, p. 607-610, 2011.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22. 1982.

SOUZA, A. D.; SOUZA, A. D.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. D. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SUN, Y; WANG, Q.; LU, X.; OKANE, I.; KAKISHIMA, M. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress**, v. 11, p.781–790, 2012.

TIAN-XING, L.; CHAO, L.; MING-FUL, G. Genetic diversity of antagonistic endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroide*. **Plant Diseases and Pests**, v. 2, p. 6–8, 2011.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Academic Press**, p. 315–322, 1990.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697–703, 1991.

## **CAPÍTULO II**

### **TRAÇOS FUNCIONAIS DE BACTÉRIAS E FUNGOS RIZOSFÉRICOS E ENDOFÍTICOS DE *Butia archeri* Glassman**

**RESUMO** – O solo possui grande variedade de compostos, substâncias benéficas aos vegetais e aos micro-organismos, que podem utilizá-los para se manterem vivos e se desenvolverem. Além disso, alguns micro-organismos podem se destacar por possuírem traços funcionais e ou características que auxiliam na disponibilidade de determinados compostos aos vegetais. Objetivou-se com o presente trabalho, testar isolados bacterianos e fúngicos de *Butia archeri* na solubilização de fosfatos de cálcio e ferro, na produção de ácido indol-acético (AIA) e na antibiose contra fungo deteriorador de sementes. Para determinar a solubilização, os isolados bacterianos e fúngicos foram incubados em meio de cultura caldo nutriente e GL enriquecido separadamente com as fontes de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ . Após 72h, foram centrifugados (8.000 rpm, por 10 min a 10 °C). Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 9 mL do reagente de trabalho. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso, por 20 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro (725 nm). Para a determinação de ácido indol-acético (AIA), os isolados foram inoculados em caldo nutriente para a determinação da DO a 600 nm. As amostras tiveram a DO equiparada através de diluição com solução salina (0,85%) e, em seguida, 50 µL de cada uma das diluições inoculadas em caldo nutriente enriquecido com triptofano. Após 72h a 30 °C, sob agitação constante (90 rpm), foram coletados, assepticamente, 2 mL que foram centrifugados (10.000 rpm), por 10 min, a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 20 min e, em seguida, feita a leitura em espectrofotômetro (530 nm). Os isolados bacterianos se destacaram pela maior atividade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  do que de  $\text{FePO}_4$  e ainda por sintetizarem AIA. Dois isolados bacterianos foram capazes de inibir o crescimento de um fungo deteriorador de sementes.

**Palavras-chave:** solubilização de fosfatos, fitormônios, antibiose.

### ABSTRACT

The soil has a large variety of compounds that improve plant and microorganisms survival. Additionally, some microorganisms have specific characteristics to make available certain compounds to plants. This work aimed to test the ability of bacteria and fungi isolates of *Butia archeri* to solubilize calcium and iron phosphates as well as the production of indole acetic acid (IAA) and antibiosis against deleterious fungus seeds. To determine the phosphate solubilization, bacteria and fungi isolates were incubated in nutrient broth and GL culture media, supplemented separately with  $\text{FePO}_4$  and  $\text{CaHPO}_4$ . After 72 h, they were centrifuged (8.000 rpm for 10 min at 10 °C). Then, 1 mL of supernatant from each isolate was transferred to a test tube, added with 9 mL of working reagent. The tubes were shaken then rested for 20 minutes and the reading made in a spectrophotometer (725 nm). For indole acetic acid (IAA) quantification, the isolates were inoculated in nutrient broth for optic density (OD) determination at 600 nm. The samples had OD equalized through dilution by saline solution (0.85%). Then, 50 uL of each dilution were inoculated in nutrient broth supplemented with tryptophan. After 72h at 30 °C under constant shaker (90 rpm) 2 mL of sample collected and centrifuged (10.000 rpm) for 10 min at 4 °C. Then, 1 mL of supernatant from each isolate was transferred to a test tube where 2 mL of Salkowski reagent were added. The tubes were kept in the dark for 20 min and readings made in a spectrophotometer (530 nm). The bacteria isolate showed the higher  $\text{CaHPO}_4$  solubilization capacity than  $\text{FePO}_4$  as well as IAA synthesis. Two bacteria isolates were capable of inhibiting the growth of a deleterious fungus seeds of *B. archeri*.

**Key words:** phosphate solubilization, phytohormones, antibiosis

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos micro-organismos favorecem a nutrição, o crescimento e a produtividade de espécies vegetais. Portanto, tornam-se indispensáveis as investigações envolvendo micro-organismos, a compreensão de sua diversidade e, principalmente, de sua interação com espécies vegetais de interesse (Singh et al., 2011). Neste sentido, *B. archeri* tem sido amplamente utilizada em programas de ornamentação e arborização urbana. Possui alto valor comercial, entretanto, são escassos os trabalhos científicos sobre esta espécie.

De acordo com Paz (2009), micro-organismos endofíticos habitam o interior de plantas saudáveis sem causar alterações morfológicas aparentes. Sua interação com a planta pode ser mutualística, já que o microrganismo recebe nutrientes e proteção da planta e, em contrapartida, produz compostos químicos como fitormônios. Ademais, podem ainda promover o crescimento das plantas pela disponibilização de nutrientes ou inibição de fitopatógenos.

Os micro-organismos rizosféricos são aqueles que habitam e obtêm seus nutrientes a partir da rizosfera. A rizosfera é o local no solo que circunda as raízes e é influenciado diretamente pelas mesmas (Philippot et al., 2013). Neste ambiente, destacam-se as rizobactérias, por serem promotoras de crescimento de plantas, além de serem empregadas no controle biológico de fitopatógenos, no aproveitamento mais eficiente de fertilizantes e como rizoremediadoras na degradação de compostos nocivos às plantas (Bakker et al., 2007).

Kapri e Tewari (2010) afirmam que diversos pesquisadores têm observado elevada proporção de solubilização de fosfatos por micro-organismos, especialmente bactérias, fungos e actinobactérias rizosféricas desempenhando papel importante na nutrição vegetal.

A compreensão da eficiência e capacidade da comunidade microbiana do solo em solubilizar fosfato de ferro pode favorecer a seleção de estirpes potencialmente úteis para disponibilizar o P complexado a essa fonte de baixa solubilidade. Tal habilidade tornaria atraente seu uso na agricultura, principalmente nos solos do Cerrado (Gomes 2010).

Um maior entendimento da capacidade e da eficiência de micro-organismos, em solubilizar diferentes fosfatos, pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas (Souchie et al., 2005).

Pereira et al. (2012) afirmam que as bactérias têm grande variedade de efeitos positivos sobre o hospedeiro vegetal. Nos exemplos destes efeitos, tem-se o aumento da solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, produção de fitormônios como o ácido indol-acético (AIA) e inibição de patógenos do solo. Qualquer microrganismo que possua um ou mais desses traços funcionais são considerados promotores de crescimento.

Golubev et al. (2011) constataram que bactérias que produzem AIA podem favorecer a planta no alongamento de suas raízes, aumento de pelos radiculares e que o fitormônio pode ainda regular a exsudação radicular por provocar mudança na permeabilidade da plasmalema.

Objetivou-se com este trabalho, avaliar a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , a síntese de AIA e a atividade antagonista de bactérias rizosféricas e endofíticas isolados de *B. archeri* a fungos deterioradores de sementes desta espécie arbórea.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Teste qualitativo da solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio sólido**

Os isolados bacterianos e fúngicos, obtidos através do isolamento de micro-organismos do solo, foram inoculados em placas de Petri esterilizadas, contendo os seguintes meios de cultura: GELP (glicose 10 g; 5 g de peptona; extrato de levedura 0,05 g e ágar 15 g), adicionado da solução de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), formado pela adição de 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  (10%) e 12,5 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). O número de isolados solubilizadores de fosfato de  $\text{CaHPO}_4$  foi determinado a partir do aparecimento de um halo transparente, em contraste com o meio opaco em volta da colônia dos isolados de bactéria (BSF) ou de fungo (FSF) foi o indicativo de positividade. Esse halo indica a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  contido no meio (Barroso e Oliveira, 2001; Souchie et al., 2007).

### **2.2 Quantificação da solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio líquido**

Os isolados bacterianos e fungicos positivos no teste qualitativo, cresceram em meio de cultivo líquido caldo nutriente (3 g de extrato de carne e 5 g de peptona), sob

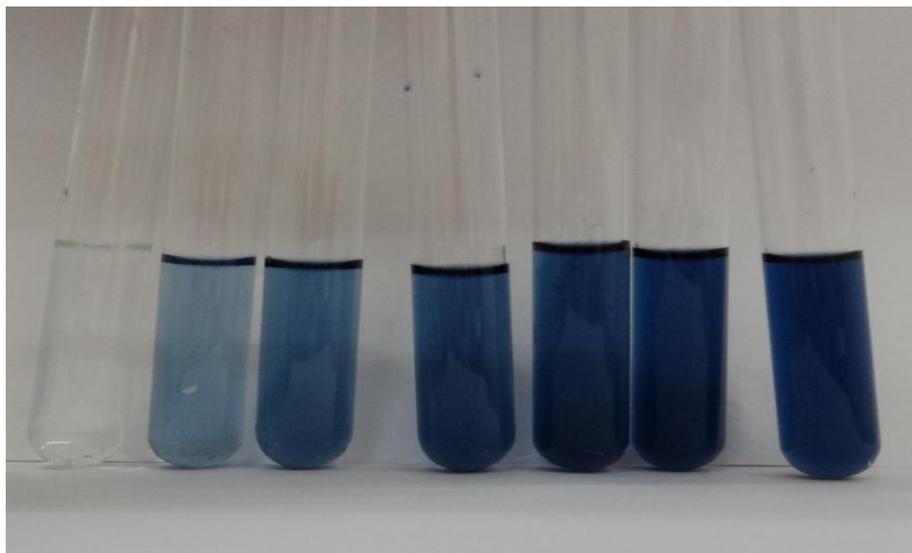
agitação constante, com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712) em rotação a 90 rpm, por 24h, a 30 °C. Posteriormente, foram coletados, assepticamente, 3 mL dessas culturas para se determinar a densidade óptica (DO), a 600 nm. Todas as amostras bacterianas tiveram sua DO equiparada por meio de diluição com solução salina (0,85%). Em seguida, 50 µL de cada uma das diluições foram inoculados em meio caldo nutriente, adicionado com fontes de fosfato separadamente. Para a avaliação da solubilização, foi adicionado ao meio de cultura 1,26 g L<sup>-1</sup> de cada uma das fontes fosfatadas (CaHPO<sub>4</sub> e FePO<sub>4</sub>).

Os fungos foram crescidos em meio BDA (infusão de batata – 200g, dextrose - 20 g e ágar - 15 g), por três dias, a 30 °C. Posteriormente, discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial foram inoculados em tubos de ensaio (um disco por tubo), contendo meio GL, adicionado das fontes de fosfato separadamente. As culturas permaneceram incubadas sob agitação constante (90 rpm), a 30 °C, por 72h. A solubilização de CaHPO<sub>4</sub> e FePO<sub>4</sub> foi avaliada em espectrofotômetro (725 nm).

### **2.3 Curva de calibração dos meios com CaHPO<sub>4</sub> e FePO<sub>4</sub>**

Uma solução estoque de ácido fosfórico foi preparada a 20 mg L<sup>-1</sup>. A partir dessa solução, foram retirados 0, 100, 200, 300, 500, 700 e 900 µL e água destilada foi adicionada até completar o volume final de 1 mL, obtendo as concentrações crescentes para construção da curva de calibração de fósforo (P).

Posteriormente, foram adicionados 9 mL do reagente de trabalho [0,4g de vitamina C; 100 mL da solução 725 (1,0 g de subcarbonato de bismuto; 68 mL de ácido sulfúrico; 300 mL de água destilada/20 g de molibdato de amônio; 68 mL de ácido sulfúrico/completar para 1000 mL em balão volumétrico); 900mL de água destilada], em todos os tubos da curva-padrão (Figura 1). Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos em repouso, por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (725 nm).



**Figura 1.** Curva de calibração para quantificar a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  em meios de cultura

#### **2.4 Curva de solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ por isolados bacterianos e fúngicos**

Os isolados bacterianos e fúngicos, crescidos em meio de cultura caldo nutriente e GL enriquecido separadamente com as fontes de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , após 72h, foram centrifugados (8.000 rpm, por 10 min a 10 °C). Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 9 mL do reagente de trabalho. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso, por 20 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro (725 nm). Todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Como controle, utilizou-se o meio GL, adicionado separadamente de fontes de fosfato.

#### **2.5 Avaliação qualitativa e quantitativa da produção de ácido indol acético (AIA) por micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *Butia archeri***

Na análise qualitativa, os isolados bacterianos foram crescidos em meio caldo nutriente (peptona 5 g; extrato de carne 3 g), enriquecido com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano, após 72h, a 30 °C, sob agitação constante (90 rpm), com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712). Posteriormente, foram coletados, assepticamente, 2 mL que foram centrifugados (10.000 rpm), por 10 min, a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio,

sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 20 min, e, em seguida, feita a leitura em espectrofotômetro (530 nm). Como controle, foi utilizado o meio de cultura caldo nutriente com triptofano.

No teste quantitativo, os isolados foram inoculados em caldo nutriente para a determinação da DO a 600 nm, as amostras tiveram a DO equiparada através de diluição com solução salina (0,85%), posteriormente 50 µL de cada uma das diluições foram inoculadas em triplicata em caldo nutriente enriquecido com triptofano e, após 72h, a 30 °C, sob agitação constante (90 rpm), com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712), foram coletados, assepticamente, 2 mL que foram centrifugados (10.000 rpm), por 10 min, a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 20 min e, em seguida, feita a leitura em espectrofotômetro (530 nm).

## **2.6 Curva de calibração de AIA**

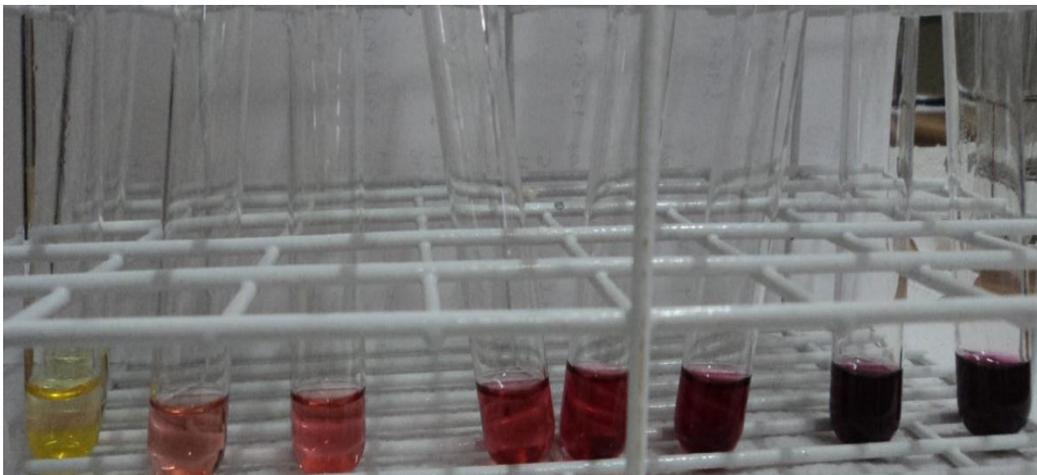
Uma solução estoque de AIA (Sigma<sup>®</sup>) foi preparada a 10 mM (1,75 mg mL<sup>-1</sup>). Essa solução foi diluída em água destilada, em concentrações crescentes (0, 1, 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100 e 150 µg mL<sup>-1</sup>) para a construção da curva de calibração de AIA, empregando o método descrito por Sarwar e Kremer (1995).

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada diluição e transferida para tubos de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski (1 mL de FeCl<sub>3</sub> – 1,35g/10 mL; 50 mL de HClO<sub>4</sub> – 35%). Em seguida, os tubos foram mantidos no escuro, por 20 min. A coloração rósea foi o indicativo da presença do hormônio, sendo quantificada pela leitura em espectrofotômetro (530 nm) em absorbância.

## **2.7 Curva de produção de AIA pelos isolados bacterianos**

Os isolados bacterianos crescidos em meio caldo nutriente enriquecido com triptofano, após 72h, foram centrifugados (10.000 rpm), por 10 min, a 10 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 20 min e, em seguida, feita a leitura em espectrofotômetro (530 nm). Como controle, foi

utilizado o meio de cultura caldo nutriente com triptofano. A concentração de AIA foi determinada utilizando a equação da curva padrão (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de calibração do meio de cultura líquido para quantificação de AIA.

## **2.8 Avaliação da capacidade de antibiose dos isolados rizosféricos e endofíticos frente a micro-organismos deterioradores de sementes**

A partir do isolamento dos fungos deterioradores de sementes da espécie *B. archeri*, foram selecionados dois de maior frequência e bactérias rizosféricas e endofíticas foram colocadas sob desafio, para avaliar seu potencial de controle biológico.

O crescimento dos micro-organismos testados na antibiose atingiu seu ápice aos oito dias de inoculação. A formação de halo entre estirpes sob desafio, foram considerados como indicadores de antibiose, causada por substâncias antagonistas produzidas em meios de cultura.

O teste quantitativo foi realizado a partir do teste qualitativo com bactérias isoladas de raízes de *B. archeri*, selecionando as que possuíam capacidade antagônica para fungos deterioradores de sementes. O teste foi realizado em triplicata em placa de Petri contendo meio Agar Batata Dextrose, realizando teste de dupla-cultura, sendo inoculado o fungo no centro da placa e a bactéria com um espaçamento de 3 cm em dois pontos da placa de Petri. As placas foram incubadas sob temperatura ambiente durante 4 e 8 dias, e avaliadas de acordo com a velocidade de crescimento do fungo. O diâmetro do micélio foi medido com paquímetro para detectar a inibição do crescimento do fungo, na presença da bactéria, por causa da produção de compostos supressores.

### 3. RESULTADOS

A maior taxa de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  foi atingida pelos isolados BA367E e BA99R (798,85 e 493,21  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente), destacando que o pH do meio de cultura incubado com esses isolados foi baixo (Tabela 1). Para a solubilização de  $\text{FePO}_4$ , a maior e única taxa atingida foi apenas pelo isolado BA367EF (383,83  $\text{mg L}^{-1}$ ) e o pH permaneceu ácido. Entre as fontes de fosfatos, os isolados fúngicos apresentaram maior capacidade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  do que  $\text{FePO}_4$  (Tabela 1).

**Tabela 1. Solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e de ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por fungos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*.**

Código de identificação	Isolados	$\text{CaHPO}_4$		$\text{FePO}_4$	
		mg P $\text{L}^{-1}$	pH	mg P $\text{L}^{-1}$	pH
BA71'B'E	<i>Fusarium</i> sp.	0,0 e	5,09 c	0,00 c	4,73 b
BA108R	<i>Hypocrea lixii</i>	226,2 c	3,05 e	0,00 c	4,65 b
BA214E	<i>Diaporthe</i> sp.	0,0 e	3,23 e	0,00 c	4,72 b
BA284E	Unidentified	0,0 e	5,72 a	0,00 c	6,24 a
BA285E	Unidentified	308,1 c	5,27 b	0,00 c	2,85 d
BA296E	<i>F. oxysporum</i>	0,0 e	5,29 b	0,00 c	4,78 b
BA367E	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	798,9 a	5,74 a	383,8 a	4,89 b
BA92R	Unidentified	0,0 d	4,94 c	0,00 c	3,00 d
BA72R	<i>T. verruculosus</i> .	243,5 c	5,27 b	0,00 c	4,80 b
BA99R	<i>B. ochroleuca</i>	493,2 b	4,48 d	0,00 c	3,28 c
Controle		24,2 d	5,75 a	48,3 b	6,38 a

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

As 10 bactérias testadas, foram capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ , destacando-se duas delas (BA81RAR e BA123RAR), com maior índice de solubilização (570,4 e 591,1  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente). Na solubilização de  $\text{FePO}_4$ , todas as bactérias testadas também foram positivas, destacando-se duas delas (BA81R e BA105R) que solubilizaram 750,2 e 732,9  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 2). O pH dos isolados testados, tanto para  $\text{CaHPO}_4$  quanto para  $\text{CaHPO}_4$ , se mostraram neutros (Tabela 2).

**Tabela 2. Solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) e ferro (FePO<sub>4</sub>) por bactérias endofíticas e rizosféricas de *B. archeri*.**

Código de indentificação	Isolados	CaHPO <sub>4</sub>		FePO <sub>4</sub>	
		mg P L <sup>-1</sup>	pH	mg P L <sup>-1</sup>	pH
BA68E	<i>Bacillus</i> sp.	444,59 a	7,84 a	513,03 b	7,67 a
BA81R	<i>Bacillus cereus</i>	570,38 a	7,77 a	750,23 a	7,55 b
BA96R	<i>Enterobacter</i> sp.	550,21 a	7,79 a	624,43 a	7,58 b
BA105R	<i>Enterobacter cloacae</i>	406,35 a	7,87 a	732,86 a	7,83 a
BA110R	<i>Enterobacter</i> sp.	478,98 a	7,78 a	0,00 d	7,85 a
BA118R	<i>Enterobacter oryzae</i>	466,00 a	7,95 a	550,23 b	7,53 b
BA120R	<i>Enterobacter</i> sp.	503,37 a	7,93 a	691,60 a	7,68 a
BA121R	<i>Enterobacter</i> sp.	505,65 a	7,97 a	663,53 a	7,65 a
BA123R	<i>Enterobacter asburiae</i>	591,08 a	7,96 a	566,16 b	7,41 b
BA147R	<i>Enterobacter</i> sp.	483,37 a	7,93 a	640,93 a	7,75 a
Controle		123,0 b	7,02 a	128,00 c	7,69 a

As bactérias testadas na produção do fitormônio, ácido indol-acético, foram positivas, e apenas uma não foi capaz de produzir, e os isolados bacterianos que tiveram maior capacidade na produção desse fitormônio foram 119R e BA144R (85,9 e 97,0) respectivamente, ressaltando que a maioria dos isolados produziram, em média, essa mesma quantidade de AIA.

**Tabela 3. Produção de ácido indol-acético (AIA) *in vitro* por bactérias endofíticas e rizosféricas de *B. archeri*.**

Código de indentificação	Isolados	[ ] de AIA
		mg L <sup>-1</sup>
BA68E	<i>Bacillus</i> sp.	82,62 a
BA81R	<i>Bacillus cereus</i>	9,61 d
BA96R	<i>Enterobacter</i> sp.	0,00 d
BA105R	<i>Enterobacter cloacae</i>	82,19 a
BA110R	<i>Enterobacter</i> sp.	67,89 b
BA118R	<i>Enterobacter oryzae</i>	85,97 a
BA120R	<i>Enterobacter</i> sp.	66,85 a
BA121R	<i>Enterobacter</i> sp.	35,62 c
BA123R	<i>Enterobacter asburiae</i>	11,68 d
BA147R	<i>Enterobacter</i> sp.	97,00 a
Controle		9,28 d

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

Dois isolados bacterianos se tratando de um endofítico e um rizosférico, mostraram atividade antagônica ao fungo deteriorador de sementes: *Aspergillus niger*, porém não mostraram diferença significativa na medida do halo inibidor em relação ao controle.

**Tabela 4. Avaliação de bactérias antagônicas a *Aspergillus niger***

Código de identificação	Isolados	<i>Aspergillus niger</i>
		Cm
Controle		5,95 a
BA68E	<i>Bacillus</i> sp.	5,85 a
BA89R	<i>Brevibacillus brevis</i>	5,1 a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

#### 4. DISCUSSÃO

É comum que micro-organismos do solo, como bactérias e fungos tenham alta capacidade de solubilização dos fosfatos não solúveis, em especial o  $\text{CaHPO}_4$ . Chagas Junior et al. (2010) detectaram o total de 33,2% de micro-organismos solubilizadores com esta habilidade, dentre 205 isolados testados. Isto confirma os resultados do presente estudo, em que foi observado alto índice para a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ . De acordo com Xiang et al. (2012), tais processos são mediados por enzimas e ácidos orgânicos.

Nos resultados do presente estudo foi detectado que, um mesmo isolado produziu AIA e solubilizou fosfatos, o que consiste em traços funcionais estratégicos, visando à promoção vegetal. Pelzer et al. (2011), por exemplo, constataram duas rizobactérias com características de promotoras de crescimento vegetal, isto é, capazes de solubilizar fosfato de cálcio e produzir AIA.

Goswami et al. (2014) relatam a produção de AIA como importante traço funcional, visto que este fitormônio maximiza o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente favorece sua nutrição.

Segundo Pelzer et al. (2011), a capacidade de isolados no biocontrole pode estar ligada diretamente a capacidade dos isolados de quelar íons de ferro, já que um dos isolados testados inibiu outros dois e, com a adição de ferro ao meio, o mesmo isolado perdeu a capacidade de inibir os testados anteriormente.

Coutinho et al. (2012), afirmam que o uso de espécies solubilizadoras de fosfatos usadas como biofertilizantes é ferramenta eficaz para substituir ou minimizar a dependência por adubos químicos.

## **5. CONCLUSÕES**

- Os isolados bacterianos se destacaram pela maior atividade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  do que de  $\text{FePO}_4$  e ainda por sintetizarem AIA.

Os isolados bacterianos testados, não foram capazes de inibir o crescimento do fungo deteriorador de sementes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKER, P. A. H. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; BLOEMBERG, G. V.; HOFTE, M.; LEMANCEAU, P.; COOKE, M. New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 214-242, 2007.

BARROSO, C. B.; OLIVEIRA, L. A. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 575-581, 2001.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. D.; OLIVEIRA, A. N. D.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, p. 359-366, 2010.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; MELO, A. M. Y. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85-89, 2012.

GOLUBEV, S. N.; MURATOVA, A. Y.; WITTENMAYER, L.; BONDARENKOVA, A. D.; HIRCHE, F.; MATORA, L. Y.; MERBACH, W.; TURKOVSKAYA, O. V. Rhizosphere indole-3-acetic acid as a mediator in the *Sorghum bicolor*-phenanthrene-*Sinorhizobium meliloti* interactions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 600-608, 2011.

GOMES, A. E.; SILVA, C. U.; LANA G. P. U.; MARRIEL, E. I. Avaliação do Potencial de Solubilização de Fosfato de Ferro *in vitro* por Bactérias e Fungos do Solo. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo**. p. 19-24, 2010.

GOSWAMI, D.; DHANDHUKIA, P.; PATEL, P.; THAKKER, J. N. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus*

*licheniformis* A2. **Microbiological Research**, v. 169, p. 66–75, 2014.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795, 2010.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009, 114p.

PELZER, G. Q.; HELFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L.; SOUZA, G. R.; ZILLI, J. E.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 95-103, 2011.

PEREIRA, G. V.; MAGALHAES, K. T.; LORENZETTI, E. R.; SOUZA, T. P.; SCHWAN, R. F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 405-417, 2012.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; DER PUTTEN, W. H. V. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.

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

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p.15-22. 1982.

SINGH, H. B.; SINGH, B. N.; SINGH, S. P.; NAUTIYAL, C. S. Solid state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6444-6453, 2010.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Notas Científicas: Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por micro-organismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 53-60, 2007.

XIANG, Y. P.; LI, M.; HUI, C. M.; QIN, X. J.; FENG, H.; QUN, D. C.; HE, M. M.; HUANG, F. D.; QING, D. Y.; XIANG, Y. F. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi lake drainage area of China. **Pedosphere**, v. 22, p. 707-716, 2012

## ANEXO

**Tabela 1.** Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região 16S.

Isolados	Ambiente/ Quantidade	GenBank	% ID	Nº acesso no GenBank	Frequência relativa %	
BA78BE	E(1)	<i>Cedecea davisae</i>	97	KF475889	0,9	
BA71E BA72E BA76E BA84E BA185E BA186E BA195E BA198E BA209E BA220E BA227E	BA230E BA234E BA235E BA241E BA246E BA257E BA259E BA346E BA368E BA372E BA81A E	E(22)	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ697684	19,5
BA188E	E(1)	<i>Streptacidiphilus luteoalbus</i>	99	AY530190	0,9	
BA215E BA212E BA253E	E(3)	<i>Rhizobium pusense</i>	99	KF297587	2,7	
BA228E	E(1)	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	JQ312027	0,9	
BA298E BA67E BA75E BA82E BA83E BA189E	BA116E BA258E BA283E BA182E BA216E	E(11)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	KF254601	9,7
BA89R	R(1)	<i>Brevibacillus brevis</i>	99	HM449127	0,9	
BA68E BA77R BA122R BA98R BA84R	E(1) / R(4)	<i>Bacillus</i> sp.	98	GQ180177	4,4	
BA88R BA81R 78R	R(3)	<i>Bacillus cereus</i>	99	HQ694315	2,7	
BA63E BA76BE BA110R						

BA98E						
BA243E						
BA252E						
BA225E						
BA254E						
BA197E	BA200E					
BA69E	BA80E					
BA288E	BA85E					
BA290E	BA223E					
BA65E	BA201E					
BA219E	BA207E	E(33) / R(1)				
BA78EB	BA224E		<i>Enterobacter</i> sp.	98	KF420155	30,1
BA184E	BA232E					
BA77E	BA233E					
BA191E	BA248E					
BA199E	BA240E					
BA202E	BA256E					
BA203E	BA73E					
BA80R						
BA120R	BA116R	R(9)	<i>Enterobacter</i> sp.	99	JF496523	8,0
BA96R	BA147R					
BA103R	BA73R					
	BA117R					
	BA121R					
BA183E	BA279E					
BA62E	BA222E					
BA286E	BA74E	E(10) / R(1)	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	JF772071	9,7
BA295E	BA190E					
BA105R	BA255E					
BA192E						
BA206E		E(1)	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	KF475838	0,9
BA106R						
BA112R		R(4)	<i>Enterobacter oryzae</i>	99	JX088114	3,5
BA115R						
BA118R						
BA109R						
BA123R		R(2)	<i>Enterobacter asburiae</i>	99	JQ659657	0,9
BA250E		E(1)	<i>Enterobacter strain</i>	97	DQ916133	0,9
		E(3)				
BA239E			<i>Acinetobacter</i> sp.	99	JQ433924	2,7
BA247E						
BA229E						

**Tabela 2.** Identificação molecular de isolados fungicos endofíticos, rizosféricos e deterioradores de *B. archeri*, baseada no sequenciamento da região ITS.

Isolados	Ambiente / Quantidade	GenBank	% ID	Nº acesso no GenBank	Frequência relativa %
BA301E BA71BE BA287E BA101E	BA81BE BA63AE BA104E E (7)	<i>Fusarium</i> sp.	99	KC981108	12,3
BA296E	E(1)	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	JN232163	1,8
BA141D BA151D	D(2)	<i>Fusarium proliferatum</i>	99	EU821492	3,5
BA72E BA90E	E(2)	<i>Talaromyces verruculosus</i>	99	HQ608025	3,5
BA156D BA152D BA172D	D(3)	<i>Talaromyces</i> sp.	99	AB808419	5,3
BA214E BA380E BA292E	E(3)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	99	HM469430	5,3
BA178D BA148D BA150D	D(3)	<i>Penicillium</i> sp.	98	JQ912017	5,3
BA367E	E(1)	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	99	JQ936326	1,8
BA214E	E(1)	<i>Diaporthe</i> sp.	98	EF488448	1,8
BA108R	R(1)	<i>Hypocrea lixii</i>	99	JQ040359	1,8
BA99R	R(1)	<i>Bionectria ochroleuca</i>	98	HQ607798	1,8
BA163D BA168D BA167D BA158D BA174D 162D BA173D	BA157D BA159D BA160D D(20) BA146D	<i>Aspergillus niger</i>	98	KF304798	35,1

BA153D BA175D  
 BA147D BA183D  
 BA180D BA177D  
 BA155D BA179D  
 BA154D

BA142D						
BA176D	D(3)	<i>Aspergillus</i> sp.	99	JF312217	5,3	
BA161D						
BA181D	D(1)	<i>Aspergillus flavus</i>	99	EF409804	1,8	
BA149D		<i>Aspergillus sustus</i>	98	AY213638	5,3	
BA140D	D(3)					
BA182D						
BA139D	D(3)	<i>Gibberella intermedia</i>	98	JQ272470	1,8	
BA145D	D(3)	<i>Gibberella aoniliformis</i>	98	AB374142	5,3	
BA143D						
BA170D						
BA144D	D(2)	<i>Neodeighonia phoenicum</i>	98	EU673340	3,5	