

**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**

**DIVERSIDADE E TRAÇOS FUNCIONAIS DE MICRO-  
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E RIZOSFÉRICOS DE *Butia  
purpurascens* GLASSMAN**

Autora: Cintia Faria da Silva  
Orientador: Edson Luiz Souchie

Rio Verde – GO  
agosto – 2014

**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**

**DIVERSIDADE E TRAÇOS FUNCIONAIS DE MICRO-  
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E RIZOSFÉRICOS DE *Butia  
purpurascens* GLASSMAN**

Autora: Cintia Faria da Silva  
Orientador: Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada, como parte das exigências para 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 - Câmpus Rio Verde – Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde – GO  
agosto – 2014

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

S586d Silva, Cintia Faria da.

Diversidade e traços funcionais de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *Butia purpurascens* Glassman / Cintia Faria da Silva -- 2014.

68fls :il, fig., tabs.

Orientador: Prof. Dr Edson Luiz Souchie.

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

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

CDD 631.46

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

**DIVERSIDADE E TRAÇOS FUNCIONAIS DE  
MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E  
RIZOSFÉRICOS DE *Butia purpuracens* GLASSMAN**

Autora: Cintia Faria da Silva  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

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

APROVADA em 06 de agosto de 2014.

Dra. Josy Fraccaro de Maris  
*Avaliadora externo*  
UFG – Câmpus Jataí/GO

Dr. Marcos Antônio Soares  
*Avaliador externo*  
UFMT/MT

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

Profa. Dra. Mariana Costa Mello Gonçalves  
*Avaliador interno*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades. A minha família, meus pais, Severino e Maria Aparecida, e minhas irmãs Lessi, Silvia e Nádia, pelo apoio, incentivo e paciência no decorrer desta jornada.

Ao professor Dr. Edson Luiz Souchie, pela orientação, amizade, confiança e incentivo com palavras de apoio, fazendo com que eu sempre seguisse em frente “vencendo as barreiras do mal”.

Ao professor Dr. Marcos Antônio Soares, pela coorientação, com seus ensinamentos, orientações e contribuições durante o trabalho, colaborando para o meu crescimento acadêmico e por me receber em seu laboratório de portas abertas.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia.

Ao Lailson, da empresa Flora Vivo, pelo auxílio, disponibilização de sementes e compartilhamento de sua ampla experiência empresarial.

Ao Aurélio e Jehane, pela participação e árduo empenho em parte do projeto para a produção de mudas.

À Andressa, Letícia, Ricardo, Ester e Marcelo do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana da UFMT, em especial à Jaqueline e Katia, que foram parceiras em uma etapa do trabalho. Que Deus retribua a vocês a prestatividade na execução deste trabalho. Obrigada pelo compromisso assumido durante o experimento.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação, especialmente a Marussa, Thiago, Vanessa, Priscila, Marília e Kelly, pelo convívio, aprendizado e momentos divididos juntos, sejam eles bons ou ruins.

Às amigas Débora, Roberta, Michelle, Regiane, Léa, Wanessa, Katiúscia, Vanessa de Cássia e Camila, que mesmo distantes, sempre me apoiaram e incentivaram na busca de algo melhor.

Aos amigos e companheiros “ThunderCats” do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Isabel, Moacir, Paula, Juliana, Maria Gabriela, Maíra, Luiz, Rodrigo e Thaís, Lorena Cabral e Lorena Landi, pela colaboração, convívio, conversas, risadas e companheirismo. Em especial à Liliane, Vaneça, Andriane e Polyana, que participaram diretamente deste trabalho como integrantes do projeto e me ajudaram em todos os momentos. Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEG, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho o meu sincero agradecimento!

*“O que vale na vida não é o ponto de partida  
e sim a caminhada,  
caminhando e semeando,  
no fim terás o que colher.”*

**Cora Coralina**

## BIOGRAFIA DA AUTORA

Cintia Faria da Silva, natural de Rio Verde – GO, filha de Severino Ferreira da Silva e Maria Aparecida Faria da Silva, graduada em Ciências – Licenciatura Plena Habilitação em Biologia pela FESURV - Universidade de Rio Verde e especialista em Microbiologia e Higiene de Alimentos pela PUC Goiás – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Em agosto de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia (Mestrado) do IF Goiano – Câmpus Rio Verde, concluindo em agosto de 2014.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
INDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE APÊNDICES .....	v
TABELAS DO APÊNDICE .....	v
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	vi
RESUMO GERAL .....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	3
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
3. OBJETIVO .....	10
CAPÍTULO I .....	11
Isolamento e caracterização genética de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de <i>Butia purpurascens</i> Glassman .....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Coleta, processamento das raízes e isolamento dos micro-organismos de <i>Butia purpurascens</i> .....	16
2.2. Identificação Molecular.....	18
2.2.2. Bactérias .....	18
2.2.3. Fungos .....	19
2.3. Análise dos dados .....	21
3. RESULTADOS.....	21

3.1. Isolamento.....	21
3.2. Identificação molecular .....	22
3.3. Diversidade.....	25
4. DISCUSSÃO .....	25
5. CONCLUSÕES .....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
CAPÍTULO II .....	34
Traços funcionais de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de <i>Butia</i>	
<i>purpurascens</i> Glassman.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUÇÃO .....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1. Critérios para a seleção dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos de <i>B. purpurascens</i> com potencial para promoção do crescimento .....	39
2.1.2. Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de CaHPO <sub>4</sub> .....	39
2.1.3. Avaliação qualitativa de síntese de ácido indolacético (AIA) .....	39
2.2. Testes de quantificação da solubilização de CaHPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub> em meio líquido e síntese de AIA .....	40
2.2.1. Quantificação da solubilização em meio líquido de CaHPO <sub>4</sub> e FePO <sub>4</sub> .....	40
2.2.2. Quantificação de síntese de AIA por micro-organismos isolados de raízes e rizosfera de <i>B. purpurascens</i> .....	40
2.3. Análise estatística.....	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1 Solubilização de fosfatos.....	41
3.2. Produção de AIA.....	43
4. DISCUSSÃO .....	45
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
CONCLUSÃO GERAL .....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Tabela 1.</b> Comunidade de micro-organismos rizosféricos isolados de <i>B. purpurascens</i> capazes de solubilizar $\text{CaHPO}_4$ <i>in vitro</i> , em Rio Verde, GO.....	21
<b>Tabela 2.</b> Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de <i>B. purpurascens</i> , baseada no sequenciamento da região 16S.....	23
<b>Tabela 3.</b> Identificação molecular dos isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de <i>B. purpurascens</i> , baseado no sequenciamento da região ITS.....	24
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Tabela 1.</b> pH e solubilização <i>in vitro</i> de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por bactérias obtidas de raízes e rizosfera de <i>B. purpurascens</i> , em Rio Verde, GO.....	42
<b>Tabela 2.</b> pH e solubilização <i>in vitro</i> de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de <i>B. purpurascens</i> , em Rio Verde, GO.....	43
<b>Tabela 3.</b> Produção <i>in vitro</i> de ácido indolacético (AIA) por bactérias obtidas de raízes e rizosfera de <i>B. purpurascens</i> , em Rio Verde, GO.....	44
<b>Tabela 4.</b> Produção <i>in vitro</i> de ácido indolacético (AIA) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de <i>B. purpurascens</i> , em Rio Verde, GO.....	45

## INDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	
<b>Figura 1.</b> Características morfológicas de <i>Butia purpurascens</i> . A- palmeira-jataí; B- folha arqueada; C- inflorescência; D- frutos. Foto A - fonte: Dr. Aurélio Rúbio Neto, 2012; Fotos B, C, D - fonte: Letícia Rezende Oliveira, 2010.....	5

## ÍNDICE DE APÊNDICES

### TABELAS DO APÊNDICE

	Página
<b>Tabela 1.</b> Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de <i>B. purpurascens</i> , baseada no sequenciamento da região 16S.....	53
<b>Tabela 2.</b> Identificação molecular dos isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de <i>B. purpurascens</i> , baseado no sequenciamento da região ITS .....	55

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$\mu\text{L}$	Microlitro
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
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
FMA	Fungo micorrízico arbuscular
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
O	Oeste
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
pH	Potencial de hidrogênio
rDNA	DNA recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
S	Sul
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
UFC	Unidade formadora de colônia
v/v	Volume/volume

## RESUMO GERAL

SILVA, CINTIA FARIA DA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, agosto de 2014. **Diversidade e traços funcionais de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *Butia purpurascens* Glassman.** Orientador: Edson Luiz Souchie. Coorientador: Marcos Antônio Soares.

A palmeira *Butia purpurascens* Glassman, conhecida como palmeira-jataí, é uma espécie arbórea ornamental com grande potencial para o cultivo no paisagismo, produção de biocombustível e arborização urbana de regiões tropicais. Distribui-se em fisionomias abertas de Cerrado, restrita ao sudoeste goiano, porém está ameaçada de extinção, pelas ações antrópicas e porque suas sementes possuem baixas porcentagens de germinação. A interação planta x micro-organismos pode ser favorável para contornar tal problema, por meio do estudo de estratégias para maximizar a promoção do crescimento de plântulas de areáceas, na fase de viveiro. Especificamente, a seleção e uso de micro-organismos endofíticos e rizosféricos benéficos, pode reduzir o tempo de produção das mudas e aumentar sua capacidade de estabelecimento em campo. Com este trabalho, objetivou-se isolar e caracterizar a comunidade endofítica e rizosférica de *Butia purpurascens* Glassman e avaliar seu potencial biotecnológico, quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e fosfato de ferro, sintetizar ácido indolacético *in vitro* para seleção e uso como promotores de crescimento de mudas em fase de viveiro. Através da análise molecular foram detectadas 38 espécies bacterianas, com 17 gêneros e 18 espécies fúngicas com 16 gêneros distintos. Em diferentes proporções, foi detectada a capacidade de alguns isolados em solubilizar fosfatos e produzir o fitormônio auxina.

**PALAVRAS-CHAVES:** palmeira-jataí, micro-organismos, potencial biotecnológico.

## GENERAL ABSTRACT

SILVA, CINTIA FARIA DA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, August 2014. **Diversity and functional traits of endophytic and rhizospheric microorganisms from *Butia purpurascens* Glassman.** Advisor: Edson Luiz Souchie. Co Advisor: Marcos Antônio Soares.

*Butia purpurascens* Glassman is a typical tropical palm known as “palmeira-jataí” with high landscaping potential, biofuel production and urban forestation of tropical regions. It is found mainly in Goiás Southwest region and currently is under extinction risk, due to anthropic actions and low seed percentage germination. The plant interaction x microorganisms may be favorable to overcome this problem through the study of strategies to maximize the palm seedling growth in nursery. Specifically, the screening and use of endophytic and rhizospheric beneficial microorganisms can reduce the seedling production time and increase their establishment in field conditions. This work aimed to isolate and characterize the endophytic and rhizospheric community of *B. purpurascens* Glassman. This work also evaluated their biotechnological potential in relation to the calcium/iron phosphate solubilization and indolacetic synthesis under *in vitro* conditions in order to improve the plant growth promotion in nursery. Through molecular analysis, 38 bacteria species, 17 fungi genera and 18 fungi species were identified. In different proportions, the ability of some isolates to solubilize phosphates and auxin production were detected.

**KEYWORDS:** palmeira-jataí, microorganisms, biotechnological potential.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é o segundo maior domínio da América do Sul, caracterizado por um mosaico de vegetação variando de pastagens a formações florestais (Eiten, 1972). Rizzini (1997) afirmou que compreendia 200.000.000 hectares e a região Centro-Oeste era composta por cerca de 150 milhões de hectares. Atualmente, de acordo com Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2014), este domínio ocupa a área de 2.036.448 km<sup>2</sup>, cerca de 22% do território nacional, com sua área contínua abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas.

Com abundância de espécies endêmicas, vem sofrendo excepcional perda de habitat, ainda assim, é considerado um *hotspot* mundial de biodiversidade, pela sua diversidade biológica, reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas com grande variedade de habitats, que determinam a notável variação de espécies entre diferentes fitofisionomias (MMA, 2014).

Entre as várias espécies vegetais, as palmeiras possuem presença marcante na formação savânica, denominadas palmeiral, e podem ser encontrados diferentes subtipos de palmeirais, que variam de estrutura de acordo com a espécie (Nascimento, 2010), com ampla distribuição, ocorrendo principalmente nos trópicos e subtropicais (Lima et al., 2003).

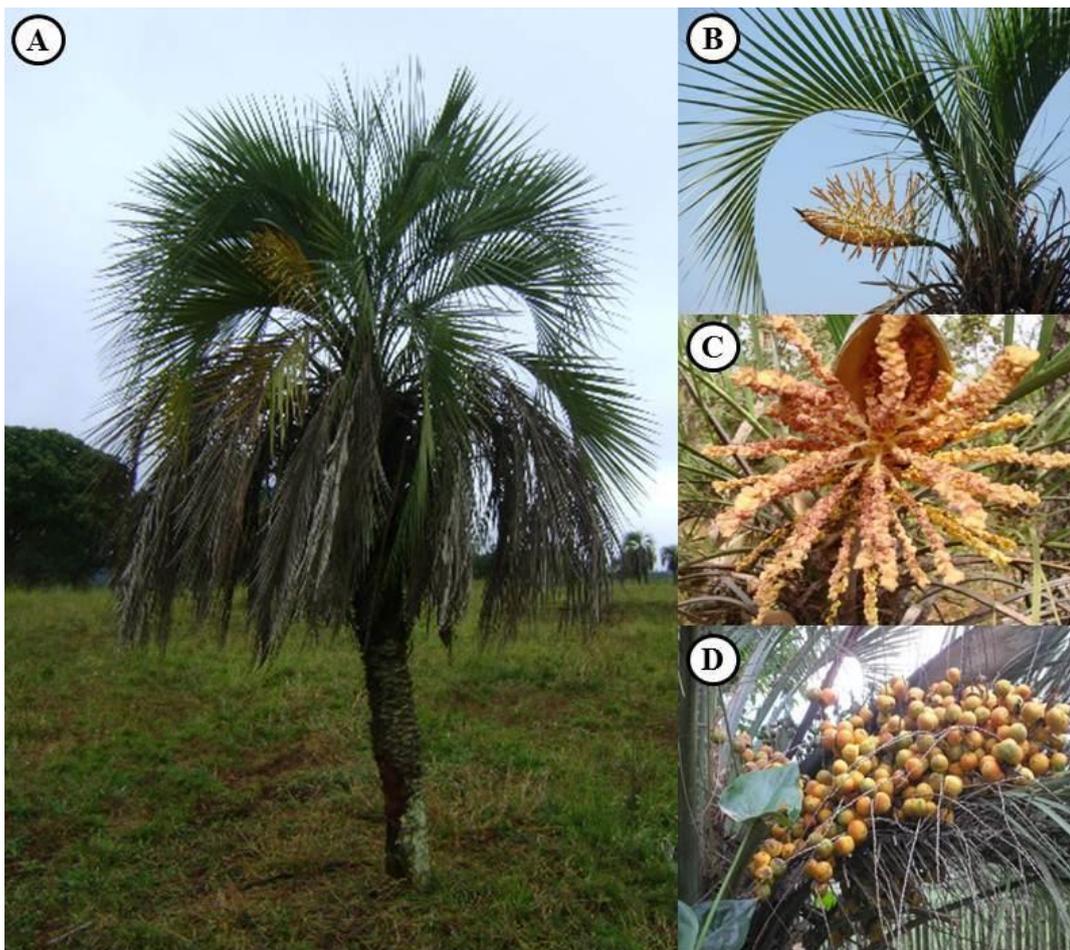
Os palmeirais são de beleza singular e se destacam como um recurso natural e econômico para as populações humanas e animais. Apesar de serem componentes importantes na vegetação do Cerrado, são encontrados poucos trabalhos relacionados (Guilherme e Oliveira, 2011).

A palmeira *Butia purpurascens* Glassman popularmente conhecida como palmeira-jataí, butiá ou coqueiro-de-vassoura é uma planta ornamental, com grande potencial para o cultivo no paisagismo e na arborização urbana de regiões tropicais (Lorenzi et al., 2010), além de seus frutos possuírem potencial para a produção de biocombustível. Distribui-se em fisionomias abertas de Cerrado, restrita ao sudoeste goiano, principalmente na região de Jataí, ocorrendo também no Triângulo Mineiro e Mato Grosso do Sul, e em regiões circunvizinhas ao estado de Goiás (Guilherme e Oliveira, 2011).

Trata-se de uma palmeira de pequeno porte, medindo de 1-4 m, de tronco simples, inflorescência em forma de espiga de coloração amarela a púrpura, a frutificação ocorre entre os meses de outubro e dezembro, seus frutos são popularmente conhecidos como butiás e podem ter coloração amarela ou vinácea, sendo muito apreciados pela fauna silvestre e pelo homem, suas folhas possuem característica marcante, são fortemente arqueadas, conferindo a ela potencial ornamental (Lorenzi et al., 2010; Oliveira, 2010).

Embora o nome *B. purpurascens* se deve a coloração arroxeadada dos frutos e flores dessa espécie, na região do sudoeste goiano, Oliveira (2010) comprovou através de estudo genético a ocorrência de mais de uma variedade, com coloração de frutos e flores amareladas.

Em Goiás, a palmeira-jataí vem sofrendo ações antrópicas, com isso, aumentado consideravelmente sua ameaça à extinção em função do agronegócio na região, a acelerada devastação do seu habitat natural, presença de gado, competição com gramíneas invasoras e pelo fogo (Guilherme e Oliveira, 2011), além da falta de métodos de manejo sustentável, pois suas folhas são utilizadas pela população local para a confecção de vassouras, e famílias de baixo poder aquisitivo as utilizam como alternativa para melhorar sua renda (Oliveira, 2010). Contudo, possuem sementes com lentas, heterogêneas e baixas porcentagens de germinação, principalmente em decorrência da dormência física imposta pelo tegumento, que é bastante lignificado (Lorenzi et al., 2010; Rubio Neto, 2010; Rubio Neto et al., 2012).



**Figura 1.** Características morfológicas de *Butia purpurascens*. A- palmeira-jataí; B- folha arqueada; C- inflorescência; D- frutos. Foto A - fonte: Dr. Aurélio Rúbio Neto, 2012; Fotos B, C, D - fonte: Letícia Rezende Oliveira, 2010.

A conservação e uso de espécies nativas são de suma importância na utilização em projetos de reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e obtenção de produtos secundários como, por exemplo, para uso medicinal, alimentação humana, construção civil, paisagismo, biocombustível entre outros.

O conhecimento da interação planta x micro-organismo pode ser favorável em projetos deste tipo (Berg e Smalla, 2009), contribuindo para contornar tal problema. O estudo de estratégias para maximizar a promoção do crescimento de plântulas de areáceas, na fase de viveiro, por meio da seleção e uso de micro-organismos endofíticos e rizosféricos benéficos, pode reduzir o tempo de produção das mudas e aumentar sua capacidade de estabelecimento em campo.

A promoção do crescimento de plantas é um importante benefício com a aplicação destes micro-organismos (Silva et al., 2006; Saravanan et al., 2007), visto que tal habilidade tem sido atribuída a mecanismos diretos, tais como: fixação do

nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de ácido cianídrico (HCN), fitormônios e enzimas, além de mecanismos indiretos como: antagonismo em relação a patógenos que proporcionam, conseqüentemente, 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). Os micro-organismos que apresentam duas ou mais características são conhecidos como potenciais promotores de crescimento de plantas (Chaiharn e Lumyong, 2009, Montañez et al., 2012; Pereira et al., 2012; Vassilev et al., 2012).

O uso de fertilizantes fosfatos na nutrição de plantas é um recurso de alto custo e se relaciona diretamente com a escassez do fosfato de rocha, em que modernos sistemas agrícolas são altamente dependentes da indústria de fertilizante existente com base exclusivamente neste recurso natural, finito e não renovável. A biotecnologia oferece soluções sustentáveis que podem atenuar estes problemas beneficiando a planta, incluindo o uso de micro-organismos solubilizadores de fosfatos (Nahas, 1996; Vassilev et al., 2012).

O fósforo (P) na solução do solo pode ser adsorvido na superfície dos minerais de argila, em solos neutros ou alcalinos, ou na superfície de óxidos de ferro e de alumínio e minerais de argila, em solos ácidos (Barroso e Nahas, 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que bactérias, fungos e actinobactérias são capazes de liberar íons de fosfato, a partir de substâncias inorgânicas fracamente solúveis, disponibilizando assim o P para a planta (Vassilev et al., 2012).

O ácido indolacético (AIA) é a auxina mais produzida pelas bactérias, sendo esta a mais estudada, são capazes de afetar diretamente a morfologia das raízes e aumentar o comprimento e o número de pelos radiculares (Radwan et al., 2005). A biossíntese de AIA por micro-organismos é comumente detectada em gêneros como: *Rhanelia*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Brevundimonas* e *Burkholderia* (Montañez et al., 2012), *Klebsiella* (Arruda et al., 2013) e *Trichoderma atroviride* e está frequentemente associada com seu potencial de estímulo ao crescimento da planta (Gravel et al., 2007).

O uso de micro-organismos endofíticos pode ser boa alternativa na inoculação em sementes, porque tendem a permanecer na plântula originada da semente que colonizavam (Silveira e Freitas, 2007), mostrando ter efeitos benéficos sobre a planta hospedeira, mesmo quando reintroduzidos (Conn e Franco, 2004).

As espécies rizosféricas produtoras de fitormônios também incrementam o desenvolvimento de plântulas, em nível de viveiro, e maximizam sua probabilidade de

estabelecimento em campo. Além dos micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) e produtores de fitormônios, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorecem direta e indiretamente a nutrição e o desenvolvimento vegetal e possuem forte inter-relação com os grupos microbianos supracitados.

Além disso, a seleção e uso de micro-organismos benéficos se traduz em uma forma promissora para o controle de micro-organismos patogênicos, incremento da resistência ao estresse hídrico e redução do custo final das mudas. Entretanto, poucos estudos com foco nesses grupos microbianos e espécies arbóreas nativas do Cerrado têm sido conduzidos em áreas tropicais, principalmente no Brasil (Ferreira et al., 2009).

O aumento da oferta de mudas de arecáceas contribuirá diretamente para a melhoria da qualidade ambiental, o sequestro de CO<sub>2</sub>, a qualidade paisagística das cidades e o aumento das florestas de arecáceas para a obtenção de óleo dos frutos para a indústria de biocombustíveis.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F., PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.15– 22, 2013.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.529-535, 2008.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v.68, p.1–13, 2009.

CHAIHARN M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilisation potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 305–314, 2009.

CONN, V. M.; FRANCO, C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1787–1794, 2004.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, v. 38, p. 139-148, 1972.

FERREIRA, R. F.; CARDOSO, I. C. M; SILVA, C. F.; SOUCHIE, E. L.; CARNEIRO, M. A. C. Rice response to inoculation with P-solubilizing microorganisms from brazilian Cerrado. **Bioscience Journal**, v. 25, p. 1-7, 2009.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1968–1977, 2007.

GUILHERME F. A. G.; OLIVEIRA A. S. Estrutura populacional de *Butia purpurascens* Glassman (Arecaceae) em duas áreas de Cerrado *sensu stricto* no estado de Goiás. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, p. 37-45, 2011.

LIMA, E. S.; FELFILI J. M.; MARIMON B. S.; SCARIOT A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto* no Brasil Central, DF. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 361-370, 2003.

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

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 28 jun. 2014.

MONTAÑEZ, A.; BLANCOB, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21–28, 2012.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 567 – 572, 1996.

NASCIMENTO, A. R. T. Riqueza e etnobotânica de palmeiras no território indígena Krahô, Tocantins, Brasil. **Floresta**, v. 40, p. 209-220, 2010.

OLIVEIRA, L. R. **Estudo da variabilidade genética de *Butia purpurascens* Glassman (Arecaceae) no Sudoeste Goiano utilizando marcadores RAPD**. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. 2010.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, 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. **Physiology and Biotechnology**, v. 63, p. 405-417, 2012.

RADWAN, T. El-S. El-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 997-1004, 2005.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2ª Edição. Âmbito Cultural Edições Ltda, 1997.

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 [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges ex MART.] fruits and seeds. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 34, p. 179-185, 2012.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, 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 (*Annona squamosa* L.) **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA A. P. D.; FREITAS S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Editora Campinas. Instituto Agronômico, 2007. 312p.

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.

VASSILEV N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEVA M. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 851–859, 2012.

### **3. OBJETIVO**

Isolar e caracterizar a comunidade endofítica e rizosférica de *Butia purpurascens* Glassman e avaliar seu potencial biotecnológico, quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e fosfato de ferro, sintetizar ácido indolacético *in vitro* para seleção e uso como promotores de crescimento de mudas em fase de viveiro.

## **CAPÍTULO I**

**Isolamento e caracterização genética de micro-organismos endofíticos  
e rizosféricos de *Butia purpurascens* Glassman**

## RESUMO

A interação planta x micro-organismos é complexa e capaz de influenciar o estabelecimento de comunidades vegetais e alterar diferentes propriedades no ecossistema. Tais relações são alvo de interesse de pesquisadores e possuem diversas aplicações ecológicas e biotecnológicas. Este estudo é o primeiro relato da diversidade microbiana associada à *Butia purpurascens* Glassman. Com este trabalho, objetivou-se isolar e identificar a diversidade genética, através de técnicas de biologia molecular, de micro-organismos endofíticos e rizosféricos cultiváveis de *B. purpurascens*. A partir do sistema radicular e solo rizosférico, foi feito o isolamento de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de palmeira-jataí. Estes foram submetidos à extração de DNA, amplificação da região 16S para bactérias e ITS para fungos e sequenciamento. As sequências foram comparadas no banco de dados do GenBank com outras já conhecidas, por busca de similaridade, via Blastn. A rizosfera e raízes de *B. purpurascens* abrigam grupos diversificados de micro-organismos. Foram identificados 14 gêneros bacterianos endofíticos e 12 rizosféricos pertencentes a três filos (Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria) e 11 gêneros fúngicos endofíticos e 6 rizosféricos exclusivamente do filo Ascomycota. Os gêneros bacterianos mais frequentes isolados no ambiente endofítico foram *Enterobacter* e *Pseudomonas* e, para fungos, *Gibberella* e *Codinaeopsis*. Para o ambiente rizosférico, foram às bactérias do gênero *Bacillus* e *Enterobacter* e fungo *Ceratocystis*. Foi observada diferença entre a comunidade microbiana endofítica e rizosférica de *B. purpurascens*, em que alguns microrganismos habitam somente um ambiente. Futuros estudos que avaliem maior número de indivíduos podem contribuir para confirmação deste fato.

**PALAVRAS-CHAVES:** palmeira-jataí, diversidade genética, biologia molecular, ecologia microbiana.

## ABSTRACT

The microbial plant interaction is complex and able to influence the establishment of plant communities and change different properties on ecosystem. This interaction knowledge is interesting due to its ecological and biotechnological application. This study is the first report of the cultured microbial diversity from *Butia purpurascens* Glassman. This work aimed to isolate and identify the genetic diversity of endophytic and rhizospheric cultured microorganisms from *B. purpurascens* through molecular techniques. From the root system and rhizospheric soil of this palm, the isolation of endophytic and rhizospheric microorganisms was carried out. The bacteria and fungi DNA were extracted, amplified and sequenced. Genome sequences were compared with others on GenBank, using similarity via Blastn. There are different groups of microorganisms on root and rhizosphere of *B. purpurascens*. Fourteen endophytic and 12 rhizospheric bacteria isolates were identified belonging to three phylum (Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria). Similarly, 11 endophytic fungi and six rhizospheric fungi genera, exclusive of Ascomycota phylum, were detected. The most frequent bacteria genera isolated from endophytic environment were *Enterobacter* and *Pseudomonas* while to fungi it corresponded to *Gibberella* and *Codinaeopsis*. From the rhizosphere, *Bacillus* and *Enterobacter* genera while the *Ceratocystis* was the fungi genus most detected. Differences between endophytic and rhizospheric microbial community of *B. purpurascens* were found where some microorganisms were detected in one environment only. Future studies evaluating a higher number of plants can help to confirm these results.

**KEYWORDS:** palmeira-jataí, genetic diversity, molecular biology, microbial ecology.

## 1. INTRODUÇÃO

A palmeira-jataí (*Butia purpurascens* Glassman) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro restrita ao sudoeste goiano, principalmente na região de Jataí, ocorrendo também no Triângulo Mineiro e Mato Grosso do Sul, e em regiões circunvizinhas ao estado de Goiás, possui caráter ornamental com folhas fortemente arqueadas, com grande potencial para o cultivo no paisagismo e na arborização urbana de regiões tropicais (Lorenzi et al., 2010; Guilherme e Oliveira, 2011).

A falta de método de manejo sustentável tem contribuído para a extinção desta espécie, por causa da utilização de suas folhas para a confecção de vassouras (Oliveira, 2010). Além disso, possuem sementes com baixas porcentagens de germinação, e estas são lentas e heterogêneas, em decorrência da dormência física imposta pelo tegumento, que é bastante lignificado (Lorenzi et al., 2010; Rubio Neto, 2010; Rubio Neto et al., 2012).

Ideias inovadoras a partir do uso de micro-organismos podem beneficiar a integração planta x micro-organismo, em sistemas baseados em abordagens de ecossistemas agrícolas e naturais (Philippot et al., 2013). A promoção do crescimento de plantas, através de espécies microbianas, é comumente utilizada para melhorar a produtividade das culturas, tendo ainda grande potencial para resolver os problemas ambientais, como o uso de técnicas de fitorremediação para descontaminação de solos e águas (Bashan et al., 2012).

Os micro-organismos são componentes essenciais nos ecossistemas, pois participam de 80 a 90% dos processos que ocorrem no solo, nos ciclos biogeoquímicos como carbono e nitrogênio, sendo indicadores eficientes e dinâmicos da qualidade do solo (Bresolin et al., 2010). Os diferentes tipos de solo e plantas possuem comunidades

microbianas específicas, e cada espécie de planta é colonizada por uma população, controlada principalmente por variáveis edáficas, especialmente o pH (Berg e Smalla, 2009).

A zona de solo estreita que circunda as raízes das plantas é compreendida como rizosfera. Este microambiente é habitado por inúmeros micro-organismos e invertebrados, considerada uma das interfaces mais dinâmicas na Terra (Philippot et al., 2013), e que pode variar de acordo com fatores relacionados ao solo, idade e espécie vegetal, dentre outros (Campbell e Greaves, 1990). Por meio da liberação de exsudatos da planta, ocorrem processos biológicos e ecológicos complexos, e a microbiota pode ter efeitos diretos sobre o crescimento, desenvolvimento, nutrição e sanidade das plantas (Bais et al., 2006; Philippot et al., 2013).

A composição dos exsudatos de raízes varia de acordo com a espécie vegetal e afeta a diversidade microbiana, estas não só fornecem nutrientes para os micro-organismos, mas algumas espécies também contêm metabolitos antimicrobianos únicos em seus exsudatos (Berg e Smalla, 2009). Estes compostos liberados são ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, açúcares, compostos fenólicos e outros metabolitos secundários que são facilmente utilizados pelos micro-organismos (McNear Jr., 2013).

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) são comumente encontradas na rizosfera e também podem ser isoladas a partir de tecidos internos da planta, chamadas de bactérias endofíticas. Estas têm potencial para uso como inoculante no crescimento de plantas, pela produção de hormônios vegetais ou seus precursores, podendo ter impacto sobre mais de um grupo de hormônios como: ácido abscísico, auxinas, citocininas, etileno, giberelina, ácido jasmônico e ácido salicílico, tanto para a produção como para a degradação, podendo minimizar os impactos ambientais da agricultura (Dood et al., 2010).

Os micro-organismos endofíticos colonizam tecidos internos, sem danificar o hospedeiro (Reinhold-Hurek e Hurek, 2011). Sua estratégia de vida em simbiose pode variar de saprofítico facultativo, parasita a mutualista (Schulz e Boyle, 2005). O benefício é baseado em o equilíbrio entre o micro-organismo e a resposta da planta, caso a interação se torne desequilibrada, sintomas da doença aparecem ou o micro-organismo é excluído por reações de defesa induzida do hospedeiro (Kogel et al., 2006).

A colonização por endofíticos nas plantas pode ocorrer por aberturas naturais e ferimentos, podendo ser fissuras, principalmente na região das raízes, causadas pela emergência de raízes laterais ou pela abrasão ocasionada pelo próprio crescimento

destas ao penetrar no solo ou ainda através de estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos, e até por estruturas de fungos patogênicos (Santos e Varavallo, 2011).

Independentemente da localização dos micro-organismos na planta, estes podem promover o crescimento vegetal, por vários mecanismos, os quais exercem funções relevantes para o hospedeiro (Dood et al., 2010). Nas interações endofíticas ocorrem o fornecimento de nutrientes, redução de estresses abióticos, competição microbiana (Schulz e Boyle, 2005), alterações de propriedades fisiológicas e produção de fitormônios, sendo potencialmente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na farmacêutica e de defensivos agrícolas (Santos e Varavallo, 2011).

Ademais, os micro-organismos são potenciais substitutos de produtos químicos e contribuem para a sustentabilidade ambiental e produtividade do solo, constituindo alternativa estratégica para sistemas de produção agrícola e ecológica, pelo seu valor biotecnológico (Esitken et al., 2010; Santos e Varavallo, 2011).

O conhecimento de aspectos ecológicos e funcionais das comunidades microbianas é de suma importância, visto que através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, há aumento considerável de informações sobre esta diversidade, estrutura e funcionalidade. Isto ocorre pela alta complexidade das comunidades e pelo fato da minoria dos grupos microbianos serem cultiváveis (Bresolin et al., 2010).

Assim, com este trabalho, objetivou-se isolar e identificar a diversidade genética de micro-organismos endofíticos e rizosféricos cultiváveis de *B. purpurascens*, através de técnicas de biologia molecular.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta, processamento das raízes e isolamento dos micro-organismos de *Butia purpurascens***

Coletou-se o sistema radicular de um indivíduo com idade média de 10 anos da espécie vegetal de interesse, próximo ao município de Rio Verde - GO, nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 17° 35' 10.51" S, longitude 50° 59' 13.06" O e altitude de 822 m. 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 – Câmpus Rio Verde.

Para isolamento de micro-organismos rizosféricos, foram escolhidas aleatoriamente 10g de fragmentos das raízes, 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 de cultura GELP (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 contabilizadas e os ajustes de diluição foram realizados para expressão dos resultados em UFC/g de raiz. Colônias solubilizadoras de CaHPO<sub>4</sub> foram isoladas para purificação e estocagem sob refrigeração.

O isolamento dos endofíticos foi realizado com fragmentos de raízes, que 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 µL da água do último enxágue foi retirado 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 até o 10º dia. A frequência de colonização foi avaliada considerando a porcentagem de fragmentos apresentando, pelo menos um endofítico, em relação ao total de fragmentos analisados.

$$\text{Frequência de Colonização} = \frac{\text{Nº fragmentos}}{\text{Total de fragmentos}} \times 100$$

### **2.1.2. Purificação e estocagem das linhagens de micro-organismos**

Isolados bacterianos foram purificados pela técnica da semeadura por estria em meio ágar nutriente (AN). A purificação foi confirmada através do teste de coloração de Gram, as colônias isoladas foram repicadas para vidros de penicilina contendo AN e mantidas em refrigeração, a cada 45 dias, as linhagens foram reativadas e novamente estocadas.

Os fungos esporulantes foram isolados por purificação monospórica e aqueles sem diferenciação de estruturas reprodutivas, isolados por retirada de fragmentos da borda do micélio. Estes foram mantidos em vidros de penicilina contendo meio BDA, sob refrigeração e repicados a cada 60 dias.

Uma réplica de cada isolado foi estocada em ultrafreezer com temperatura média de -80 °C, proporcionando assim, a preservação das culturas em longo prazo. As bactérias foram estocadas em glicerol 80% (v/v) e os fungos em glicerol 30% (v/v), possibilitando a formação e organização de banco de germoplasma microbiano desta espécie arbórea.

## **2.2. Identificação Molecular**

Foram realizados procedimentos de técnicas de biologia molecular em isolados bacterianos e fúngicos para identificação dos mesmos, concluindo com o sequenciamento genético para definição de gênero e, quando possível, da espécie. Os procedimentos de extração, amplificação e purificação do DNA microbiano foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso. Em seguida, as amostras do DNA de cada isolado foram encaminhadas ao Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP – Jaboticabal para sequenciamento.

### **2.2.2. Bactérias**

A extração do DNA genômico total das bactérias purificadas foi realizada segundo a metodologia de Cheng e Jiang (2006). A avaliação da diversidade genética das bactérias foi realizada através do ERIC-PCR, em que os oligonucleotídeos usados foram ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAA GTGACTGGGGTGAGCG-3') (Tian-Xing et al., 2011). O volume da reação de ERIC-PCR foi de 25 µL, contendo 3 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* ERIC1, 1 µl do *primer* ERIC2 e 0,3 µl da enzima taq polimerase (Invitrogen®). Já a amplificação foi realizada nos 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 a eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio em tampão TEB 0,5x. Os tamanhos dos amplificadores foram determinados com marcador 123pb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, Inc.). As imagens foram salvas em fotodocumentador (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 da mesma espécie, sendo que um isolado representante de cada morfotipo foi selecionado para identificação molecular.

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTCAG-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg et al., 1991). O volume da reação do 16S foi de 25 µL, contendo 1 µl de extrato de DNA, 17,45 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* 27 F, 1 µl do *primer* 1492 R e 0,3 µl da enzima taq polimerase (Invitrogen®). 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) e a quantificação do DNA foi realizada com 1 µL do produto por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O sequenciamento foi realizado pelo 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 busca de similaridade via Blastn.

### 2.2.3. Fungos

Os fungos foram crescidos em meio líquido BD (400 mL de infusão de batata, 20 g de dextrose), em temperatura ambiente, por sete dias. O micélio do fungo 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).

O marcador molecular ISSR foi realizado com o oligonucleotídeo BH1 (5' - GTG GTG GTG GTG GTG - 3') (Smith et al., 2002). O volume de 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 (invitrogen®). O programa do PCR consiste em um passo 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.

Os produtos de ISSR-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TEB 0,5x. Os tamanhos dos amplificados foram determinados com marcador 123pb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, Inc.). As imagens foram salvas em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia, Brasil) para análise. A avaliação da diversidade foi obtida por avaliação visual do gel, considerando todos os amplificados visíveis. Por comparação, os isolados com o mesmo perfil de amplificação foram considerados dentro do mesmo morfotipo, sendo a linhagem representante de cada morfotipo selecionada para identificação molecular.

A identificação foi realizada pelo sequenciamento parcial do ITS (Internal Transcribed Spacer) 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 µL contendo 22,35 µL de água ultra pura, 3,5 µL de tampão de PCR 10x, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2,8 µL de dNTP, 1 µL do *primer* ITS 4, 1 µL do *primer* ITS 5 e 0,3 µL da enzima taq polimerase (invitrogen®). 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 a etapa final de alongamento de 72 °C, por 10 min, em um AMPLITHERM Thermal Cyclers.

Os produtos de amplificação, foram purificados (Dunn e Blattner, 1987) e a quantificação do DNA foi realizada com 1 µL do produto da purificação por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O sequenciamento foi realizado pelo 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 busca de similaridade via Blastn (Altschul et al., 1990).

### 2.3. 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

### 3.1. Isolamento

A partir da rizosfera de *B. purpurascens* pode-se observar a colonização pela comunidade de micro-organismos capazes de solubilizar CaHPO<sub>4</sub> *in vitro*, com o isolamento de 79 bactérias e 8 fungos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comunidade de micro-organismos rizosféricos isolados de *B. purpurascens* capazes de solubilizar CaHPO<sub>4</sub> *in vitro*, em Rio Verde, GO.

Micro-organismos	Densidade populacional
Micro-organismos rizosféricos totais (UFC/g de raiz)	1,39x10 <sup>6</sup>
Micro-organismos rizosféricos solubilizadores de CaHPO <sub>4</sub> (UFC/g de raiz)	6,66x10 <sup>4</sup>
Número de bactérias solubilizadoras de CaHPO <sub>4</sub>	79
Número de fungos solubilizadores de CaHPO <sub>4</sub>	8
% de solubilizadores na comunidade total de micro-organismos rizosféricos	<b>4,79</b>

A avaliação da frequência de colonização dos fragmentos de raiz por endofíticos foi de 100%, em 10 dias de incubação, em que foram isolados 66 bactérias e 29 fungos que constituem o banco de endofíticos para uso em experimentos.

Trinta e sete fungos endofíticos e rizosféricos foram agrupados em 26 morfotipos, diferenciados por características macroscópicas como borda, tipo e coloração do micélio, e microscópicas, pela diferenciação de estruturas reprodutivas.

### 3.2. Identificação molecular

Foram submetidos à identificação molecular o total de 66 bactérias endofíticas e 79 rizosféricas. Para fungos foram identificados 29 endofíticos e 8 rizosféricos. As 145 linhagens bacterianas endofíticas e rizosféricas identificadas resultaram em 17 gêneros distribuídos em 38 táxons pertencentes aos filos Proteobacteria, representando as classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - Proteobacteria (65,5%), Firmicutes da classe Bacilli (33,8%) e Actinobacteria da classe Actinobacteria (0,7%). Os gêneros predominantes foram *Bacillus* (31,0%), *Enterobacter* (20%) e *Pseudomonas* (13,8%), *Agrobacterium* (8,3%) e os demais possuindo frequência relativa inferior a 6,3% (Tabela 2).

As 66 linhagens bacterianas endofíticas identificadas resultaram em 14 gêneros distribuídos em 27 táxons pertencentes aos filos Proteobacteria, representando as classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - Proteobacteria (78,8%), Firmicutes da classe Bacilli (19,7%) e Actinobacteria da classe Actinobacteria (1,5%). Os gêneros predominantes foram *Enterobacter* (28,8%), *Pseudomonas* (18,2%), *Bacillus* (15,2%), *Agrobacterium* (9,1%) e os demais possuindo frequência relativa inferior a 6,2% (Tabela 2).

As 79 linhagens bacterianas rizosféricas foram identificadas em 12 gêneros distribuídos em 25 táxons, pertencentes aos filos Proteobacteria, representando as classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - Proteobacteria (54,4%) e Firmicutes da classe Bacilli (45,6%). Os gêneros predominantes foram *Bacillus* (44,3%), *Enterobacter* (12,7%), *Pseudomonas* (10,1%), *Agrobacterium* (7,6%) e os demais possuindo frequência relativa inferior a 6,4% (Tabela 2).

O agrupamento por morfotipo dos isolados fúngicos dos dois ambientes avaliados, indicou a presença de 26 grupos, diferenciados por características macroscópicas, após identificação molecular de um representante de cada grupo, através do perfil de amplificação do marcador molecular ISSR das diferentes linhagens (dados não mostrados), pôde-se detectar perfis idênticos, possibilitando a identificação de 18 delas.

Os grupos morfológicos foram identificados pelo sequenciamento da região ITS da grande subunidade do gene rRNA. A identificação molecular revelou 18 táxons, com alta identidade, sendo usado como critério de similaridade, ao nível de espécie, acima de 97% de identidade da região ITS (Brien et al., 2005). Em seguida, as sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank.

**Tabela 2.** Identificação molecular de isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *B. purpurascens*, baseada no sequenciamento da região 16S.

Isolados	Ambiente / Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência Relativa (%)
BP1EB	E (1)	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	AB681857	98	0,7
BP60EB	E (6) / R (6)	<i>Pseudomonas putida</i>	JQ701740	99	8,3
BP61EB	E (1)	<i>Enterobacter oryzae</i>	JF513179	99	0,7
BP276EB	E (1)	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	KF114029	99	0,7
BP321EB	E (6) / R (6)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AB826000	99	8,3
BP324AEB	E (2) / R (1)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	KC689293	99	2,1
BP336EB	E (2)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	KC469709	99	1,4
BP342EB	E (1) / R (1)	<i>Burkholderia tropica</i>	HQ023259	97	1,4
BP3EB	E (2)	<i>Rhizobium huautlense</i>	KC355318	99	1,4
BP7EB	E (4) / R (4)	<i>Pantoea cypripedii</i>	JX556216	98	5,5
BP59EB	E (10) / R (6)	<i>Enterobacter asburiae</i>	EU221358	99	11,0
BP46EB	E (2) / R (5)	<i>Bacillus subtilis</i>	KF241533	99	4,8
BP318EB	E (3) / R (2)	<i>Pectobacterium cypripedii</i>	JF430157	99	3,5
BP38EB	E (1)	<i>Microbacterium oxydans</i>	EU714340	96	0,7
BP42EB	E (1)	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	HQ683957	98	0,7
BP35EB	E (1)	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	JF899259	99	0,7
BP339EB	E (1)	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	HQ683877	96	0,7
BP58EB	E (1)	<i>Bacillus megaterium</i>	KC609020	99	0,7
BP343EB	E (6) / R (20)	<i>Bacillus pumilus</i>	GU969599	99	17,9
BP371EB	E (2)	<i>Pseudomonas mosselii</i>	KC293833	98	1,4
BP356EB	E (1)	<i>Achromobacter insolitus</i>	JQ659574	99	0,7
BP15EB	E (2) / R (1)	<i>Brevibacillus agri</i>	HM629394	99	2,1
BP23EB	E (5) / R (2)	<i>Enterobacter cloacae</i>	HM854373	98	4,8
BP261EB	E (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KF358443	97	0,7
BP323EB	E (1) / R (2)	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KF475838	98	2,1
BP334EB	E (1) / R (1)	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	NR_102805	99	1,4
BP8RB	E (1) / R (1)	<i>Pseudomonas sp.</i>	AB461802	96	1,4
BP188RB	R (3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KC153122	99	2,1
BP5RB	R (1)	<i>Bacillus safensis</i>	KF318396	99	0,7
BP61RB	R (4)	<i>Yokenella regensburgei</i>	AB681877	99	2,8
BP35RB	R (1)	<i>Bacillus altitudinis</i>	KC414719	99	0,7
BP44RB	R (1)	<i>Bacillus aerophilus</i>	KC414720	99	0,7
BP55RB	R (6)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KF483660	99	4,1
BP57RB	R (1)	<i>Bacillus cereus</i>	KF475814	99	0,7
BP16RB	R (1)	<i>Pantoea sp.</i>	CP002433	96	0,7
BP187RB	R (1)	<i>Serratia nematodiphila</i>	HF585498	99	0,7
BP212RB	R (1)	<i>Klebsiella variicola</i>	JX968498	99	0,7
BP54RB	R (1)	<i>Burkholderia sp.</i>	KF059273	95	0,7

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

A análise molecular dos grupos revelou táxons especificamente do filo Ascomycota, sendo encontradas três classes: Sordariomycetes (83,8%), Eurotiomycetes (10,8%) e Dothideomycetes (5,4%), distribuídas em 16 gêneros, predominantes por

*Gibberella* (20,5%), *Fusarium* (15,4%), *Codinaeopsis* (12,8%), *Diaporthe* (10,3%), *Ceratocystis* (7,7%), *Phomopsis* e *Hypocreales* (5,1%), *Curvularia*, *Bionectria*, *Penicillium*, *Periconia*, *Hamigera*, *Talaromyces*, *Viridispora*, *Neodeightonia* e *Aspergillus* (2,6%).

Foram identificadas 29 linhagens fúngicas endofíticas, com 12 gêneros distribuídos em 13 táxons pertencentes às classes Sordariomycetes (89,7%) e Eurotiomycetes (10,3%). Os gêneros predominantes foram *Gibberella* (27,6%), *Codinaeopsis* (17,2%), *Fusarium* (13,8%), *Diaporthe* (13,8%), *Phomopsis* (6,9%), *Bionectria*, *Penicillium*, *Periconia*, *Hamigera*, *Talaromyces* e *Viridispora*, (3,4%), conforme Tabela 3.

A identificação de 8 linhagens fúngicas rizosféricas se distribuiu em 6 táxons, pertencentes as classes Sordariomycetes (62,5%), Dothideomycetes (25%) e Eurotiomycetes (12,5%) e em 6 gêneros, predominantes por *Fusarium* e *Ceratocystis* (25%), *Curvularia*, *Neodeightonia*, *Hypocreales* e *Aspergillus* (12,5%) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação molecular dos isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de *B. purpurascens*, baseado no sequenciamento da região ITS.

Isolado	Ambiente / Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência Relativa (%)
BP328EF	E (5)	<i>Codinaeopsis</i> sp.	EF488392	99	13,5
BP364EF	E (1)	<i>Bionectria ochroleuca</i>	HQ607832	99	2,7
BP16EF	E (1)	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GU566198	97	2,7
BP5EF	E (8)	<i>Gibberella moniliformis</i>	JN232122	99	21,6
BP375EF	E (2)	<i>Phomopsis</i> sp.	EF488379	99	5,4
BP314EF	E (2)	<i>Fusarium proliferatum</i>	HQ332533	99	5,4
BP14EF	E (1)	<i>Fusarium oxysporum</i>	AY669123	99	2,7
BP329EF	E (1)	<i>Periconia macrospinoso</i>	FJ536208	99	2,7
BP33EF	E (1)	<i>Hamigera insecticola</i>	JQ425375	98	2,7
BP40EF	E (1)	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	JX965247	99	2,7
BP55EF	E (1) / R (2)	<i>Fusarium concentricum</i>	HQ379635	99	8,1
BP332EF	E (1)	<i>Viridispora diparietispora</i>	JN049838	97	2,7
BP341EF	E (4)	<i>Diaporthe</i> sp.	EF423549	95	10,8
BP196RF	R (2)	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	JQ963886	99	5,4
BP62RF	R (1)	<i>Curvularia affinis</i>	EF187909	99	2,7
BP191RF	R (1)	<i>Neodeightonia phoenicum</i>	HQ443209	99	2,7
BP202RF	R (1)	<i>Hypocreales</i> sp.	HQ248209	98	2,7
BP192RF	R (1)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	JQ316521	97	2,7

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

### 3.3. Diversidade

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener  $H'$  encontrados para as populações microbianas de *B. purpurascens* foram: bacterianas endofíticas (2,97) e rizosféricas (2,73), para as fúngicas endofíticas (2,23) e rizosféricas (1,73).

## 4. DISCUSSÃO

A interação planta x micro-organismo é complexa e capaz de influenciar o estabelecimento de comunidades vegetais e alterar propriedades no ecossistema. Tais relações são alvo do interesse de pesquisadores e os resultados, além de contribuir para esclarecer os mecanismos de interação, possuem relevantes aplicações ecológicas e biotecnológicas. Este trabalho, o primeiro desta natureza, inicia a elucidação da diversidade taxonômica e genética de micro-organismos cultiváveis endofíticos e rizosféricos em *B. purpurascens* no Cerrado brasileiro.

O estudo da diversidade microbiana pode ser definido em termos de diversidade taxonômica, genética e funcional, visando à riqueza de espécies, bem como a comunidade real. A versatilidade metabólica de uma população é baseada na sua variabilidade genética e sua capacidade interativa com outras populações de espécies com diversidade funcional (Jha et al., 2010).

Características como tipo de solo, clima e espécie vegetal podem afetar a comunidade microbiana, sendo importante compreender as interações planta x micro-organismos, pois estas desempenham papel ecológico fundamental na reciclagem de nutrientes e promoção de crescimento vegetal (Kumar et al., 2012).

Jha et al. (2010) em trabalho realizado com rizosfera de *Jatropha curcas* (pinhão-manso), de cinco diferentes condições de solo em locais distintos do estado de Gujarat na Índia, obtiveram índices de Shannon ( $H'$ ) entre 0,96 - 0,92, demonstrando que nestas condições as plantas geram forte pressão de seleção na rizosfera, associada com bactérias benéficas para o seu crescimento e sanidade, resultando em baixa diversidade bacteriana. Neste trabalho, para as bactérias rizosféricas o valor de  $H'$  foi alto 2,73, indicando maior diversidade bacteriana neste ambiente.

O perfil da diversidade de bactérias halotolerante de *Suaeda fruticosa* do deserto salino teve o índice  $H' = 1,41$ , mostrando que a comunidade de organismos que residem em determinado nicho é específica e dependente dos fatores físicos e ambientais (Goswami et al., 2014). Com base nos resultados de índices de diversidade

bacteriana obtidos para *B. purpurascens*, pode-se afirmar que há maior diversidade de espécies endofíticas ( $H' = 2,97$ ) e rizosféricas ( $H' = 2,73$ ), do que em *S. fruticosa*, indicando menor pressão de seleção.

Alberto (2013) em estudo similar no Cerrado goiano com fungos endofíticos de *Anacardium othonianum* (caju-de-árvore-do-cerrado) detectou  $H'$  de 1,82, valor inferior ao encontrado neste trabalho. Já Bezerra et al. (2013) em trabalho realizado com *Cereus jamacaru* (Mandacará), em floresta tropical seca no Brasil, entre os meses de setembro a novembro encontraram uma diversidade superior ( $H' = 2,99$ ).

Tal diversidade microbiana descrita no presente trabalho evidenciou diferenças na comunidade endofítica e rizosférica, sendo que alguns dos gêneros descritos foram detectados apenas em ambiente. Kumar et al. (2012) em pesquisa no vale Kangra, Índia, com bactérias associadas a raízes de *Ajuga bracteosa*, planta medicinal tradicional na Índia e China, encontraram os filos Proteobacteria (69,9%), Firmicutes (24,4%) e Actinobacteria (5,7%). Os dois primeiros descritos naquele trabalho também foram detectados na comunidade rizosférica de *B. purpurascens*.

Estudo realizado em solo de três regiões do Cerrado de Minas Gerais, Brasil, analisando sequências de 16S rRNA foi possível identificar uma comunidade bacteriana formada por gêneros como *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia* e *Leuconostoc* (Mesquita et al., 2013).

No Rio Grande do Sul, um trabalho desenvolvido com raízes e solo rizosférico de plantas de milho foram encontrados em associação 21 gêneros de rizobactérias, sendo os gêneros dominantes *Klebsiella* e *Burkholderia* (Arruda et al., 2013). No presente trabalho, diferentemente, os gêneros de bactérias rizosféricas dominantes foram *Bacillus* e *Enterobacter*, sendo o último, também dominante entre as bactérias endofíticas.

Em pesquisa realizada em Cingapura por Madhaiyan et al. (2013) com bactérias endofíticas isoladas de raízes de *Jatropha curcas* (pinhão-mansão) das regiões da Indonésia, China e Índia, a maior predominância foi obtida por estirpes do gênero *Enterobacter* de espécies como: *E. oryzae*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *E. ludwigii*, linhagens descritas nos resultados deste trabalho, algumas presentes apenas no ambiente endofítico e outras em ambos os ambientes.

O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua diversidade de habitat e fisiologia, sendo que algumas estirpes têm capacidade de degradação de compostos recalcitrantes, tornando-as importantes na biorremediação de poluentes naturais e xenobióticos, além

de estimular o crescimento de plantas, por meio de diversos mecanismos (Patel et al., 2011; Behera et al., 2014).

O *Bacillus* é um gênero de micro-organismos que possui habilidades notáveis através de múltiplos mecanismos com a síntese de vasta gama de substâncias benéficas, tanto para promover o crescimento de plantas, com traços funcionais como a solubilização de fosfatos, produção de AIA, fixação de nitrogênio (Idris et al., 2007; Kavamura et al., 2013) ou para o controle biológico de muitos fitopatógenos comuns, com atributos como a produção de HCN, sideróforos, enzimas hidrolíticas e antibióticos (Kumar et al., 2012).

*Bacillus pumilus* é conhecido pela produção de enzimas como proteases amplamente utilizadas na indústria em setores como alimentos, produtos químicos, indústrias de detergente e couro, também usado no controle biológico de doenças de plantas, pela produção de antifúngicos, antibióticos e quitinases (Zhang et al., 2010). Tal espécie demonstrou maior frequência relativa, sendo facilmente encontrada em raízes e rizosfera de *B. purpurascens*.

Yadav et al. (2013) isolaram cepas de *Brevibacillus* sp. a partir de jazidas na Índia, em que o termotolerante demonstrou capacidade de solubilizar fosfato em condições *in vitro* e no presente trabalho, como endofítico e rizosférico, também foi isolado tal gênero.

Entre as classes de fungos, os ascomicetos são citados como produtores compostos ativos antimicrobianos. Em estudo com *Vitis labrusca* na região de São Paulo, Brasil, 48,14% de fungos endófitos isolados de pertenciam ao filo Ascomycota (Burm et al., 2012), no presente trabalho 100% dos isolados se remetem a este filo, o que sugere que podem estar envolvidos na proteção da planta hospedeira contra doenças fungicas.

Alberto (2013) ao estudar a comunidade de fungos endofíticos de cajú-de árvore-do-cerrado, descreveu o isolamento de gêneros como *Penicillium*, *Fusarium*, *Periconia*, *Bionectria* e *Diaporthe*, alguns dos gêneros descritos neste trabalho, indicativo que estes gêneros são comuns a hospedeiros que habitam locais como o Cerrado brasileiro.

O fungo *Penicillium purpurogenum* é de grande interesse para a indústria alimentícia pela produção do pigmento vermelho através de efeitos combinados entre pH e temperatura, estes são frequentemente mais estáveis e solúveis do que aqueles a partir de fontes vegetais ou animais, podendo levar a alta produtividade, são utilizados

como aditivos, intensificadores de cor, antioxidantes etc (Méndez et al., 2011). A referida espécie fúngica, igualmente, foi detectada no presente trabalho.

Os fungos endófitos de cacto, em floresta tropical seca brasileira, mais frequentemente isolados por Bezerra et al. (2013), pertencem ao gênero *Fusarium* e *Aspergillus*. Srinivasan et al. (2012) também isolaram tais gêneros em solos afetados por saís na Índia. No presente trabalho, similarmente, os referidos gêneros também foram detectados em *B. purpurascens* no ambiente endofítico e rizosférico.

O gênero *Fusarium* é capaz de produzir grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo micotoxinas, como as fumonisinas, que são prejudiciais para seres humanos e animais (Matić et al., 2013). Apesar de ser conhecido por sua patogenicidade, possui espécies não patogênicas eficazes no controle biológico de fungos fitopatogênicos, entretanto, espécies como *Fusarium oxysporum* são capazes de produzir toxinas e provocar doenças em plantas, invalidando assim a utilização do *Fusarium* para o biocontrole, por causa dos riscos de contaminação dos alimentos (Brum et al., 2012). No presente trabalho, a capacidade fitopatogênica e a de biocontrole deste gênero não foram avaliadas.

O fungo *Gibberella moniliformis* corresponde à fase anamórfica *Fusarium verticillioides*, comumente colonizam plantas de milho, podem atuar como endófitos ou agente patogênicos, em função de contextos ambientais e genéticos que ainda não são bem compreendidos (Desjardins et al., 2007). O *Fusarium verticillioides* pode causar doenças como podridão de raízes, colmo e grãos ardidos, sendo a espécie altamente toxigênica pela produção de micotoxinas (Covarelli et al., 2012).

O fungo *Aspergillus brasiliensis*, por meio da fermentação em estado sólido, pode produzir enzimas microbianas industrialmente importantes de baixo custo, como a naringinase, uma enzima de grande potencial nas indústrias farmacêutica e de alimentos para a biotransformação de esteroides, antibióticos e, particularmente, para glicosídeos hidrólise (Shanmugaprakash et al., 2014).

Chen et al. (2013) em estudo observaram que o fungo endofítico de grande espectro *Phomopsis*, isolado da casca interna de *Bischofia polycarpam* pode acelerar decomposição de serapilheira pela degradação de lignina, aumentando a concentração de nutrientes do solo, assim promovendo o crescimento de plantas, além de induzir a planta a melhorar sua capacidade defensiva.

A palmeira *B. purpurascens* possui uma assembleia de micro-organismos heterotróficos endofíticos e rizosféricos antes, totalmente desconhecida. Este estudo é o

primeiro relato da diversidade microbiana associada a esta espécie arbórea. Por meio dele, foi possível formar um banco de espécies microbianas e conhecer estes microorganismos, os quais podem auxiliar em pesquisas futuras para o desenvolvimento de processos e, ou produtos, a fim de contribuir com a melhoria da qualidade do solo, promoção do crescimento e produtividade vegetal.

## 5. CONCLUSÕES

- A rizosfera e raízes de *B. purpurascens* abrigam grupos diversificados de organismos cultiváveis dos quais participam fungos, bactérias e actinobactérias.

- Quatorze gêneros bacterianos endofíticos e 12 rizosféricos pertencentes a três filos (Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria) e 11 gêneros fúngicos endofíticos e 6 rizosféricos, exclusivamente do filo Ascomycota, foram detectados no ambiente endofítico e rizosférico de *B. purpurascens*.

- Os gêneros mais frequentes isolados no ambiente endofítico para as bactérias foram *Enterobacter* e *Pseudomonas* e, para fungos, *Gibberella* e *Codinaeopsis*. Para o ambiente rizosférico, foram as bactérias do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e fungo *Ceratocystis*.

- Foi observada diferença entre a comunidade microbiana endofítica e rizosférica de *B. purpurascens*, em que alguns microrganismos habitam somente em um ambiente, sendo que futuros trabalhos avaliando maior número de indivíduos podem contribuir para confirmação deste fato.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER W.; MYERS, E. W. LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F., PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.15– 22, 2013.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S., VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233–66, 2006.

BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 171– 189, 2012.

BEHERA B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove - A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97–110, 2014.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.

BEZERRA, J. P.; SANTOS, M. G. S.; BARBOSA, R. N.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S. GOMES, B. S.; PAIVA, L. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; SOUZA-MOTTA, C. M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, p. 53–63, 2013.

BRESOLIN, J. D.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H.; SILVA, M. R. S. S.; PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391-403, 2010.

BRIEN, H. E. O., PARRENT, J. L., JACKSON, J. A., MONCALVO, J. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544–5550, 2005.

BRUM, M. C. P.; ARAÚJO; W. L., MAKI, C. S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 4187-4197, 2012.

CAMPBELL, R.; GREAVES, M. P. **Anatomy and community structure of the rhizosphere**. In: LYNCH, J. M. The rhizosphere. New York: John Wiley, p.11-34, 1990.

CHEN, Y.; WANG, H.; LI, L.; DAI, C. The potential application of the endophyte *Phomopsis liquidambari* to the ecological remediation of long-term cropping soil. **Applied Soil Ecology**, v. 67, p. 20–26, 2013.

CHENG, H. R., JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 55-59, 2006.

COVARELLI, L.; STIFANO, S.; BECCARI, G.; RAGGI, L.; LATTANZIO, V. M. T.; ALBERTINI, E. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. **Food Microbiology**, v. 31, p. 17–24, 2012.

DESJARDINS, A. E.; BUSMAN, M.; MUHITCH, M.; PROCTOR, R. H. Complementary host–pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays*–*Gibberella moniliformis* interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 149–160, 2007.

DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y., SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 361–379, 2010.

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

ESITKEN, A.; YILDIZ; H. E., ERCISLI; S., DONMEZ, M. F.; TURAN, M.; GUNES A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 62–66, 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.

GUILHERME F. A. G.; OLIVEIRA A. S. Estrutura populacional de *Butia purpurascens* Glassman (Arecaceae) em duas áreas de Cerrado *sensu stricto* no estado de Goiás. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, p. 37-45, 2011.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 619–626, 2007.

JHA, C. K.; PATEL, D.; RAJENDRAN, N.; SARAF, M. Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 211–217, 2010.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D., TAKETANI; R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183–191, 2013.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358–363, 2006.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, v. 17, p. 69–90, 2004.

KUMAR, G.; KANAUIA, N.; BAFANA, A. Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley. **Microbiological Research**, v. 167, p. 220– 225, 2012.

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

MADHAIYAN, M.; PENG, N.; TE, N. S.; HSIN I, C.; LIN, C.; LIN, F.; REDDY, C.; YAN, H.; JI, L. Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-13, 2013.

MATIĆ, S.; SPADARO, D.; PRELLE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 515–523, 2013.

MCNEAR JR., D. H., The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. **Nature Education Knowledge**, v.4, p.1, 2013.

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J. C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 12, p. 961-968, 2011.

MESQUITA, V. A.; MAGALHÃES, K. T.; BATISTA, C. F. S.; SCHWAN, R. F. The molecular phylogenetic diversity of bacteria and fungi associated with the cerrado soil from different regions of Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, p. 119-131, 2013.

OLIVEIRA, L. R. **Estudo da variabilidade genética de *Butia purpurascens* Glassman (Arecaceae) no Sudoeste Goiano utilizando marcadores RAPD**. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. 2010.

PATEL, D. K.; MURAWALA, P.; ARCHANA, G.; KUMAR, G.; N. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3055–3061, 2011.

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

REINHOLD-HUREK B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 435–443, 2011.

RÚBIO NETO, A. **Superação da dormência em sementes de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loodiges 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 [*Acrocomia aculeata* (Jacq.)

Loddiges ex MART.] fruits and seeds. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 34, p. 179-185, 2012.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de micro-organismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, p. 199-212, 2011.

SCHULZ, B.; C. BOYLE. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.

SHANMUGAPRAKASH, M.; KIRTHIKA, J.; RAGUPATHY, J.; NILANEE, K.; MANICKAM, A. Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 443–452, 2014.

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

SMITH, J. F.; BATEMAN, T. A. Genetic Differentiation of Rare and Common Varieties of *Eriogonum shockleyi* (Polygonaceae) in Idaho Using ISSR Variability. **Western North American Naturalist**, v. 62, p. 316-326, 2002.

SRINIVASAN, R.; ALAGAWADI, A. R.; YANDIGERI, M. S.; MEENA, K. K.; SAXENA, A. K. Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms from salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 93–105, 2012.

TIAN-XING, L.; CHAO, L.; MING-FUL, G. Genetic Diversity of Antagonistic Endophytic Bacteria Isolated from *Sophora alopecuroides*. **Plant Diseases and Pests**, v. 2, p. 6–8, 2011.

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.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis, M. A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. J.; White, T. J., eds). Academic Press, New York, USA, p. 315–322, 1990.

YADAV, H.; GOTHWAL, R. K.; NIGAM, V. K.; SINHA-ROY, S.; GHOSH P. Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium *Brevibacillus* sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 217–225, 2013.

ZHANG, Z.; TIAN, W.; LIU, D.; LIU, Y.; SHEN, Q.; SHEN, B. Characterization of a cryptic plasmid pPZZ84 from *Bacillus pumilus*. **Plasmid**, v. 64, p. 200–203, 2010.

## CAPÍTULO II

**Traços funcionais de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de  
*Butia purpurascens* Glassman**

## RESUMO

Os micro-organismos influenciam diretamente na fertilidade do solo e a produtividade vegetal, com isso, a seleção de cepas com potencial multifuncional é estratégica, visto possuírem uma ou mais características benéficas às plantas. Com este trabalho, objetivou-se quantificar a solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e fosfato de ferro ( $\text{FePO}_4$ ) em meio líquido e a produção de ácido indolacético (AIA) por micro-organismos endofíticos e rizosféricos de palmeira-jataí (*Butia purpurascens* Glassman). Um total de 166 bactérias e 46 fungos isolados de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, pertencentes ao banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Câmpus Rio Verde, foi submetido a testes qualitativos e quantitativos de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e de síntese de AIA. Para tanto, as culturas dos isolados bacterianos tiveram sua densidade óptica (DO) ajustada a 0,1 a 600 nm e, para os fungos, foi utilizado um disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial. As avaliações de solubilização de fosfatos foram realizadas pelo método colorimétrico da vitamina C, em espectrofotômetro a 725nm e, para a determinação de síntese de AIA, o método colorimétrico (530 nm). Para as 33 bactérias testadas, observou-se que todos os isolados solubilizaram  $\text{CaHPO}_4$  em meio líquido e produziram AIA, mas nenhum dos isolados solubilizou  $\text{FePO}_4$ . Dentre os 21 isolados fúngicos testados, apenas dois solubilizaram ambos os fosfatos, porém todos sintetizaram AIA. Contudo, os isolados fúngicos se sobressaíram em relação aos bacterianos nos testes supracitados, indicando potencial de uso como inoculantes para incrementar a formação de mudas de *Butia purpurascens*.

**PALAVRAS-CHAVES:** bactérias, fungos, solubilização, auxina.

## ABSTRACT

Microorganisms influence directly on soil fertility and plant yield. Therefore, it is strategic to screening strains with multipurpose potential since it had one or more beneficial characteristics to plants. This work aimed to quantify the  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{FePO}_4$  solubilization in liquid medium and indolacetic acid (IAA) production by endophytic and rhizospheric microorganisms from *Butia purpurascens* Glassman. A total of 166 bacteria and 46 fungi isolates from root and rhizosphere of *B. purpurascens* were evaluated with qualitative and quantitative  $\text{CaHPO}_4$  /  $\text{FePO}_4$  solubilization tests as soon as IAA synthesis. Optic density on growth media incubated with bacteria isolates was adjusted to 0.1 (600 nm). For fungi isolates, a disk with 5 mm of diameter with mycelial growth was used. The phosphate solubilization evaluation was carried out using the vitamin C colorimetric method, in spectrophotometer (725 nm) and IAA quantification under 530 nm. Among 33 bacteria isolates tested, all of them solubilized  $\text{CaHPO}_4$  and produced IAA in liquid media. However, none of them solubilized  $\text{FePO}_4$ . Among 21 fungi isolates two of them solubilized both phosphate while all isolates synthesized IAA. However, the fungi isolates showed a better performance than bacteria isolates. It indicates the inoculant potential to increase the *B. purpurascens* seedling production.

**KEYWORDS:** bacteria, fungi, solubilization, auxin.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse na interação planta x micro-organismos tem aumentado gradativamente, visando promover o crescimento de plantas de interesse agrônômico e ambiental, explorando o potencial de fungos e bactérias como inoculantes microbianos (Gaggia et al., 2013).

O acesso a minerais e fitormônios está ligado diretamente ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Vitorino et al., 2012), em que micro-organismos endofíticos e rizosféricos contribuem efetivamente para este fim, quando associados às raízes e outros tecidos, maximizando o fornecimento de nutrientes às plantas (Arruda et al., 2013; Dawwam et al., 2013).

Diversos autores confirmam que certas espécies microbianas, associadas às plantas e rizosfera, são benéficas para o seu crescimento, produtividade e qualidade da espécie vegetal (Esitken et al., 2010). Estes promotores de crescimento podem ser dos gêneros *Rhizobium* (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2012), *Bacillus* e *Pseudomonas* (Esitken et al., 2010), *Aerococcus*, *Alteromonas*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Srinivasan et al., 2012), *Azospirillum* (Pedraza et al., 2010), entre outros.

A seleção de cepas com potencial multifuncional é estratégica, visto serem micro-organismos que possuem mais de uma característica benéfica à planta (Vassilev et al., 2012). Tais benefícios podem ser diretos: fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfatos insolúveis (Marra et al., 2012), produção de sideróforos e fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), giberelinas, citocininas, etileno, jasmonatos, óxido nítrico e poliaminas (Pereira et al., 2012) e produção de ACC deaminase ou indiretos, como supressão de patógenos (Ghyselinck et al., 2013). Esses isolados são tidos como promotores do crescimento vegetal (Chaiharn e Lumyong, 2009; Esitken et al., 2010; Pereira et al., 2012).

O fósforo (P) é um nutriente essencial às plantas, pois possui papel importante em atividades como divisão celular, desenvolvimento, fotossíntese, quebra de açúcares, transporte de nutrientes dentro da planta, transferência de características genéticas entre gerações e regulação de vias metabólicas (Behera et al., 2014). Contudo, sua limitação está relacionada diretamente ao crescimento das plantas e à fertilidade dos solos (Vassilev et al., 2012).

Solos tropicais possuem reduzida disponibilidade de P, em decorrência da reatividade de formas solúveis com cálcio, ferro, magnésio e alumínio, formando compostos de baixa solubilidade (Barosso e Nahas, 2008; Chagas Junior et al., 2010; Behera et al., 2014). O P no solo se encontra nas formas inorgânica e orgânica insolúvel, ocorrendo reações como a fixação e imobilização, em que há conversão em formas indisponíveis para a planta. Consequentemente, cerca de 70-90% dos adubos fosfatados aplicados se tornam fixos no solo, ou seja, indisponíveis para a absorção radicular (Behera et al., 2014).

O ciclo do P está envolvido diretamente com a atividade microbiana, além de plantas e animais (Gomes et al., 2010; Behera et al., 2014). Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que as bactérias, fungos e actinobactérias são capazes de liberar íons fosfato, a partir de frações solúveis de P inorgânicos, tornando-o disponível à planta (Vassilev et al., 2012). Estes micro-organismos contribuem para a diminuição do pH na proximidade da raiz pela produção e liberação de ácidos orgânicos, sendo considerado o principal mecanismo de solubilização de fosfato (Vassilev et al., 2006; Marra et al., 2012).

Entre os micro-organismos solubilizadores de fosfatos, são encontradas bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bacillus* e *Pseudomonas* e fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, dentre outros com alto potencial de solubilização (Behera et al., 2014).

Algumas bactérias são capazes de produzir moléculas de sinalização que atuam como mensageiros químicos e desempenham papel fundamental como reguladores de crescimento e desenvolvimento vegetal (Dawwam et al., 2013). Entre os diferentes reguladores de crescimento de plantas, o mais importante é a auxina ácido indol-3-acético (AIA), que possui grande impacto no desenvolvimento radicular (Spaepen e Vanderleyden, 2011).

Objetivou-se com esse trabalho quantificar a solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e fosfato de ferro ( $\text{FePO}_4$ ), em meio líquido e a produção de AIA por micro-organismos endofíticos e rizosféricos de palmeira-jataí (*Butia purpurascens* Glassman).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Critérios para a seleção dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *B. purpurascens* com potencial para promoção do crescimento**

Um total de 166 bactérias e 46 fungos, isolados de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, pertencentes ao banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde foram submetidos ao teste qualitativo de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e síntese de AIA, para seleção de linhagens com tais potenciais. Somente aquelas que apresentavam as duas características, foram avaliadas para os testes de quantificação de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e síntese de AIA.

#### **2.1.2. Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de $\text{CaHPO}_4$**

Os isolados bacterianos e fúngicos foram inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura GELP (glicose 10g; 5g de peptona; extrato de levedura 0,05g e ágar 15g), adicionado 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  (10%) e 12,5 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10%), formando um precipitado de fosfato inorgânico de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). A formação do halo transparente, em contraste com o meio opaco, ao redor da colônia de bactéria ou de fungo confirmou a capacidade do micro-organismo em solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  (Barroso e Oliveira, 2001; Souchie et al., 2007).

#### **2.1.3. Avaliação qualitativa de síntese de ácido indolacético (AIA)**

Somente as bactérias foram submetidas ao teste qualitativo para a produção de AIA. Estas foram inoculadas em 10 mL de meio caldo nutriente, suplementado com 100  $\mu\text{L}$  de triptofano. Após 72h de incubação, a 30 °C, no escuro, foram centrifugados (12.000 rpm), por 5 min, a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 1 mL do reagente Salkowski (1,875g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$  e 150 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Os tubos foram mantidos no escuro por 20 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (530 nm).

## **2.2. Testes de quantificação da solubilização de $\text{CaHPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio líquido e síntese de AIA**

As amostras bacterianas foram crescidas sob agitação constante com o auxílio do agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712), em rotação de 90 rpm, por 24h, a 30 °C, em 7 mL de meio de cultivo líquido GL (10g glicose, 2g extrato de levedura), e foram retirados assepticamente 3 mL de cada cultura para se determinar a densidade óptica (DO), a 600 nm. Todas as amostras bacterianas tiveram sua DO ajustada a 0,1 por meio de diluição com solução salina (0,85%). Para as amostras fúngicas, estas foram crescidas em meio BDA (infusão de 200g de batata, dextrose 20g e ágar 15g), por 4 dias, a 30 °C. Os testes foram realizados em triplicata.

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

Para as amostras de bactérias, foi inoculado 1 mL da cultura previamente padronizada em 10 mL de meio líquido GL e adicionado 1,26 g L<sup>-1</sup> de cada uma das fontes fosfatadas ( $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ ). Para os fungos, foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial e inoculados em frasco de penicilina (um disco por vidro). As culturas permaneceram sob agitação a 90 rpm, em 30 °C, por 72h. Posteriormente, foi realizada a medição do pH. Para a determinação da quantidade de P inorgânico, foi realizado o método colorimétrico da vitamina C, a 725nm, de Gadagi e Sa (2002).

### **2.2.2. Quantificação de síntese de AIA por micro-organismos isolados de raízes e rizosfera de *B. purpurascens***

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Para isso, foi inoculado 1 mL de cada uma das culturas bacterianas padronizada em 9 mL de meio caldo nutriente, suplementado com 100 µL de triptofano e, para os fungos, foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial. Após 72h de incubação, a 30 °C, no escuro a 90 rpm, foram centrifugados (12.000 rpm), por 5 min, a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 1 mL do reagente Salkowski (1,875g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$  e 150 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Os tubos foram mantidos no escuro por 20 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (530 nm). As concentrações de AIA foram obtidas utilizando a equação da curva de calibração (Pereira et al., 2012).

### 2.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias relativas à capacidade de solubilização de fosfatos e síntese de AIA foram comparadas pelo teste Scott-Knott (5%), utilizando o *software* SISVAR (Ferreira, 2011).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Solubilização de fosfatos

A partir do total de 166 isolados bacterianos (145 identificados e 21 não identificados) e 46 fungos isolados de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, através do teste qualitativo, foi detectada a capacidade de solubilização para 33 isolados bacterianos em meio GELP sólido, porém, para os isolados fúngicos não foi possível observar a tal capacidade em razão do rápido crescimento do micélio da maioria dos fungos.

O teste de quantificação da solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ , em meio líquido, por bactérias, demonstrou que todos os isolados apresentaram eficiência de solubilização deste fosfato (Tabela 1), sendo obtidas as maiores taxas de solubilização pelos isolados BP205RB (9,24mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Yokenella regensburgei* BP190RB (8,83mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pantoea cypripedii* BP28RB (8,77 mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pantoea cypripedii* BP44EB (8,75 mg  $\text{L}^{-1}$ ), BP69RB (8,36mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Citrobacter amalonaticus* BP30RB (8,35 mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pantoea cypripedii* BP45EB (8,29mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pantoea cypripedii* BP10RB (8,21mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Yokenella regensburgei* BP177RB (8,21mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pseudomonas* sp. BP54EB (8,06mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Pseudomonas putida* BP45RB 7,91mg  $\text{L}^{-1}$ ), *Agrobacterium tumefaciens* BP324BEB (7,89mg  $\text{L}^{-1}$ ). O pH do meio de cultura foi acidificado por 87,88% das bactérias e 12,12% tornaram o meio de cultura mais alcalino, demonstrando menor capacidade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ .

Para a solubilização de  $\text{FePO}_4$ , os valores para todos os isolados foram próximos a zero, indicando que não foram capazes de solubilizar esta fonte fosfatada em condições *in vitro*. Não obstante, 54,55% dos isolados acidificaram o meio de cultura e 45,45% tornaram o meio de cultura mais alcalino (Tabela 1).

**Tabela 1.** pH e solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) e ferro (FePO<sub>4</sub>) por bactérias obtidas de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, em Rio Verde, GO.

Isolado	Ambiente	pH		P solúvel (mg L <sup>-1</sup> )		
		CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	
Não identificado	BP2EB	Endofítico	5,31 A	3,44 a	5,69 c	ND
<i>Rhizobium huautlense</i>	BP3EB	Endofítico	4,53 A	7,32 e	7,56 b	ND
<i>Pantoea cypripedii</i>	BP44EB	Endofítico	4,38 A	3,82 a	8,75 a	ND
<i>Pantoea cypripedii</i>	BP45EB	Endofítico	4,36 A	3,45 a	8,29 a	ND
<i>Pseudomonas</i> sp.	BP54EB	Endofítico	4,52 A	7,38 e	8,06 a	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	BP60EB	Endofítico	4,56 A	7,26 e	7,07 b	ND
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BP261EB	Endofítico	6,84 C	7,42 e	0,68 e	ND
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	BP269EB	Endofítico	4,50 A	7,17 e	7,23 b	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	BP271EB	Endofítico	4,64 A	7,44 e	7,23 b	ND
Não identificado	BP272EB	Endofítico	4,21 A	7,62 e	7,19 b	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	BP314EB	Endofítico	4,24 A	7,20 e	7,43 b	ND
Não identificado	BP322EB	Endofítico	6,68 C	7,74 e	1,07 e	ND
<i>Enterobacter ludwigi</i>	BP323EB	Endofítico	6,92 C	7,73 e	0,44 e	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BP324EB	Endofítico	4,39 A	4,52 b	7,89 a	ND
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	BP339EB	Endofítico	6,57 C	4,59 b	1,60 e	ND
<i>Pantoea cypripedii</i>	BP10RB	Rizoférico	4,40 A	3,48 a	8,21 a	ND
<i>Pectobacterium cypripedii</i>	BP13RB	Rizoférico	4,25 A	3,53 a	7,48 b	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	BP15RB	Rizoférico	4,50 A	6,35 d	7,53 b	ND
<i>Pantoea</i> sp.	BP16RB	Rizoférico	4,30 A	3,53 a	7,64 b	ND
<i>Bacillus pumilus</i>	BP25RB	Rizoférico	5,02 A	4,87 b	6,59 c	ND
<i>Pantoea cypripedii</i>	BP28RB	Rizoférico	4,40 A	3,54 a	8,77 a	ND
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	BP30RB	Rizoférico	4,40 A	4,51 b	8,35 a	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	BP45RB	Rizoférico	4,51 A	7,46 e	7,91 a	ND
Não identificado	BP48RB	Rizoférico	6,68 C	7,52 e	1,03 e	ND
<i>Burkholderia</i> sp.	BP54RB	Rizoférico	6,56 C	3,22 a	0,83 e	ND
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP61RB	Rizoférico	4,56 A	4,56 b	6,43 c	ND
Não identificado	BP69RB	Rizoférico	4,56 A	4,54 b	8,36 a	ND
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP177RB	Rizoférico	4,56 A	4,92 b	8,21 a	ND
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP190RB	Rizoférico	4,58 A	4,63 b	8,83 a	ND
<i>Enterobacter asburiae</i>	BP203RB	Rizoférico	7,08 C	7,27 e	0,80 e	ND
Não identificado	BP205RB	Rizoférico	4,48 A	3,41 a	9,24 a	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BP209RB	Rizoférico	6,03 B	5,68 c	3,96 d	ND
<i>Enterobacter ludwigii</i>	BP210RB	Rizoférico	7,04 C	7,32 e	0,59 e	ND
Controle negativo			6,77 C	5,83 c	ND	ND

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

A maior eficiência de solubilização de CaHPO<sub>4</sub> foi atingida pelos isolados fúngicos *Fusarium concentricum* BP55EF e *Neodeightonia phoenicum* BP191RF (1454,9 e 1403,8 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Para a solubilização de FePO<sub>4</sub>, as maiores taxas foram atingidas pelos isolados *Aspergillus brasiliensis* BP192RF, *Penicillium purpurogenum* BP16EF e *Fusarium oxysporum* BP14EF (445,22; 273,83 e 235,50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Comparando-se a solubilização entre as fontes fosfatadas, os isolados fúngicos solubilizaram mais CaHPO<sub>4</sub> do que FePO<sub>4</sub>. Todos os isolados fúngicos reduziram o pH do meio líquido com CaHPO<sub>4</sub> ou FePO<sub>4</sub>, em relação ao controle sem inoculação (Tabela 2).

**Tabela 2.** pH e solubilização *in vitro* de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) e ferro (FePO<sub>4</sub>) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, em Rio Verde, GO.

Isolado	Ambiente	pH		P solúvel (mg L <sup>-1</sup> )		
		CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	BP192RF	Rizosférico	2,93 a	2,29 a	768,46 b	445,22 a
<i>Penicillium purpurogenum</i>	BP16EF	Endofítico	5,52 c	4,78 d	657,27 b	273,83 a
<i>Fusarium oxysporum</i>	BP14EF	Endofítico	5,23 c	5,15 e	ND	235,50 a
<i>Fusarium concentricum</i>	BP55EF	Endofítico	4,80 b	4,43 d	1454,96 a	ND
<i>Neodeighonia phoenicum</i>	BP191RF	Rizosférico	4,30 b	4,34 d	1403,81 a	ND
<i>Hypocreales</i> sp.	BP202RF	Rizosférico	4,23 b	4,00 c	854,71 b	ND
<i>Bionectria ochroleuca</i>	BP364EF	Endofítico	3,85 b	3,19 b	449,58 b	ND
<i>Fusarium concentricum</i>	BP189RF	Rizosférico	5,62 c	5,00 e	429,06 b	ND
<i>Periconia macrospinoso</i>	BP329EF	Endofítico	6,20 d	5,82 e	402,65 b	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	BP375EF	Endofítico	5,72 c	5,15 e	347,27 b	ND
<i>Curvularia affinis</i>	BP62RF	Rizosférico	5,58 c	4,79 d	262,27 c	ND
<i>Diaporthe</i> sp.	BP341EF	Endofítico	4,95 c	4,07 c	168,81 c	ND
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	BP196RF	Rizosférico	4,64 b	4,38 d	194,58 c	ND
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BP40EF	Endofítico	5,14 c	5,21 e	96,50 c	ND
<i>Hamigera insecticol</i>	BP33EF	Endofítico	6,11 d	3,87 c	ND	ND
Não identificado	BP351EF	Endofítico	4,57 b	4,53 d	ND	ND
Não identificado	BP178RF	Rizosférico	5,22 c	4,62 d	ND	ND
<i>Codinaeopsis</i> sp.	BP328EF	Endofítico	4,38 b	4,64 d	ND	ND
<i>Fusarium proliferatum</i>	BP314EF	Endofítico	5,31 c	4,93 e	ND	ND
<i>Gibberella moniliformis</i>	BP386EF	Endofítico	5,44 c	5,09 e	ND	ND
<i>Gibberella moniliformis</i>	BP5EF	Endofítico	5,25 c	5,10 e	ND	ND
Controle negativo			6,56 d	5,85 e	ND	ND

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

### 3.2. Produção de AIA

Todas as cepas bacterianas apresentaram a capacidade de produzir AIA na presença de triptofano como precursor, com valores acima de 17 µg mL<sup>-1</sup>, sendo significativamente maior para os isolados BP322EB, *Enterobacter ludwigi* BP323EB, *Enterobacter asburiae* BP203RB e BP48RB (108,80; 106,20; 102,13 e 96,70 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por bactérias obtidas de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, em Rio Verde, GO.

Isolados bacterianos	Ambiente	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
Não identificado	BP2EB	Endofítico	31,92 c
<i>Rhizobium huautlense</i>	BP3EB	Endofítico	47,68 b
<i>Pantoea cyripedii</i>	BP44EB	Endofítico	42,98 b
<i>Pantoea cyripedii</i>	BP45EB	Endofítico	53,58 b
<i>Pseudomonas</i> sp.	BP54EB	Endofítico	28,55 c
<i>Pseudomonas putida</i>	BP60EB	Endofítico	36,30 c
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BP261EB	Endofítico	22,47 d
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	BP269EB	Endofítico	32,39 c
<i>Pseudomonas putida</i>	BP271EB	Endofítico	17,98 d
Não identificado	BP272EB	Endofítico	21,21 d
<i>Pseudomonas putida</i>	BP314EB	Endofítico	23,71 d
Não identificado	BP322EB	Endofítico	108,80 a
<i>Enterobacter ludwigi</i>	BP323EB	Endofítico	106,20 a
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BP324EB	Endofítico	55,53 b
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	BP339EB	Endofítico	66,12 b
<i>Pantoea cyripedii</i>	BP10RB	Rizosférico	34,79 c
<i>Pectobacterium cyripedii</i>	BP13RB	Rizosférico	24,11 d
<i>Pseudomonas putida</i>	BP15RB	Rizosférico	21,51 d
<i>Pantoea</i> sp.	BP16RB	Rizosférico	31,92 c
<i>Bacillus pumilus</i>	BP25RB	Rizosférico	37,70 c
<i>Pantoea cyripedii</i>	BP28RB	Rizosférico	30,28 c
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	BP30RB	Rizosférico	56,72 b
<i>Pseudomonas putida</i>	BP45RB	Rizosférico	33,63 c
Não identificado	BP48RB	Rizosférico	96,70 a
<i>Burkholderia</i> sp.	BP54RB	Rizosférico	17,21 d
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP61RB	Rizosférico	46,80 b
Não identificado	BP69RB	Rizosférico	25,42 d
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP177RB	Rizosférico	39,29 c
<i>Yokenella regensburgei</i>	BP190RB	Rizosférico	25,61 d
<i>Enterobacter asburiae</i>	BP203RB	Rizosférico	102,13 a
Não identificado	BP205RB	Rizosférico	38,31 c
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BP209RB	Rizosférico	51,74 b
<i>Enterobacter ludwigii</i>	BP210RB	Rizosférico	58,06 b
Controle negativo			ND

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

Foi verificado potencial de produção de AIA por todos os isolados fúngicos, com destaque para *Fusarium concentricum* BP55EF ( $12,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *Fusarium proliferatum* BP314BEF ( $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), já que os demais isolados produziram teores inferiores a  $3,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 4.** Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de *B. purpurascens*, em Rio Verde, GO.

Isolados fúngicos		Ambiente	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Gibberella moniliformis</i>	BP5EF	Endofítico	2,52 d
<i>Fusarium oxysporum</i>	BP14EF	Endofítico	2,21 d
<i>Penicillium purpurogenum</i>	BP16EF	Endofítico	3,09 c
<i>Hamigera insecticol</i>	BP33EF	Endofítico	1,02 e
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BP40EF	Endofítico	1,05 e
<i>Fusarium concentricum</i>	BP55EF	Endofítico	12,49 a
<i>Fusarium proliferatum</i>	BP314EF	Endofítico	3,90 b
<i>Codinaeopsis</i> sp.	BP328EF	Endofítico	1,12 e
<i>Periconia macrospinosa</i>	BP329EF	Endofítico	1,32 e
<i>Diaporthe</i> sp.	BP341EF	Endofítico	1,27 e
Não identificado	BP351EF	Endofítico	0,73 f
<i>Bionectria ochroleuca</i>	BP364EF	Endofítico	0,89 e
<i>Phomopsis</i> sp.	BP375EF	Endofítico	1,71 e
<i>Gibberella moniliformis</i>	BP386EF	Endofítico	2,50 d
<i>Curvularia affinis</i>	BP62RF	Rizosférico	1,00 e
Não identificado	BP178RF	Rizosférico	1,00 e
<i>Fusarium concentricum</i>	BP189RF	Rizosférico	1,86 d
<i>Neodeighonia phoenicum</i>	BP191RF	Rizosférico	1,34 e
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	BP192RF	Rizosférico	0,58 f
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	BP196RF	Rizosférico	0,46 f
<i>Hypocreales</i> sp.	BP202RF	Rizosférico	1,87 d
Controle negativo			ND

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

#### 4. DISCUSSÃO

Alguns mecanismos interdependentes contribuem para a solubilização de fosfatos inorgânicos, como a produção de ácidos glutâmico, glicólico, glucônico, cítrico, oxálico e succínico que possuem efeito na solubilização, diminuição do pH e liberação de prótons para a solução do solo (Vega, 2007; Barroso e Nahas, 2008). A produção simultânea de ácidos orgânicos pelas estirpes pode contribuir para incrementar o potencial de solubilização, bem como fatores como a concentração e o tipo de ácido (Marra et al., 2012).

Neste estudo, a acidificação do meio de cultura pela maioria dos isolados pode ser atribuída à absorção do carboidrato ali presente e o crescimento do micro-organismo. Barroso e Nahas (2008) em estudo sobre a solubilização de P por *Aspergillus niger* e Patel et al. (2011) com *Pseudomonas aeruginosa*, de forma similar a alguns isolados deste estudo, detectaram diminuição do pH do meio de cultura e a não solubilização dos fosfatos avaliados por alguns micro-organismos.

Os isolados fúngicos atingiram os mais altos valores de solubilização de fosfatos em relação aos isolados bacterianos, porém, um número maior de bactérias

possuem tal capacidade. Entretanto, no presente trabalho, foi testada a seleção de isolados utilizando o fosfato tricálcico. Bashan et al. (2013) criticam este tipo de critério devido os diversos fracassos, com plantas inoculadas com estes micro-organismos, pois não atingem o resultado esperado. Um conjunto de fatores deve ser levado em consideração, como tipo de solo (ácido ou alcalino), produção de ácidos orgânicos e interações químicas, portanto, como seleção inicial, o mais indicado seria a combinação de dois a três compostos de metal-P. Vega (2007) e Verma et al. (2010) relatam que alguns pesquisadores preferem o uso fungos solubilizadores de P, argumentando que cepas bacterianas podem perder sua capacidade depois de vários ciclos de cultivo *in vitro*.

Em trabalho realizado com espécie nativa do Cerrado *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae), foram isoladas 42 bactérias e seis fungos endofíticos, sendo que testes em meio sólido indicaram que apenas 20% das estirpes bacterianas e nenhum isolado fúngico foram capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ . Contrariamente, para a solubilização  $\text{FePO}_4$ , todos os fungos e 59% bactérias atingiram níveis elevados de solubilização (Vitorino et al., 2012).

Em estudos com monocotiledôneas como milho, Arruda et al. (2013) selecionaram 292 cepas de rizobactérias, em que 154 delas (53%) foram capazes de solubilizar fosfatos e 287 (98%) produziram AIA na presença de triptofano, sendo que 76 cepas produziram AIA e solubilizaram fosfatos.

Valores entre 58,2 a 452,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfato solúvel foram encontrados por Zhao et al. (2014) em bactérias isoladas da rizosfera de milho por gêneros como *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces* e *Bacillus*. Alguns destes gêneros foram descritos no presente trabalho, como *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Por meio do método colorimétrico, Goswami et al. (2014) observaram a produção de cerca de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA em bactérias isoladas rizosfera de *Suaeda fruticosa* em deserto salino. Já em estudo com actinobactérias da rizosfera de inhame, Palaniyandi et al. (2013) observaram que 96% dos isolados atingiram a produção de AIA de até 6,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A partir do isolamento de rizobactérias de cactos da Caatinga brasileira, Kavamura et al. (2013) detectaram produção de AIA com valores acima 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em cerca de 30% dos isolados. Especificamente, as estirpes *Pantoea* sp. e *Arthrobacter* sp. produziram alto teores: 113,57 e 135,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, enquanto *Bacillus*

sp. atingiu produção inferior a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Já no presente trabalho, os isolados que se destacaram na síntese de AIA pertencem ao gênero *Enterobacter* sp.

A produção de AIA é um importante traço funcional, visto que este fitormônio permite a planta maximizar o desenvolvimento do sistema radicular e, por consequência, favorecer sua nutrição (Goswami et al., 2014). Os genes responsáveis pela biossíntese de auxina estão localizados no cromossomo ou num plasmídeo. Quando situados no DNA cromossômico, resultam em menor produção de AIA, porém, se presentes no plasmídeo em múltiplas cópias modulam uma maior biossíntese (Spaepen e Vanderleyden, 2011).

Exsudados presentes nos vegetais como o L-triptofano estimulam a síntese de AIA por estirpes microbianas que colonizam as plantas, sugerindo a estreita relação simbiótica entre a planta e os micro-organismos (Idris et al., 2007).

Para a produção de AIA, os micro-organismos promotores de crescimento possuem vias dependentes e independentes de triptofano. Para as vias dependentes, há três rotas principais: ácido indol-3-pirúvico (IPyA), triptamina (TAM) e indol-3-acetonitrilo (IAN) e, como via adicional, independente de triptofano, tem-se o indol-3-acetamida (IAM) (Kochar et al., 2011).

Ahemad e Khan (2012) isolaram *Pseudomonas putida* da rizosfera de mostarda, que mostrou níveis variáveis de tolerância a fungicidas e estimulou o crescimento das plantas, pela produção de substâncias promotoras. Porém, a produção de substâncias promotoras foi reduzida, conforme a toxicidade do fungicida. Estes resultados sugerem a necessidade de utilizar cepas como bioinoculantes tolerantes a fungicidas, a fim de assegurar o benefício aos vegetais.

Estirpes bacterianas das espécies *Pantoea cypripedii* e *Pseudomonas plecoglossicida* foram isoladas de solo rizosférico de *Stevia rebaudiana*, na Índia, com base em suas atividades de promoção de crescimento de plantas e sua eficiência para incrementar a produtividade da cultura e da fertilidade do solo. Estas foram utilizadas como bioinoculantes em culturas do milho e trigo e proporcionaram resultados satisfatórios na produção (Kaur e Reddy, 2014).

O presente trabalho é o primeiro relato sobre bioprospecção de traços funcionais de micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *B. purpurascens*, visando à promoção do crescimento desta espécie arbórea. Este trabalho inaugura uma série de possibilidades de estudos relacionados à interação micro-organismos x *B. purpurascens*, uma espécie arbórea nativa do Cerrado de alto interesse comercial.

## 5. CONCLUSÕES

- Todos os isolados bacterianos avaliados solubilizam  $\text{CaHPO}_4$  em diferentes proporções e não são capazes de solubilizar  $\text{FePO}_4$  em condições *in vitro*. Dentre os 21 fungos analisados, 13 solubilizam  $\text{CaHPO}_4$  e apenas 3  $\text{FePO}_4$ .

- Todas as bactérias e fungos são produtores de AIA, com especial destaque para os isolados bacterianos, que atingiram altos níveis de produção.

- Há isolados fúngicos capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e sintetizar AIA, como *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium purpurogenum*, indicativo de alto potencial de uso como inoculante para incrementar a formação de mudas de *B. purpurascens*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH-DAHAI, P.; SAVAGHEBI, G. R.; ASADI-RAHMANI, H.; REJALI, F.; FARAHBAKHS, M.; MOTESHAREH-ZADEH, B.; OMIDVARI, M.; LINDSTROM, K. Symbiotic effectiveness and plant growth promoting traits in some *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Growth Regulation**, v. 68, p. 361–370, 2012.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. **Chemosphere**, v. 86, p. 945–95, 2012.

ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F.; PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.15–22, 2013.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.529-535, 2008.

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**, v. 49, p. 465–479, 2013.

BEHERA B.C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove - A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97–110, 2014.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A., OLIVEIRA, A. N.; 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.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 305–314, 2009.

DAWWAM, G. E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H. M.; ABBASA, I. H.; HASSAN, M. M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, p. 195–201, 2013.

ESITKEN, A.; YILDIZ, H. E., ERCISLI, S., DONMEZ, M. F.; TURAN, M.; GUNES A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 62–66, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042. 2011.

GADAGI, R. S.; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p.615-618, 2002.

GAGGIA, F.; BAFFONI, L.; GIOIA, D.; ACCORSI, M.; BOSI, S.; MAROTTI, I.; BIAVATI, B.; DINELLI, G. Inoculation with microorganisms of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots. **New Biotechnology**, v. 30, p. 695–704, 2013.

GHYSELINCK, J.; VELIVELLI, S. L. S.; HEYLEN, K.; O'HERLIHY, E.; FRANCO, J.; ROJAS, M.; VOS, P.; PRESTWICH, B. D. Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: Screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 116–127, 2013.

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

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

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.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, D. J., TALON, M., BORRISS, R. Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 619–626, 2007.

KAUR, G.; REDDY, M. S. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. **European Journal of Soil Biology**, v. 61, p. 35-40, 2014.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D., TAKETANI; R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183–191, 2013.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v.162, p. 426-435, 2011.

MARRA, L. M. ; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, p. 289–307, 2012.

PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; DAMODHARA, K.; SUH, J. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 985–995, 2013.

PATEL, D. K.; MURAWALA, P.; ARCHANA, G.; KUMAR, G. N. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3055–3061, 2011.

PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; SALAZAR, S. M.; RAGOUT, A. L.; MENTEL, M. I.; TORTORA, M. L.; GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; DÍAZ-RICCI, J. C. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 265–272, 2010.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, 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. **Physiology and Biotechnology**, v. 63, p. 405-417, 2012.

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

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 17, p. 1-13, 2011.

SRINIVASAN, R.; ALAGAWADI, A. R.; YANDIGERI, M. S.; MEENA, K. K.; SAXENA, A. K. Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms from salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 93–105, 2012.

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

VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEVA, M. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 851–859, 2012.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 137–144, 2006.

VEGA, N. W. O. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on Soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 60, p. 3621-3643, 2007.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N.; SINGH, V. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 954–983, 2010.

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

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; ZHANG, X.; AO, X.; LIU, M.; YU, X., CHEN, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological Research**, v. 169, p. 76–82, 2014.

## CONCLUSÃO GERAL

- A rizosfera e raízes de *B. purpurascens* abrigam grupos diversificados de organismos cultiváveis dos quais participam fungos, bactérias e actinobactérias.

- Quatorze gêneros bacterianos endofíticos e 12 rizosféricos pertencentes a três filos (Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria) e 11 gêneros fúngicos endofíticos e 6 rizosféricos, exclusivamente do filo Ascomycota, foram detectados no ambiente endofítico e rizosférico de *B. purpurascens*.

- Os gêneros mais frequentes isolados no ambiente endofítico para as bactérias foram *Enterobacter* e *Pseudomonas* e, para fungos, *Gibberella* e *Codinaeopsis*. Para o ambiente rizosférico, foram às bactérias do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e fungo *Ceratocystis*.

- Foi observada diferença entre a comunidade microbiana endofítica e rizosférica de *B. purpurascens*, e alguns microrganismos habitam somente um ambiente, sendo que futuros trabalhos avaliando um número maior de indivíduos podem contribuir para confirmação deste fato.

- Todos os isolados bacterianos avaliados solubilizam  $\text{CaHPO}_4$  em diferentes proporções e não são capazes de solubilizar  $\text{FePO}_4$  em condições *in vitro*. Dentre os 21 fungos analisados, 13 solubilizam  $\text{CaHPO}_4$  e apenas 3  $\text{FePO}_4$ .

- Todas as bactérias e fungos são produtores de AIA, com especial destaque para os isolados bacterianos, que atingiram altos níveis de produção.

- Há isolados fúngicos capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e sintetizar AIA, *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium purpurogenum*, indicando alto potencial de uso como inoculante para incrementar a formação de mudas de *B. purpurascens*.

## TABELAS DO APÊNDICE

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

Isolados	Ambiente / Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência Relativa (%)	
BP1EB	E (1)	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	AB681857	98	0,69	
BP60EB BP21RB BP23RB BP41RB BP313EB BP362EB	BP45RB BP264EB BP271EB BP314EB BP15RB BP36RB	E (6) / R (6)	<i>Pseudomonas putida</i>	JQ701740	99	8,28
BP61EB	E (1)	<i>Enterobacter oryzae</i>	JF513179	99	0,69	
BP276EB	E (1)	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	KF114029	99	0,69	
BP321EB BP7RB BP11RB BP20RB BP24RB BP29RB	BP37RB BP50EB BP51EB BP369EB BP324EB BP262EB	E (6) / R (6)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AB826000	99	8,28
BP324AEB BP30RB BP374BEB	E (2) / R (1)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	KC689293	99	2,07	
BP336EB BP269EB	E (2)	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>	KC469709	99	1,38	
BP342EB BP27RB	E (1) / R (1)	<i>Burkholderia tropica</i>	HQ023259	97	1,38	
BP3EB BP32EB	E (2)	<i>Rhizobium huautlense</i>	KC355318	99	1,38	
BP7EB BP10RB BP28RB BP184RB	BP32ARB BP44EB BP45EB BP47EB	E (4) / R (4)	<i>Pantoea cypripedii</i>	JX556216	98	5,52
BP59EB BP19EB BP34EB BP260EB BP373EB BP20EB BP36EB BP37EB	BP320EB BP180RB BP203RB BP46RB BP47RB BP197RB BP48EB BP194RB	E (10) / R (6)	<i>Enterobacter asburiae</i>	EU221358	99	11,03
BP46EB BP186RB BP200RB BP60RB	BP67RB BP43RB BP49EB	E (2) / R (5)	<i>Bacillus subtilis</i>	KF241533	99	4,83
BP318EB BP382EB BP13RB BP31RB BP319EB	E (3) / R (2)	<i>Pectobacterium cypripedii</i>	JF430157	99	3,45	
BP38EB	E (1)	<i>Microbacterium oxydans</i>	EU714340	96	0,69	
BP42EB	E (1)	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	HQ683957	98	0,69	
BP35EB	E (1)	<i>Bacillus methylophilicus</i>	JF899259	99	0,69	

BP339BEB		E (1)	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	HQ683877	96	0,69
BP58EB		E (1)	<i>Bacillus megaterium</i>	KC609020	99	0,69
BP343EB	BP200RB					
BP18RB	BP46EB					
BP53RB	BP26ARB					
BP59RB	BP17ARB					
BP26CRB	BP25RB					
BP267EB	BP38RB					
BP3RB	BP40RB	E (6) / R (20)	<i>Bacillus pumilus</i>	GU969599	99	17,93
BP9RB	BP56RB					
BP12RB	BP265EB					
BP19RB	BP14RB					
BP34RB	BP26BRB					
BP51RB	BP266EB					
BP186RB	BP316EB					
BP371EB		E (2)	<i>Pseudomonas mosselii</i>	KC293833	98	1,38
BP24EB						
BP356EB		E (1)	<i>Achromobacter insolitus</i>	JQ659574	99	0,69
BP15EB						
BP41RB		E (2) / R (1)	<i>Brevibacillus agri</i>	HM629394	99	2,07
BP27AEB						
BP23EB	BP29EB					
BP208RB	BP30EB	E (5) / R (2)	<i>Enterobacter cloacae</i>	HM854373	98	4,83
BP42RB	BP274EB					
BP26EB						
BP261EB		E (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KF358443	97	0,69
BP323EB						
BP185RB		E (1) / R (2)	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KF475838	98	2,07
BP210RB						
BP334EB		E (1) / R (1)	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	NR_102805	99	1,38
BP52RB						
BP8RB		E (1) / R (1)	<i>Pseudomonas sp.</i>	AB461802	96	1,38
BP54EB						
BP188RB						
BP206RB		R (3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KC153122	99	2,07
BP209RB						
BP5RB		R (1)	<i>Bacillus safensis</i>	KF318396	99	0,69
BP61RB						
BP65RB		R (4)	<i>Yokenella regensburgei</i>	AB681877	99	2,76
BP190RB						
BP177RB						
BP35RB		R (1)	<i>Bacillus altitudinis</i>	KC414719	99	0,69
BP44RB		R (1)	<i>Bacillus aerophilus</i>	KC414720	99	0,69
BP55RB	BP198RB					
BP66RB	BP201RB	R (6)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KF483660	99	4,14
BP71RB	BP204RB					
BP57ARB		R (1)	<i>Bacillus cereus</i>	KF475814	99	0,69
BP16RB		R (1)	<i>Pantoea sp.</i>	CP002433	96	0,69
BP187RB		R (1)	<i>Serratia nematodiphila</i>	HF585498	99	0,69
BP212RB		R (1)	<i>Klebsiella variicola</i>	JX968498	99	0,69
BP54RB		R (1)	<i>Burkholderia sp.</i>	KF059273	95	0,69

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

**Tabela 2.** Identificação molecular dos isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de *B. purpurascens*, baseado no sequenciamento da região ITS.

Isolado	Ambiente / Quantidade	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%)	Frequência relativa (%)
BP328EF BP312EF BP381EF BP383EF BP392BEF	E (5)	<i>Codinaeopsis</i> sp.	EF488392	99	13,5
BP364EF	E (1)	<i>Bionectria ochroleuca</i>	HQ607832	99	2,7
BP16EF	E (1)	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GU566198	97	2,7
BP5EF      BP33EF BP31EF      BP335EF BP52EF      BP9EF BP386EF      BP10EF	E (8)	<i>Gibberella moniliformis</i>	JN232122	99	21,6
BP375EF BP363EF	E (2)	<i>Phomopsis</i> sp.	EF488379	99	5,4
BP314BEF BP4EF	E (2)	<i>Fusarium proliferatum</i>	HQ332533	99	5,4
BP14EF	E (1)	<i>Fusarium oxysporum</i>	AY669123	99	2,7
BP329BEF	E (1)	<i>Periconia macrospinoso</i>	FJ536208	99	2,7
BP33EF	E (1)	<i>Hamigera insecticola</i>	JQ425375	98	2,7
BP40EF	E (1)	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	JX965247	99	2,7
BP55EF BP189RF BP32BRF	E (1) / R (2)	<i>Fusarium concentricum</i>	HQ379635	99	8,1
BP332EF	E (1)	<i>Viridispora diparietispora</i>	JN049838	97	2,7
BP341EF BP43EF BP325EF BP326EF	E (4)	<i>Diaporthe</i> sp.	EF423549	95	10,8
BP196RF BP199RF	R (2)	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	JQ963886	99	5,4
BP62RF	R (1)	<i>Curvularia affinis</i>	EF187909	99	2,7
BP191RF	R (1)	<i>Neodeightonia phoenicum</i>	HQ443209	99	2,7
BP202RF	R (1)	<i>Hypocreales</i> sp.	HQ248209	98	2,7
BP192RF	R (1)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	JQ316521	97	2,7

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